

Aus der Klinik für Kardiologie der
Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Adiponektin vermindert matrizelluläres Remodeling nach kardialer Schädigung durch
Hochregulation der Matrix-Metalloproteinase 9-Expression

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Schur
aus Hoyerswerda

Datum der Promotion: 06.09.2019

Vorwort

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotionsarbeit

Die Ergebnisse der Arbeit wurden auf folgenden nationalen und internationalen Kongressen präsentiert:

Posterpräsentation auf der 81. Jahrestagung der DGK, Mannheim 2015

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert:

Jenke A, Schur R, Röger C, Karadeniz Z, Grüger M, Holzhauser L, Savvatis K, Poller W, Schultheiss HP, Landmesser U, and Skurk C: Adiponectin attenuates profibrotic extracellular matrix remodeling following cardiac injury by up-regulating matrix metalloproteinase 9 expression in mice. *Physiol Rep.* 2017 Dec;5(24). pii: e13523. doi: 10.14814/phy2.13523.

und

Alexander Jenke: Cardioprotective and Immunomodulatory Effects of Adiponectin in DCMi. Humboldt-Universität zu Berlin. 2014.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Abstract Englisch/Deutsch	X
1. Einleitung	1
1.1. Kardiales Remodeling und Herzinsuffizienz	1
1.2. Kardiales Remodeling im Rahmen des Myokardinfarktes	2
1.3. Kardiales Remodeling im Rahmen der CVB3-Myokarditis	7
1.4. Adiponektin	10
1.5. Regulation von Adiponektin	13
1.6. Signaltransduktion von Adiponektin	14
1.7. Matrix-Metalloproteinasen, Kollagensynthese und Kollagen Degradation	16
1.8. Matrix-Metalloproteinase-9 und seine Regulation	19
1.9. Ziel der Studie	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Versuchstiere	23
2.2. Zellkultur	23
2.2.1. Primärkultur neonataler kardialer Myozyten und Fibroblasten der Ratte	23
2.2.2. Primärkultur adulter muriner Splenozyten	24
2.3. <i>In-vitro</i> -Untersuchungen der Signaltransduktion und MMP-Expression in primären kardialen Zellen	25
2.4. Murines Modell des akuten Vorderwandinfarktes	26
2.5. Coxsackievirus B3 (CVB3)-Modell der subakuten Myokarditis	26
2.6. Molekularbiologische Untersuchungen	26
2.6.1. Extraktion von RNA	27
2.6.2. Synthese der cDNA	28
2.6.3. Real-time-PCR	29
2.6.4. Proteinextraktion und Westernblot-Analysen	30
2.6.5. Zymographische Analysen der MMP-Aktivität	32

2.6.6.	ELISA zum Nachweis von Kollagen-Spaltprodukten	33
2.7.	HE-Färbung und mikroskopische Analysen	34
2.8.	Statistische Analysen	34
2.9.	Verwendete Materialien und Geräte	35
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Adiponektin führt zu einer signifikant erhöhten Expression von enzymatisch aktivem MMP-9	39
3.2.	Die MMP-9-Expression ist nicht LPS-induziert	44
3.3.	AMPK und ERK1/2 sind Mediatoren der Adiponektin-Induzierten MMP-9-Expression in kardialen Fibroblasten	46
3.4.	Adiponektin führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der Kinasen AMPK und ERK1/2	48
3.5.	AMPK und ERK1/2 sind Regulatoren einer Inflammations-induzierten MMP-9-Aktivierung in kardialen Fibroblasten	50
3.6.	Adiponektin aktiviert MMP-9 in kardialen Fibroblasten nach pro-inflammatorischer Stimulation	54
3.7.	Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte MMP-9-Aktivität nach kardialer Schädigung im Rahmen der experimentellen subakuten CVB3-Myokarditis	55
3.8.	Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte MMP-9-Expression in der Milz im Rahmen der subakuten CVB3-Myokardits	57
3.9.	Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte kardiale Immunzellinfiltration im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis	58
3.10.	Adiponektin führt zu einer erhöhten Expression von MMP-9 im Herzen im Rahmen des Myokardinfarktes ohne Erreichen des Signifikanzniveaus	60
3.11.	Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte Konzentration von Kollagen-Spaltprodukten (ICTP) im Rahmen der CVB3-Myokarditis	61

4. Diskussion	63
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	63
4.2. Die Adiponektin-induzierte Hochregulation von MMP-9 über AMPK und ERK1/2	64
4.3. Adiponektin und MMP-9 in der viralen Myokarditis	65
4.4. Adiponektin und MMP-9 im Rahmen des Myokardinfarktes	73
4.5. Adiponektin und die Induktion von MMP-9 im Rahmen weiterer Erkrankungen	76
4.6. Limitationen der Studie	79
5. Zusammenfassung der Arbeit	82
6. Quellenverzeichnis	84
7. Eidesstattliche Versicherung	94
8. Anteilserklärung an erfolgen Publikationen	95
9. Publikationsliste	96
9.1. Artikel	96
9.2. Abstrakts	96
10. Lebenslauf	97
11. Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
APN	Adiponektin
AP-1	Activator protein 1
APPL-1	Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CaMKK2	Calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
c-Fos	Proto-oncogene c-Fos
c-Jun	Jun proto-oncogene
CF	Cardiac fibroblasts
CM	Cardiac myocytes
CTX-I	C-terminal crosslinked telopeptide of collagen type I
CVB3	Coxsackievirus B3
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCMi	Inflammatorische Kardiomyopathie
dP/dt_{\max}	Maximum der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
ECM	Extrazelluläre Matrix
Elk-1	Ets-like protein-1
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EMSA	Electrophoretic mobility shift assays
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FGF21	Fibroblast-growth-factor 21
GLUT4	Glukosetransporter 4

HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
ICTP	C-terminal telopeptide of collagen typ I
IFN β	Interferon-beta
IFN γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonisten
I κ B - α	Inhibitor of κ B- α
IP3	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KO	Knockout
LAD	Left anterior descending artery
LKB1	Liver Kinase B1
LPS	Lipopolysaccharid
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEDP	Linksventrikulären enddiastolischer Druck
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
MKK3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NOD-like receptor	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PDGF	Platet-derived growth factors
PEA 3	Polyoma enhancer aktivator 3
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisomal proliferator-activated receptor

RBP4	Retinol binding protein 4
ROS	Reaktiv oxygen species
SP-1	Specificity protein-1
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TAK1	Transforming growth factor- β -activated protein kinase 1
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Schematische Darstellung des Adiponektins (ADIPOQ)	S.11
Abb.2:	Unterschiedliche Formen Adiponektins	S.12
Abb.3:	Stufen der Kollagensynthese und des Kollagenabbaus	S.19
Abb.4:	APN induziert die MMP-9 mRNA Expression in neonatalen kardialen Fibroblasten (NRFB) der Ratte	S.40
Abb.5:	APN induziert die Expression von MMP-9 mRNA in neonatalen kardialen Myozyten der Ratte (NRVM)	S.41
Abb.6:	APN induziert die Expression von enzymatisch aktivem MMP-9 in kardialen neonatalen Fibroblasten und kardialen Myozyten	S.43
Abb.7:	APN induziert die Hochregulation der MMP-9-Expression in kardialen Fibroblasten unabhängig von einer Endotoxin-Kontamination	S.45
Abb.8:	APN induziert die Proteinexpression von MMP-9 in neonatalen kardialen Fibroblasten in der Zellkultur über eine Aktivierung von AMPK und ERK1/2	S.47
Abb.9:	Der Grad der Phosphorylierung von AMPK und ERK1/2 nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer mit APN zu	S.49
Abb.10:	AMPK fungiert als Regulator der inflammatorisch induzierten Aktivität von MMP-9	S.51
Abb.11:	ERK1/2 fungiert als Regulator einer inflammatorisch induzierten MMP-9-Aktivität	S.52
Abb.12:	APN verstärkt die MMP-9-Aktivierung nach proinflammatorischer Stimulation in neonatalen kardialen Fibroblasten	S.54
Abb.13:	APN-KO-Mäuse zeigen einer verminderte MMP-9-Aktivität im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis	S.56
Abb.14:	APN-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte Hochregulation von MMP-9 in der Milz im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis	S.58
Abb.15:	APN-Knockoutmäuse (APN-KO) zeigen einer verminderte kardiale Immunzell-Infiltration im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis	S.59
Abb.16:	MMP-9-Expression 4 Tage nach Myokardinfarkt (MI) in Wildtyp (WT)- und APN-KO-Mäusen (KO) im LV	S.61
Abb.17:	APN-KO-Mäuse zeigen einer Verminderte Konzentration von Kollagen I-Spaltprodukten im Vergleich zum WT im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis im Serum	S.62
Abb.18:	Adiponektin hemmt das profibrotische Remodeling der Extrazellulären Matrix durch eine Hochregulation von MMP-9	S.83

Abstract

Background: Adiponectin (APN) is a multifunctional immunomodulatory adipocytokine that inhibits left ventricular hypertrophy induced by pressure overload as well as hypertension and attenuates fibrosis after myocardial infarction. Coxsackievirus B3 (CVB3) causes severe myocarditis associated with intense extracellular matrix (ECM) remodeling, which might progress to dilated cardiomyopathy. Here, we investigated whether APN inhibits adverse ECM remodeling *in vitro* and in cardiac injury models by affecting matrix metalloproteinase (MMP) expression.

Methods: Cardiac cells were cultured *in vitro*. Cardiac injury was induced by CVB3 infection or myocardial infarction in APN-KO and WT mice. Gene expression and gelatinolytic activity/protein expression of MMPs was quantified by qRT-PCR and zymography, respectively. Activation status of protein kinases was determined by immunoblot. Collagen 1 turnover was assessed by the collagen split products C-terminal telopeptide of collagen type I (ICTP ELISA).

Results: In cultured cardiac myocytes (CM) and fibroblasts (CF) APN up-regulates MMP-9 gene and protein expression through activation of AMPK and ERK1/2 without affecting MMP-2, MMP-3 and MMP-13 expression levels. Both AMPK and ERK1/2 induced up-regulation of MMP-9 expression by pro-inflammatory stimuli in cardiac fibroblasts. Accordingly, APN further enhanced the up-regulation of MMP-9 expression triggered by TNF α , LPS and R-848 in CF. In line with these observations, cardiac MMP-9 activity was significantly attenuated in APN-KO mice in subacute CVB3 myocarditis at day 7 post-infection ($p < 0,01$) and decreased following myocardial infarction. Moreover, splenic MMP-9 expression was also diminished in APN-KO mice at day 7 post-infection correlating with diminished immune cell infiltration in hearts of APN-KO mice. Accordingly, cardiac collagen split product (ICTP) accumulation was significantly reduced in hearts of APN deficient mice in CVB3 myocarditis ($p < 0,05$) indicating attenuated collagen 1 turnover.

Conclusions: Our observations indicate that APN inhibits adverse cardiac remodeling following cardiac injury by inducing MMP-9 expression in resident cardiac and infiltrated immune cells. Enhanced cardiac MMP-9 activity results in increased cleavage of accumulating collagens and augmented ECM turnover that might inhibit cardiac fibrosis leading to improved cardiac function.

Abstract

Hintergrund: Adiponektin (APN) ist ein multifunktionelles immunmodulatorisches Adipozytokin, welches eine durch Druckbelastung und arterielle Hypertension induzierte linksventrikuläre Hypertrophie inhibiert und einem fibrotischen Umbau nach Myokardinfarkt entgegenwirkt. Das Coxsackievirus B3 (CVB3) führt zu schweren, mit einem ausgeprägten Remodeling der extrazellulären Matrix (ECM) assoziierten Myokarditiden, welche in eine dilatative Kardiomyopathie münden können. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir *in vitro* und an Modellen der kardialen Schädigung *in vivo*, ob APN durch die Regulation der Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) ein adverses ECM-Remodeling inhibieren kann.

Methoden: Kardiale Zellen wurden *in vitro* kultiviert. Eine kardiale Schädigung wurde durch CVB3-Infektion oder Myokardinfarkt in APN-KO- und WT-Mäusen induziert. Die Genexpression sowie die gelatinolytische Aktivität/Proteinexpression von MMPs wurde mittels qRT-PCR und mittels Zymographie gemessen. Die Bestimmung des Umsatzes von Kollagen 1 erfolgte mittels Bestimmung von Kollagenspaltprodukten (C-terminal telopeptide of collagen typ I – ICTP [ELISA]).

Ergebnisse: In kultivierten Kardiomyozyten (CM) und kardialen Fibroblasten (CF) führt APN zu einer AMPK- und ERK1/2- abhängigen Hochregulation von MMP-9-mRNA und Proteinexpression ohne Einfluss auf die Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-13. In kardialen Fibroblasten kontrolliert sowohl AMPK als auch ERK1/2 die Hochregulation der MMP-9-Expression durch proinflammatorische Stimuli. Entsprechend führte APN in kardialen Fibroblasten nach Triggerung durch TNF α , LPS und R-848 zu einer signifikant gesteigerten Hochregulation von MMP-9. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigte sich in APN-defizienten Mäusen eine signifikante Verminderung der kardialen MMP-9-Aktivität im Rahmen der CVB3-Myokarditis am Tag 7 post-infektionem ($p < 0,01$) sowie eine Inhibition nach Myokardinfarkt. Die MMP-9-Expression in der Milz war in APN-KO-Mäusen am Tag 7 nach CVB3 Infektion ebenfalls vermindert und korrelierte mit einer verminderten Immunzellinfiltration im Herzmuskel dieser Tiere. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich eine signifikante Verminderung der Kollagenspaltprodukte (ICTP-ELISA) im Herzmuskel bei APN-KO-Mäusen ($p < 0,05$) im Rahmen der CVB3-Myokarditis als Zeichen eines reduzierten Umsatzes von Kollagen Typ I.

Schlussfolgerung: Unsere Beobachtungen zeigen, dass APN adverses kardiales Remodeling als Folge einer kardialer Schädigung inhibiert. Dies geschieht durch eine Induktion der MMP-9-Expression in kardialen und infiltrierenden Immunzellen. Eine erhöhte kardiale MMP-9-Aktivität führt zu einer gesteigerten Spaltung von akkumulierendem Kollagen und einem gesteigerten Umsatz der extrazellulären Matrix (ECM), was zu einer verminderten Fibrose sowie damit einhergehenden verbesserten kardialen Funktion führen könnte.

1. Einleitung

1.1. Kardiales Remodeling und Herzinsuffizienz

Trotz Einführung neuer Therapien in die klinische Praxis zeigt die Herzinsuffizienz in den Industrieländern eine hohe Inzidenz. Die zugrundeliegenden zellulären Prozesse, welche im Rahmen verschiedener Erkrankungen zu einer Herzinsuffizienz führen und potenziell ein Ziel therapeutischer Interventionen sein könnten, sind weiterhin nur unvollständig untersucht bzw. verstanden. Einer dieser Prozesse ist das kardiale Remodeling (Cohn et al., 2000).

Unter kardialem Remodeling versteht man die Expression von Genen als Folge von abnormer Füllung oder Schädigung des Herzens, welche zu molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen führen, die in eine Änderung in Größe, Form und Funktion des Herzens münden. Der Prozess des Remodelings wird dabei durch hämodynamische Veränderungen, neurohumorale Aktivierung und viele weitere Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren führen zu einer Ischämie des kardialen Gewebes, einer Immunreaktion, vermehrtem Redox-Stress, Zellnekrose und Apoptose. Dabei stellt der Myozyt den entscheidenden Zelltyp in diesem Prozess dar (Cohn et al., 2000). Weitere beteiligte Zellen sind Fibroblasten (vermitteln Fibrose), glatte Gefäßmuskelzellen (vermitteln vaskuläre Steifigkeit), vaskuläre Endothelzellen (Endotheldysfunktion) und Leukozyten (vermitteln Inflammation) (Burchfield et al., 2013). Kardiales Remodeling kann als ein adaptiver (physiologischer) aber auch als ein maladaptiver (pathologischer) Prozess auftreten. Adaptives Remodeling bezeichnet eine kompensatorische Veränderung der Herzproportion und der Herzfunktion, wie sie beispielsweise bei Athleten bei intensivem körperlichen Training auftritt. Maladaptives Remodeling bezeichnet Umbauprozesse im Rahmen von Erkrankungen, unter denen das Herz seine Funktion letztlich nicht mehr aufrecht erhalten kann und sich das klinische Bild einer Herzinsuffizienz entwickelt. In diesem Falle spricht man auch von adversen kardialen Remodeling. Erkrankungen, welche zu pathologischem Remodeling führen, sind Myokardinfarkt, Drucküberladung bei Aortenklappenstenose und arterieller Hypertonie, entzündliche Herzmuskelerkrankungen wie die Myokarditis, die idiopathische dilatative Kardiomyopathie und die dilatative Kardiomyopathie als Folge einer Volumenüberladung wie bei Klappeninsuffizienzen (Cohn et al., 2000).

Die Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation der kardialen extrazellulären Matrix im Rahmen des kardialen Remodelings, speziell mit der Regulation der

Kollagendegradation. Die Steifigkeit der extrazellulären Matrix wird vor allem durch die Menge von Kollagen, den relativen Anteil von Kollagen Typ I und den Grad der Kollagen-Quervernetzung bestimmt. Der Anteil von Kollagen Typ I wird dabei über das Verhältnis von Synthese und Abbau bestimmt. Beim Abbau von Kollagen spielen vor allem MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) und deren Inhibitoren TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) eine entscheidende Rolle (Borlaug et al., 2011).

Insgesamt stellt das Remodeling einen bedeutenden Faktor im klinischen Verlauf der Herzinsuffizienz dar. Die Klärung der Regulation der unterschiedlichen Komponenten des Remodelings könnte entsprechend neue therapeutische Optionen für die Therapie der Herzinsuffizienz bedingen. Im Weiteren sollen zwei Schädigungsmechanismen des Myokards, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, im Hinblick auf das kardiale Remodeling kurz dargestellt werden.

1.2. Kardiales Remodeling im Rahmen des Myokardinfarktes

Der Myokardinfarkt stellt die häufigste Ursache einer HFrEF (Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionfraktion) dar (Dorn, 2009). Hier spielen die Prozesse wie Inflammation, Nekrose/Apoptose, Myozytenhypertrophie und -hyperplasie als auch die Fibrose eine zentrale Rolle. Der Verlust von Myokard führt zu einer Steigerung der kardialen Füllungsdrücke. Dies induziert einen Remodelingprozess, welcher sowohl das Grenzgebiet zur Infarktzone als auch das nichtinfarzierte Herzmuskelgewebe (remote zone) mit einschließt. Das Remodeling beginnt mit einer Kaskade aus biochemischen intrazellulären Signalprozessen, welche in der Formierung einer kollagenen Narbe, in kardiale Dilatation und Hypertrophie münden. Dabei wird im Rahmen eines Myokardinfarktes eine frühe Phase (innerhalb von 72 Stunden) von einer späten Phase (nach 72 Stunden) des Remodelings unterschieden (Sutton et al., 2000).

Die frühe Phase ist durch eine Expansion der Infarktzone charakterisiert (Sutton et al., 2000). Auf zellulär-molekularer Ebene führt der Untergang kardialer Myozyten durch Nekrose und Apoptose zu einer Freisetzung von intrazellulären Proteinen, welche eine inflammatorische Reaktion auslösen. Die Inflammation stellt dabei eine entscheidende Komponente für den Heilungsprozess dar. Neue Konzepte gehen allerdings davon aus, dass diese inflammatorischen Prozesse, welche den Heilungsprozess einleiten, in einigen Subgruppen nicht adäquat reguliert sind und so zu einem adversen kardialen Remodeling führen (Westman et al., 2016). Die inflammatorische Phase führt zunächst

zu einer „Säuberung“ des Gewebes von abgestorbenen Zellen und extrazellulärer Matrix, welche durch die angeborene Immunantwort (innate immunity) vermittelt wird. Nachfolgend wandern Immunzellen wie Mononukleäre Zellen und Makrophagen ein, welche Wachstumsfaktoren sezernieren, die wiederum mesenchymale reparative Zellen wie Myofibroblasten und vaskuläre Zellen aktivieren. Myofibroblasten sezernieren Proteine der extrazellulären Matrix einschließlich Kollagen. Das Ende dieser proliferativen Phase wird schließlich durch die Apoptose der Mehrzahl der hierbei beteiligten Zellen eingeleitet. Das Ergebnis ist die Ausbildung einer kollagenen Narbe (Frangogiannis, 2014).

Die Regulation dieser Inflammation im Infarktgebiet ist sehr komplex und erfolgt sowohl über die Aktivierung von bereits gewebsständigen Leukozyten, als auch über die Einwanderung weiterer inflammatorischer Zellen. Die Gewebeschädigung im Rahmen des Myokardinfarktes aktiviert das Komplementsystem und eine große Gruppe von Proteinen, welche als Signal einer stattgefundenen Gewebeschädigung fungieren, die sog. DAMPs (damage-associated molecular patterns). Diese DAMPs binden an transmembrane und zytosolische Rezeptoren, wobei eine Familie transmembraner Rezeptoren die Gruppe der TLRs (Toll-like receptors) darstellt. TLRs aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was zur Freisetzung der Proformen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 führt. Gleichzeitig bedingen DAMPs über die Bindung mit dem NOD-like-Rezeptor (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor) eine Aktivierung von zytosolischen Proteinkomplexen (Inflammasomen) und eine Aktivierung von Caspase-1, welche pro-IL-1 β und pro-IL-18 in die aktive Form überführt. Neben den DAMPs aktivieren auch ROS (Reaktiv oxygen species) proinflammatorische Signale und regulieren zusammen mit IL-1 β und Chemokinen die Einwanderung von Leukozyten (Westman et al., 2016). IL-1 β führt außerdem zu einer Aktivierung von Fibroblasten (Bujak et al., 2009). Die Folge der Aktivierung ist eine Freisetzung von Kollagen I, Kollagen III und Fibronectin in die extrazelluläre Matrix und die beginnende Narbenbildung (Spinale et al., 2007). IL-1 β reguliert neben der Produktion von Kollagen auch die Expression von MMPs und TIMPs in kardialen Fibroblasten (Bujak et al., 2009), auf deren Bedeutung im Späteren näher eingegangen werden soll.

Nach dieser Initialen inflammatorischen Phase greifen nun Mechanismen, welche diese eindämmen, wobei der gesamte Prozess in die reparative Phase übergeht. Dies ist verbunden mit einer Aktivierung mesenchymaler Zellen, welche die Integrität des

Gewebes wiederherstellen. Die Beendigung der inflammatorischen Phase ist hierfür entscheidend, da eine verminderte Suppression der Inflammation zu einer weiteren Schädigung über den eigentlichen Infarkt hinaus führen kann (Frangogiannis et al., 2014). Der Beginn der reparativen Phase ist charakterisiert durch eine Änderung der Zellkomposition der inflammatorischen Zellen im Infarktgebiet. Während natürliche Killerzellen in der frühen Phase proinflammatorische Effekte zeigen, scheinen sie in der späteren Phase ein adverses kardiales Remodeling zu hemmen. Außerdem kommt es zu einer Shift von proinflammatorischen M1-Makrophagen zu reparativen M2-Makrophagen. Mit diesen zellulären Veränderungen einhergehend erfolgt auch ein Wechsel zu antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10, welches durch M2-Makrophagen exprimiert wird und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α hemmt. Gleichzeitig kommt es zur Apoptose proinflammatorischer Leukozyten (Westman et al., 2016).

Die späte Phase des kardialen Remodelings im Rahmen des Myokardinfarktes ist neben dem fortgesetzten fibrotischen Umbau des Ventrikels durch eine Myozytenhypertrophie und Änderung der Ventrikelgeometrie gekennzeichnet (Sutton et al., 2000).

Aufgrund der wichtigen Rolle der inflammatorischen Reaktion im Rahmen des Myokardinfarktes kam der Suche nach Faktoren, welche einen positiven Einfluss auf den klinischen Verlauf nehmen, eine große Bedeutung zu. Dabei stieß man auf ein Protein aus der Gruppe der Adipokrine, welches später Adiponektin (APN) genannt wurde. APN werden verschiedene immunregulatorische Funktionen zugeschrieben. Beispielsweise hemmt APN die TLR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen der Maus (Robinson et al., 2011), hemmt die Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen Makrophagen (Folco et al., 2009), vermittelt die Polarisation von Makrophagen zu einem antiinflammatorischen M2-Phenotyp in der Maus (Ohashi et al., 2010), hat einen modulatorischen Einfluss auf die Funktion natürlicher Killerzellen (Wilk et al., 2013) und zeigt einen hemmenden Einfluss auf antigen-spezifische T-Zellen (Wilk et al., 2011). In diesem Zusammenhang zeigten Shibata et al., dass APN-KO-Mäuse eine signifikant gesteigerte LV-Dilatation, Myozytenhypertrophie sowie eine verminderte LV-Kontraktilität im Vergleich zum WT 4 Wochen nach Myokardinfarkt aufweisen. Weiterhin zeigte sich in APN-KO-Mäusen im nichtinfarzierten Gewebe (remote zone) eine gesteigerte apoptotische Aktivität und eine vermehrte interstitielle Fibrose. Die Transfektion von APN über ein Adenovirus führte in derselben Untersuchung zu einer

verminderten LV-Dilatation, einer verbesserten LV-Funktion sowie im nichtinfarzierten Myokard zu einer verminderten Myozytenhypertrophie, verminderten Apoptoserate und zu einer verminderten Fibrosierung (Shibata et al., 2007). Der Mechanismus, wie APN mit seinen bekannten antiinflammatorischen Eigenschaften zu einer Hemmung des kardialen Remodelings, insbesondere zu einer Verminderung der Fibrosierung führt, ist noch unzureichend untersucht.

Der Prozess der Fibrose als ein Teil des kardialen Remodelings ist durch eine vermehrte Akkumulation von Kollagen in der extrazellulären Matrix gekennzeichnet (Spinale et al., 2007). Ihr Ausmaß nach Myokardinfarkt korreliert eng mit der Prognose (Yan et al., 2006). Die Regulation des Umsatzes myokardialen Kollagens ist ein Zusammenspiel von Kollagensynthese und -abbau. Dabei stellen Fibroblasten die Hauptquelle des Kollagens dar (Eghbali et al., 1989) und spielen durch ihre Fähigkeit der Expression von MMPs eine zentrale Rolle in der Regulation des Abbaus der Extrazellulären Matrix (Cleutjens et al., 1995). Kelly et al. zeigten in ihrer Arbeit einen positiven Einfluss der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Dabei ergab sich ein zeitabhängiger Verlauf der Plasmakonzentration von MMP-9 mit einem frühen Peak und einem nachfolgenden Plateau. Hohe MMP-9-Spiegel während der Peakphase (0-12h) waren assoziiert mit einer höheren linksventrikulären systolischen Dysfunktion, wohingegen erhöhte Konzentrationen während der Plateauphase (nach 12h) durch eine verbesserte LV-Funktion und ein geringeres Remodeling mit einer verminderten LV-Dilatation (LVEDV) charakterisiert waren (Kelly et al., 2007).

Als Mediatoren der Aktivierung von MMPs konnten AMPK und ERK1/2, ein Mitglied der MAPK, identifiziert werden (Xie et al., 2004, Wang et al., 2012). MAPKs regulieren eine Vielzahl von zellulären Programmen, indem sie die Verbindung von extrazellulären Signalen mit intrazellulären Antworten herstellen. Alle eukaryoten Zellen enthalten MAPKs, welche Gene für Mitose, Metabolismus, Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellproliferation regulieren. In Säugetierzellen unterscheidet man 7 Gruppen. Zu den konventionellen MAPKs zählen ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), JNK1/2/3 (c-Jun amino (N)-terminal s 1/2/3), die p38-Isoformen (α , β , γ , δ) und ERK5 (extracellular signal-regulated kinase 5). Zu den sogenannten atypischen zählen ERK3/4, ERK7 und NLK (Nemo-like kinase). Zusammen regulieren MAPKs eine große Anzahl von Substraten, einschließlich einer Gruppe von Serin/Thyrosin-Kinasen, welche

unter dem Begriff der MAPKAPKs (MAPK-activated protein kinases zusammengefasst werden. (Cargnello et al., 2011).

Eine weitere Kinase, welche mit einer MMP-Regulation in Zusammenhang gebracht wird und eine Rolle im Rahmen des Myokardinfarktes spielt, ist AMPK. AMPK wird durch einen niedrigen intrazellulären Energiestatus mit einem erhöhten AMP/ATP-Verhältnis aktiviert, wie es unter anderem unter metabolischem Stress wie Hypoxie, Hungerzuständen und körperlicher Aktivität vorkommt (Ruderman et al., 2013). Dabei besteht AMPK aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. AMP und ADP binden an die γ -Untereinheit mit der Folge einer Konformationsänderung des Komplexes, wodurch eine Phosphorylierung an Thr¹⁷² im Bereich der Aktivierungsdomäne von AMPK vereinfacht wird. Unterschiedliche Kinasen wie LKB1 (liver kinase B1), CaMKK2 (calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2) und TAK1 (transforming growth factor- β -activated protein kinase-1) sind nun in der Lage, AMPK zu phosphorylieren, wobei während Myokardischämie die LKB1 die größte Rolle zuzukommen scheint. Während Ischämie nimmt AMPK Einfluss auf die Energiehomöostase durch eine gesteigerte Nutzung von Glukose. Dies geschieht über eine gesteigerte Glukoseaufnahme durch den Einbau von Glucosetransportern (GLUT4) in die Zellmembran sowie eine gesteigerte glykolytische ATP-Produktion. Des Weiteren erhöht AMPK die Aufnahme und Oxydation von Fettsäuren in Herzmuskelzellen und zytosolischen Fettsäuren in die Mitochondrien, vermittelt ein gesteigertes Zellüberleben von Kardiomyozyten durch Autophagie von geschädigten Zellorganellen und damit eine Verminderung von oxydativem Stress, und vermindert die Apoptoserate während Reperfusion (Qi et al., 2015). Zusätzlich zu diesen Wirkungen reguliert AMPK eine Reihe von weiteren physiologischen Vorgängen wie Zellwachstum und Proliferation, Mitochondrienfunktion und Faktoren wie Inflammation sowie oxidativer und endoplasmatischer Stress (Ruderman et al., 2013).

Insgesamt ist das kardiale Remodeling ein komplexer Vorgang, wobei die inflammatorische Reaktion einen entscheidenden Einfluss hat. Aufgrund der ähnlichen Einflüsse von APN und MMP-9 auf das kardiale Remodeling stellt sich die Frage, ob APN als Regulator von MMP-9 fungiert. Die Beantwortung dieser Frage soll Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

1.3. Kardiales Remodeling im Rahmen der CVB3-Myokarditis

Die Myokarditis ist nach WHO definiert als eine inflammatorische Erkrankung des Myokards, welche durch etablierte histologische, immunologische und immunhistologische Kriterien diagnostiziert wird. Histologische Kriterien sind dabei die Dallas-Kriterien, welche definiert sind als histologischer Nachweis von entzündlichen Infiltraten im Myokard verbunden mit nicht-ischämischen Abbau/Zerfall bzw. Nekrose von Myozyten. Ein weiterer im Zusammenhang der Myokarditis wichtiger Begriff ist der der inflammatorischen Kardiomyopathie. Diese wird nach WHO definiert als Myokarditis verbunden mit kardialer Dysfunktion. Die inflammatorische Kardiomyopathie im Rahmen der Pathogenese einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) schließt eine idiopathische, autoimmune und infektiöse Genese ein (Caforio et al., 2013).

Das Coxsackievirus B3 (CVB3), ein RNA-Virus der Familie der Picornaviren, ist der häufigste Auslöser einer infektiösen Myokarditis beim Menschen. Nach primärer Infektion des Respirations- oder Magen-Darm-Trakts mit dortiger Virusreplikation kommt es im Verlauf zu einer Virämie und Infektion weiterer Organsysteme. Da im Falle des Herzens Myozyten kaum direkten Anschluss an die Blutbahn haben, nehmen die kardialen mikrovasulären Endothelzellen eine schützende Barrierefunktion ein. Eine Virusinfektion der Myozyten erfolgt also entweder durch die Infektion des mikrovaskulären Endothels oder durch die Migration zirkulierender infizierter Zellen (Xie et al., 2012). Die Infektion der Myozyten durch das CVB3 erfolgt über Endozytose nach Bindung an den Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Yajima et al., 2009).

Klinisch kann die Myokarditis als eine subklinische Erkrankung, als eine akute fulminante Entzündung oder als eine chronische Myokarditis begleitet von einem fibrotischen Umbau und Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie, einer Herzinsuffizienz und Tod (Cheung et al., 2008, Jenke et al., 2014) verlaufen. Die kardiale Schädigung erfolgt durch 2 Mechanismen: zum einen durch direkte Schädigung hervorgerufen durch das Virus selbst, zum anderen durch eine sekundäre Schädigung durch die inflammatorische Reaktion sowie eine Autoimmunreaktion. Insgesamt wird der Verlauf in 3 Phasen eingeteilt: die akute, die subakute und die chronische Phase (Yajima et al., 2011).

Für die rasche Viruselimination und damit Vermeidung einer dauerhaften Schädigung ist die initiale inflammatorische Reaktion durch das angeborene Immunsystem (innate immune response) entscheidend. In dieser akuten Phase spielen TLR (Toll-like

receptors) eine wichtige Rolle. So erkennen TLR3, TLR4 und TLR7/8 das CVB3 und werden dadurch aktiviert. Außerdem kommt es zu erhöhten Konzentrationen der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF α , CXCL10. Quelle dieser Zytokine, welche in ihrer Konzentration noch vor den ersten Immunzellinfiltrationen steigen, sollen Zellen des Myokards wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und im Myokard regelmäßig ansässige Immunzellen sein (Yajima et al., 2011). Neben den genannten Zytokinen kommt es auch zu einer Hochregulation von Interferon Typ I und II mit der Folge einer Infiltration des Myokards mit aktivierten Makrophagen und natürlichen Killerzellen (Jenke et al., 2014). Die Erkennung des Virus durch Immunzellen führt zur Präsentation von viralen Antigenen durch MHC II (Yajima et al., 2011).

Die subakute Phase ist gekennzeichnet durch die Einwanderung von antigenspezifischen T- und B-Zellen (Jenke et al., 2014). CD-8-positive zytotoxische T-Zellen erkennen Virus-infizierte Kardiomyozyten und lysieren diese. Doch auch wenn die genannten Reaktionen wichtig für die Viruseliminationen sind, kann eine Überaktivierung der Immunreaktion über zytotoxische T-Zellen oder eine Autoimmunreaktion zu einer weiteren Schädigung des Myokards im Rahmen der chronischen Phase führen. Diese chronische Phase ist entsprechend gekennzeichnet durch eine Autoimmunreaktion gegen kardiale Proteine und/oder eine fortgesetzte Inflammation geringeren Grades (Yajima et al., 2011). Sie ist die Folge entweder einer unvollständigen Viruselimination im Sinne einer chronischen Myokarditis oder Folge einer Autoimmunreaktion als Antwort auf Zellschädigung hervorgerufen durch das Virus oder das Immunsystem selbst (Schultheiss et al., 2011). Durch Untergang kardialer Zellen und damit Freisetzung kardialer Antigene kommt es zur Präsentation dieser Antigene durch Antigenpräsentierende Zellen (Klingel et al., 1998). Die Folge ist die Bildung von Autoantikörpern gegen kardiale Strukturen wie α - und β -Myosinketten, mitochondriale Proteine und Membranrezeptoren (Caforio et al., 2002). Die folgende chronische Inflammation führt zu weiteren myozytären Schädigung bzw Lyse. Um diese strukturell zu ersetzen kommt es zum fibrotischen Umbau der extrazellulären Matrix sowie makroskopisch zur Dilatation der betroffenen Herzhöhlen im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie (Kania et al., 2009).

Auch im Rahmen der CVB3-Myokarditis sind Fibroblasten für die Fibrose im Rahmen des kardialen Remodelings verantwortlich. Den Ursprung dieser Fibroblasten bilden zum einen Fibroblasten, welche Teil des gesunden Myokards sind, zum anderen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in Form von CD133⁺ Stammzellen. Im Rahmen

der EAM (Experimentelle Autoimmunmyokarditis) differenzieren diese Zellen nach Stimulation mit M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) zu Makrophagen, durch eine Stimulation mit TGF- β zu Fibroblasten. Folglich führt eine Hemmung von TGF- β zu einer verminderten postinflammatorischen Fibrose bei der iDCM (Kania et al., 2009). Ein weiterer Faktor ist die Umwandlung von Endothelzellen in Fibroblasten (endothelial-to-mesenchymal transition). Xie et al. wiesen diese Umwandlung nach CVB3-Infektion nach und identifizierten gleichzeitig durch infizierte Endothelzellen exprimiertes TGF-1 β als regulatorisches Zytokin für diesen Vorgang (Xie et al., 2012). Ein weiteres wichtiges Zytokin im Rahmen der Fibrose bei der CVB3-Myokarditis ist Angiotensin II. Es stimuliert direkt die Proliferation von Fibroblasten und deren Funktion, aktiviert die Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix und führt zur Synthese von Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNF α (Pohlers et al., 2009).

Auch bei der viralen Myokarditis wird nach therapeutischen Wegen gesucht, das kardiale Remodeling und damit den klinischen Verlauf mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz positiv zu beeinflussen. Wie auch Remodeling im Rahmen des Myokardinfarktes stellt auch hier APN einen vielversprechenden Kandidaten dar. Eine Untersuchung der Myokarditis bei Mäusen ausgelöst durch das Encephalomyokarditisvirus ergab ein verbessertes Überleben bei Mäusen mit erhöhter kardialer APN-mRNA-Expression (Saegusa et al., 2007). In einer weiteren Studie mit 173 Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie (DCMi) konnte ein inhibitorischer Effekt von APN auf die chronische autoimmune Entzündungsreaktion sowie auf das kardiale Remodeling nachgewiesen werden (Bobbert et al., 2011). Im Follow-up nach 6 Monaten zeigten die Patienten mit DCMi und initial hohen APN-Konzentrationen eine im Vergleich zu der Patientengruppe mit initial niedrigen APN-Plasmakonzentrationen eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion und eine Verminderung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD). Gleichzeitig zeigte sich eine Verminderung der Anzahl antigenspezifischer T-Zellen sowie eine verminderte TNF α -vermittelte NF- κ B-Expression (Bobbert et al., 2011).

Die extrazelluläre Matrix wird reguliert durch eine Balance zwischen Synthese und Abbau. Dabei spielen hinsichtlich des Abbaus wie beim Remodeling im Rahmen eines Myokardinfarktes vor allem proteolytische Enzyme wie MMPs und TIMPs eine Rolle (Kania et al., 2009). Im Rahmen der CVB3-Myokarditis wiesen Cheung et al. am Tag 9 nach Infektion eine erhöhte Transkription von MMP-2, MMP-9 und MMP-12 sowie auch eine erhöhte Aktivität für MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie nach. Gleichzeitig

zeigte sich in derselben Untersuchung eine verminderte Expression der MMP-Inhibitoren TIMP-3 und TIMP-4 sowie in der Akutphase der Infektion eine vermehrte Ansammlung von Kollagen in der extrazellulären Matrix (Cheung et al., 2006). Die vermehrte Expression und Aktivität von MMP-9 wird sowohl durch proinflammatorische Zytokine, welche durch den Herzmuskel infiltrierende Immunzellen exprimiert werden, als auch durch virale und endogene Liganden des TLR (Toll-like receptor) getriggert (Marchant et al., 2009).

Zusammenfassend stellt sich auch im Rahmen der Myokarditis aufgrund bisheriger Veröffentlichungen die Frage nach einem Zusammenhang zwischen APN und der Expression von MMPs und ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4. Adiponektin

Die zwei bekannten Fettgewebstypen nehmen unterschiedliche physiologische Aufgaben wahr. Während braunes Fettgewebe über die Oxidation von Fettsäuren einen Beitrag zur Thermoregulation spielt, stellt weißes Fettgewebe einen Energiespeicher über die Speicherung von Triglyzeriden dar. Daneben besitzt das weiße Fettgewebe aber auch eine regulatorische Funktion. Weiße Adipozyten produzieren und sezernieren verschiedene Faktoren, darunter Faktoren mit inflammatorischer und antiinflammatorischer Wirkung, welche unter dem Begriff Adipokine zusammengefasst werden. Zu diesen gehören u.a. Adiponektin (APN), Leptin, TNF α , Osteoprotegerin, IL-6, IL-1, Resistin, Apelin, Visfatin, Monozytenchemotaktisches Protein-1 (MCP-1), Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und Retinol-bindendes Protein 4 (RBP4) (Fisman et al., 2014).

Erstmals beschrieben von Nakano et al. 1996 (Nakano et al., 1996) ist APN ein Adipokrin, welches in kleineren Konzentrationen auch in kardialen Myozyten und kardialen Fibroblasten (Skurk et al., 2008), sowie in mikrovaskulären Endothelzellen (Natarajan et al., 2008) und Skelettmuskelzellen (Simpson F, Whitehead JP, 2010) exprimiert wird. Im Serum macht APN ca 0,01 % der Gesamtproteinfraktion aus, wobei die Normkonzentration bei 3-30 μ g/ml liegt (Ouchi et al., 2006).

Das kodierende Gen trägt den Namen ADIPOQ, befindet sich auf Chromosom 3q27 (Ahasic et al., 2014) und besteht aus drei Exons und zwei Introns mit einer Gesamtgröße von 17 kb (Takahashi et al., 2000). Dabei sind mehrere Polymorphismen (SPNs = Single Nucleotide Polymorphisms) innerhalb des Gens bekannt (Oliveira et al.,

2011). Das Molekulargewicht des monomeren APNs beträgt 30 kDa. Im menschlichen Plasma liegt APN in 3 multimeren Formen vor: einer trimeren Form (low molecular weight (LMW)), einer hexameren Form (middle molecular weight (MMW)) und einer hochmolekularen Form bestehend aus 12 bis 18 Monomeren (high molecular weight (HMW)) (Bobbert et al., 2008). Eine weitere Form des APN, welches ca. 1 % des Gesamt-APN ausmacht, ist das globuläre APN, bestehend aus der globulären Untereinheit. Diese entsteht durch Spalten von monomeren APN durch die von Neutrophilen und Monozyten gebildete Elastase. Dabei ist globuläres APN nicht nur ein Abbauprodukt, sondern zeigt ebenfalls eine biologische Aktivität (Almer et al., 2011).

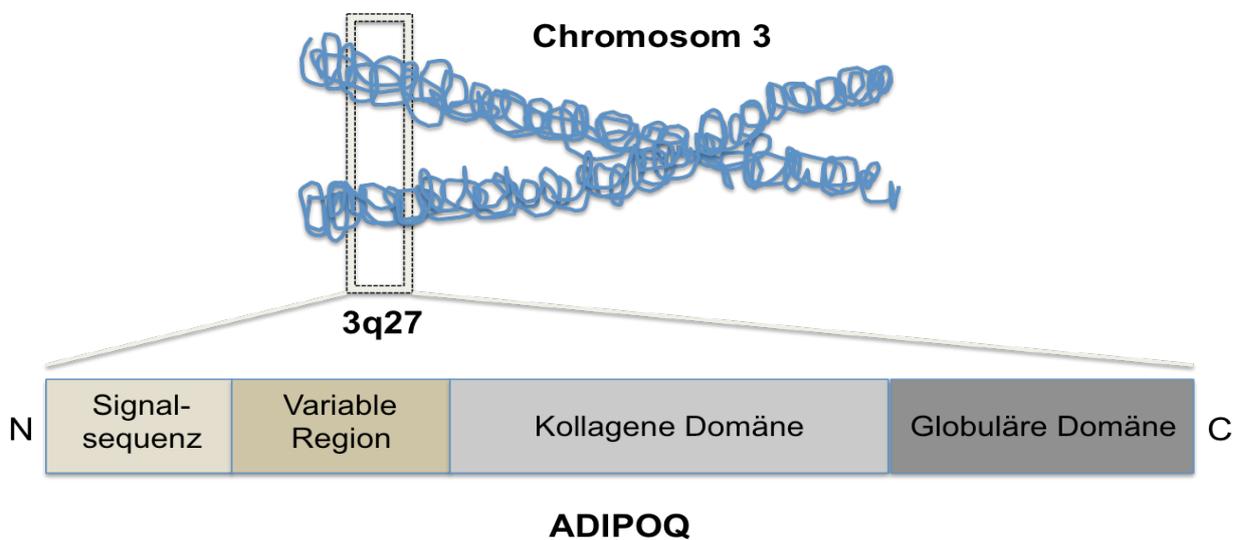


Abb.1: Schematische Darstellung des Adiponektins (ADIPOQ) (In Anlehnung an Kottyan et al., 2012)

Monomeres APN besteht aus insgesamt vier Domänen: einer N-Terminalen Signalsequenz, einer unter unterschiedlichen Spezies variablen Region, einer kollagenen Domäne und einer C-Terminalen globulären Domäne (Almer et al., 2011). Letztere zeigt Ähnlichkeit mit dem Complementfaktor C1q und soll für die Bindung APNs an seine Rezeptoren verantwortlich sein (Yamauchi T et al., 2003). Die Bildung der genannten Multimeren wird durch eine Reihe von posttranslationalen Veränderungen möglich. So führt eine Hydroxylierung in der kollagenen Domäne an Lysinresten über nichtkovalente apolare (hydrophobe) Bindung zur Formation der trimären Form (Wang et al., 2006). Aus zwei trimeren Formen bildet sich über Disulfidbrücken im Bereich der variablen Domäne die hexamere Form und letztlich über

weitere Disulfidbrücken zwischen den hexameren Formen das hochmolekulare APN (Richards et al., 2006).

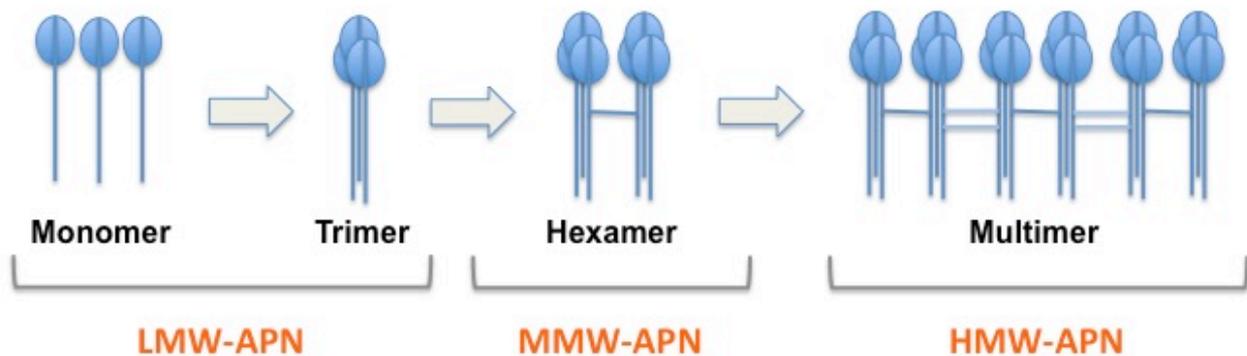


Abb.2: Unterschiedliche Formen Adiponektins: Aus drei Monomeren entsteht über Nichtkovalente Bindung die trimere Form. Aus zwei Trimeren entstehen über Disulfidbrücken die Hexamere Form. Aus 3 Hexameren entsteht ebenfalls über Disulfidbrücken die multimer Form (HMW-APN).

Die unterschiedlichen Isoformen haben unterschiedliche biologische Wirkungen. Im Rahmen des Diabetes Mellitus und kardiovaskulärer Erkrankungen scheinen aber nicht nur die absoluten Plasmakonzentrationen sondern auch das Konzentrationsverhältnis der unterschiedlichen Multimere eine Rolle zu spielen (Bobbert et al., 2008).

APN bindet an zwei Rezeptoren, Adiponektin-Rezeptor 1 und 2 (AdipoR1, AdipoR2). Beide Rezeptoren sind transmembrane Proteine mit 7 transmembranen Domänen, wobei sich der C-terminale Teil an der Außenseite der Zellmembran und der N-terminale Teil im Zellinneren befindet (Kadowaki et al., 2006). Auch wenn APN-Rezeptoren in nahezu allen Geweben vorkommen und prinzipiell sowohl globuläres APN als auch die nichtgespaltenen Formen binden können, ist die Konzentrationsverteilung der Rezeptoren wie auch ihre Affinität gegenüber den unterschiedlichen Formen von APN unterschiedlich. AdipoR1 wird vor allem auf Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Endothelzellen exprimiert und bindet vor allem globuläres APN. AdipoR2 bindet insbesondere die nicht-gespaltenen Formen (full length APN) und kommt in höheren Konzentrationen vor allem in Hepatozyten, in geringeren Konzentrationen auch im Hypothalamus und auf Endothelzellen des Gehirns vor (Almer et al., 2011). Auch Immunzellen wie B-Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen und Monozyten sind in der Lage, AdipoR1 und AdipoR2 zu exprimieren (Pang et al., 2008).

1.5. Regulation von Adiponektin

PPAR α (Peroxisomal proliferator-activated receptor α) und PPAR γ (Peroxisomal proliferator-activated receptor γ) sind Transkriptionsfaktoren und Mitglieder einer Familie nuklärer Transkriptionsfaktoren, welche den Glucose- und Lipidmetabolismus regulieren. Beispielsweise werden Fibrate als Liganden des PPAR α bei Fettstoffwechselstörungen therapeutisch eingesetzt. Liganden von PPAR γ , welcher vornehmlich in Fettgewebe vorkommt, sind langkettige ungesättigte Fettsäuren, oxidierte/nitrierte Fettsäuren oder die PPAR γ -Agonisten Thiazolidindione (Glitazone) (Malapaka et al., 2011). Eine Aktivierung von PPAR γ bewirkt eine Stimulation der Lipidspeicherung in Adipozyten und eine vermehrte Transkription von APN (Tsuchida et al., 2005). PPAR α kommt vornehmlich in der Leber, aber auch in Herz, Niere und Skelettmuskel vor und wird ebenfalls durch Fettsäuren aktiviert. (Yoon et al., 2006). PPAR α scheint eine direkte Bindungsstelle im FGF21-Promotor (Fibroblast growth factor 21-Promotor) zu besitzen (Long et al., 2011). FGF21 wiederum wird endokrin sezerniert und beeinflusst den Glucose- und Fettmetabolismus. In weißem Fettgewebe reguliert FGF21 APN über seinen wandständigen Rezeptor (FGFR1c/ β -Klotho). Dabei kommt es zu einer Aktivierung von PPAR γ mit der Folge einer Hochregulation der Expression und endokrinen Sekretion von APN (Ohta et al., 2014). Interessanterweise zeigten Chinetti et al. in menschlichen Makrophagen, dass PPAR γ und PPAR α auch eine erhöhte Konzentration des AdipoR2 induzieren können (Chinetti et al., 2004).

Eine weitere Regulation von APN in Adipozyten erfolgt über eine inflammatorische Reaktion. Im Fettgewebe führt eine chronisch übermäßige Nahrungsaufnahme nicht nur zu einer Hypertrophie von Adipozyten, sondern es kommt auch zu einer Einwanderung von Makrophagen (Robinson et al., 2011) und einer damit vergesellschafteten erhöhten Expression und Freisetzung von IL-6 und TNF α (Upadhyaya et al., 2014). Diese inflammatorischen Marker haben wiederum Einfluss auf die Expression und Sekretion von APN. So zeigten *In-vitro*-Studien eine verminderte APN-mRNA-Expression nach IL-6-Exposition (Fasshauer et al., 2003). Für TNF α konnte gezeigt werden, dass es dosisabhängig die Expression APN in Adipozyten inhibiert, indem es die Promotoraktivität des ADIPOQs hemmt. In der gleichen Untersuchung konnte dieser hemmende Effekt von TNF α durch die Gabe von Thiazolidindionen (PPAR γ -Agonisten; Glitazone) aufgehoben werden (Maeda et al., 2001). Umgekehrt ist APN in der Lage, die Expression und die Aktivität von TNF α zu hemmen (Ouchi et al., 2007).

Die Folge dieser genannten Regulationswege ist, dass APN in unterschiedlichen pathophysiologischen Zuständen, insbesondere solchen, welche mit einer inflammatorischen Reaktion in Verbindung stehen, herunterreguliert ist. Beispielsweise finden sich verminderte APN-Serumspiegel im Rahmen von mit Adipositas assoziierten Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ II, Insulinresistenz, arterieller Hypertonie, koronarer Herzerkrankung und akutem Koronarsyndrom (Ouchi et al., 2007).

1.6. Signaltransduktion von Adiponektin

Die Aktivierung der Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 reguliert unterschiedliche Signaltransduktionswege. Nach Bindung von APN an seine Rezeptoren kommt es zur Interaktion von APPL1 (Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1) mit der cytosolischen N-terminalen Domäne des AdipoR. Die Folge ist eine Translokation von LKB1 (Liver Kinase B1, Synonym: STK11 (Serine/Threonine Kinase 11)) vom Nucleus in das Zytosol und die Bindung an den AdipoR-APPL1-Komplex. Dies führt zu einer Aktivierung von AMPK (AMP-activated protein kinase) (Fang et al., 2010).

Die biologischen Wirkungen, welche APN über die Aktivierung von AMPK vermittelt, sind vielfältig und betreffen unterschiedliche Zelltypen. Hierzu gehören positive Einflüsse auf Insulinresistenz und kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, kardiale Hypertrophie, die Hemmung kardialer Apoptose im Rahmen eines Reperfusionsschadens und antiinflammatorische Wirkungen (Ouchi et al., 2007). In Skelettmuskelzellen kommt es nach Bindung von globulären APN an seine Rezeptoren und Aktivierung von AMPK zu einer Translokation des Glukosetransporters GLUT4 mit der Folge einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zellen (Ceddia et al., 2005). AMPK aktiviert hier außerdem den p38/MAPK-Signaltransduktionsweg, wobei schließlich PPAR α (Peroxisom proliferator-activator receptor α) aktiviert und die Fettsäureoxidation gesteigert wird (Yoon et al., 2006). Weitere Studien identifizierten p38/MAPK als einen wichtigen Mediator der zellulären Glukoseaufnahme in C2C12-Myotuben, aber lediglich über den AdipoR1 und ohne Beteiligung von AMPK. Beispielsweise konnten Xin et al. für C2C12-Myotuben zeigen, dass APPL-1 zusammen mit TAK1 (Transforming growth factor- β -activated kinase 1) an die N-terminale, intrazelluläre Domäne des AdipoR1 bindet und TAK1 phosphoryliert. Nachfolgend binden MKK3 (Mitogen-activated protein kinase kinase 3) und p38 MAPK (p38 mitogen-

activated protein kinase) an den Komplex und werden ebenfalls phosphoryliert und aktiviert (Xin et al., 2011).

Ein weiterer Effekt von APN, welcher über AMPK vermittelt wird, ist eine Verbesserung der Endothelfunktion und Angiogenese sowie antiinflammatorische Wirkungen im Rahmen der Atherosklerose. AMPK vermittelt hierbei eine Phosphorylierung von eNOS (endothelial nitric oxide synthase) in Endothelzellen, zum einen durch eine direkte Phosphorylierung, zum anderen über eine AMPK-PI3-Kinase-Akt-Kaskade. Die Folge ist eine erhöhte NO-Produktion. Des Weiteren zeigten die Autoren eine gesteigerte Angiogenese über die genannten Signaltransduktionswege (Ouchi et al., 2004).

Im Rahmen der Atherosklerose, welche durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet ist, hemmt APN die Transformation von Makrophagen in Schaumzellen und stimuliert gleichzeitig Makrophagen zur Produktion von antiinflammatorisch wirkenden IL-10. APN ist außerdem in der Lage, über eine Hemmung von TNF α die Monozytenadhäsion an Endothelzellen sowie die Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) und E-Selektin in Endothelzellen und damit die Akkumulation inflammatorischer Zellen im Gewebe zu hemmen. Des Weiteren kann APN die TLR (Toll-like receptor) vermittelte NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen (Robinson et al., 2011) sowie die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen inhibieren. Letzteres geschieht über einen cAMP/PKA-Transduktionsweg (Ouchi et al., 2000). Umgekehrt zeigten andere Untersuchungen aber eine Aktivierung von NF- κ B durch APN in Myozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten (Robinson et al., 2011).

Auch im Herzen ist AMPK als Vermittler von Wirkungen von APN identifiziert worden. So führt die lokale Expression von APN in Kardiomyozyten zu einer gesteigerten Glucose- und Fettsäureaufnahme über eine Phosphorylierung von AMPK (Piñeiro et al., 2005). Meng et al. zeigten in ihrer Untersuchung eine Hemmung kardialer Hypertrophie durch eine Aktivierung von AMPK über eine PPAR α - und ERK1/2-Aktivierung (Meng et al., 2011). Im Rahmen einer Drucküberlastung des Ventrikels kann bei APN-KO-Mäusen gleichzeitig eine gesteigerte konzentrische Hypertrophie nachgewiesen werden. In diesem Sinne zeigt eine Transfektion von APN über Adenoviren eine verminderte Hypertrophie im Rahmen von Drucküberlastung in APN-KO- und Wildtypmäusen (Shibata et al., 2004). Auch hier ist der Signaltransduktionsweg über AMPK von Bedeutung. Im Rahmen der Drucküberlastung kommt es im Herzen der

Ratte zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung von AMPK (Tian et al., 2001). Dabei zeigt eine weitere Veröffentlichung von Gélinas et al. eine Hemmung einer AT II-induzierten Hypertrophie in der Zellkultur durch Aktivierung von AMPK (Gélinas et al., 2018). Diese ist in APN-KO-Mäusen vermindert nachweisbar (Shibata et al., 2004). Die Aktivierung von AMPK durch APN soll im Herzen über die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 erfolgen (Fujioka et al., 2006). Zu ähnlichen Ergebnissen wie Shibata et al. kamen Fujita et al. hinsichtlich der kardialen Fibrose. Hier zeigte sich eine Verminderung einer AT-II-induzierten gesteigerten kardialen Fibrose bei APN-KO-Mäusen unter adenovirusinduzierter APN-Überexpression. Dieser antifibrotische Effekt war dabei bei PPAR α -KO-Mäusen nicht zu beobachten. Gleichzeitig wiesen die Autoren eine Aktivierung von PPAR α in kardialen Fibroblasten durch APN nach, welche durch Behandlung mit Compound C, einem Inhibitor von AMPK, nicht nachweisbar war (Fujita et al., 2008).

Zusammenfassend handelt es sich bei APN um ein multifunktionelles Protein, welches über verschiedene Rezeptoren unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse zelltypspezifisch aktivieren kann.

1.7. Matrix-Metalloproteinasen, Kollagensynthese und Kollagendegradation

Die extrazelluläre Matrix ist eine komplexe Struktur, welche Signal- und Strukturproteine, Proteasen und unterschiedliche Zelltypen beinhaltet und eine fundamentale Rolle im Prozess des myokardialen Remodelings spielt. Eine Gruppe von Proteinase, welche am Abbau dieser Komponenten beteiligt sind, stellen die Matrix-Metalloproteinasen dar. Im Herzen ist die Expression von 8 verschiedenen MMPs bekannt die in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: Kollagenasen (MMP-1, MMP-13, MMP-8), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-7) und Membrane-type 1-MMP (MMP-14) (Spinale et al., 2007).

MMPs sind proteolytisch wirkende extrazelluläre Proteine, wobei einige Untersuchungen darauf hinweisen, dass MMP-1, MMP-2 und MMP-11 auch intrazellulär aktiv sind. Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten: einem Propeptid bestehend aus über 80 Aminosäuren, einer katalytischen Untereinheit mit über 170 Aminosäuren welche eine Zink-bindende Sequenz (HEXGHXXGXXH) enthält, einem Verbindungspeptid („hinge region“) und einer Hämopexin-Domäne bestehend aus über

200 Aminosäuren (Ausnahmen sind MMP-7, MMP-26 und MMP-23, welche kein Verbindungsprotein und keine Hämopepin-Domäne enthalten) (Nagase et al., 2006). MMPs werden zunächst als Proenzyme synthetisiert und durch die Abspaltung des N-terminales Propeptids aktiviert (Spinale et al., 2007). Das Propeptid enthält ein sogenanntes „cystein switch“-Motiv mit der Sequenz PRCGXPD, welches eine Bindung von Wasser an das Zink-Atom in der Katalytischen Domäne verhindert und so das Pro-MMP in seiner inaktiven Form hält (Nagase et al., 2006).

Die MMP-Aktivität wird durch zwei Inhibitoren reguliert: α 2-Mikroglobulin und TIMPs. Die Regulation über α 2-Mikroglobulin erfolgt derart, dass MMPs im α 2-Mikroglobulinmolekül eingeschlossen werden. Der Gesamte Komplex wird dann über den Rezeptor (LDL-related protein 1) via Endozytose in die Zelle aufgenommen und abgebaut. Der zweite Weg der Inaktivierung von MMPs erfolgt über TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) (Nagase et al., 2006). Bisher sind 4 dieser TIMPs bekannt: TIMP-1/-2/-3/-4 (Spinale et al., 2007). Hier erfolgt die Inaktivierung über eine Chelatbildung des Zink-Atoms der katalytischen Domäne der MMPs mit Aminosäureresten der TIMPs, sodass ein Wassermolekül von seiner Bindung an das Zink-Atom verdrängt wird und die MMPs ihre katalytische Aktivität verlieren (Nagase et al., 2006).

Bei der Fibrose im Rahmen des kardialen Remodelings ist Kollagen Typ I von entscheidender Bedeutung (López et al., 2010). Die Stufen der Kollagen-I-Synthese und des Kollagenabbaus sind vereinfacht in Abbildung 3 dargestellt. Im Prozess der Synthese spielen Fibroblasten die entscheidende Rolle. Ein weiterer entscheidender Zelltyp im Rahmen der Fibrose ist der Myofibroblast, welcher nicht im gesunden Myokard vorkommt, sondern sich im Rahmen von myokardialer Schädigung aus Fibroblasten differenziert und eine Reihe von regulatorischen Zytokinen produziert. Die Folge ist ein Verlust der empfindlichen Regulation der Menge an extrazellulärer Matrix mit Verstärktem Anfall von Kollagen und einem Verlust der Kollagendegradation durch MMPs (Baum J and Duffy HS, 2011). Neben dieser Differenzierung zu Myofibroblasten reagieren Fibroblasten auf unterschiedliche Stimuli wie Angiotensin II (Brilla et al., 1997), TGF- β , Aldosteron (Sun et al., 1994) sowie auf inflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TGF- β 1 und TGF- β 3, freigesetzt durch Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten (Siwik et al., 2000, Burchfield et al., 2013). Die Stimulation führt zu einer erhöhten Synthese von Prokollagen Typ I (und III) sowie zur Synthese von Enzymen, welche diese weiter modifizieren (López et al., 2010). Hierzu gehört die Prokollagen C-

Proteinase (PCP) und Prokollagen N-Proteinase, welche die C- bzw. die N-terminalen Propeptide des fibrillären Prokollagens abspalten (Hintze et al., 2006; Wang et al., 2006). Die von Fibroblasten freigesetzte Lysyloxidase (LOX) katalysiert die Desaminierung von Lysylresten des entstandenen Kollagenmoleküls, wodurch die Quervernetzung des Kollagens ermöglicht wird (Kagan et al., 2003).

Der Abbau von Kollagen Typ I wird durch Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 eingeleitet. Dabei spalten MMP-1 und MMP13 bevorzugt Kollagen I und III. Neben den „klassischen“ Kollagenasen konnten auch für MMP-2 und später auch MMP-9 eine kollagenolytische Aktivität gegenüber nativen Kollagen typ I und III nachgewiesen werden (Bigg et al., 2007). Die Spaltung der Tripelhelixstruktur des Kollagen I erfolgt in $\frac{1}{4}$ (ICTP (C-terminal telopeptide of collagen typ I)) und $\frac{3}{4}$ -Fragmente (Herman et al., 2001, Garnero et al., 2003), wobei ICTP in die Blutbahn freigesetzt wird, während das N-terminale $\frac{3}{4}$ -Fragment in der Zelle verbleibt und spontan in nicht-helikale Gelatin-Derivate denaturiert. Diese werden letztlich vollständig durch die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und MMP-9 abgebaut (Villareal, 2004). Weitere Enzyme, welche im Abbau von Kollagen I eingebunden sind, sind Katherine, wobei durch deren Spaltung ein anderes Spaltprodukt, das CTX-I (C-terminal crosslinked telopeptide of collagen type I) entsteht (Stansfield et al., 2014). Beide Spaltprodukte stehen im Focus als Verwendung als Biomarker für einen vermehrten Umsatz extrazellulärer Matrix im Rahmen der Herzinsuffizienz und des kardialen Remodelings (Spinale et al., 2013).

AT II, Aldosteron, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TGF- β 1, TGF- β 3

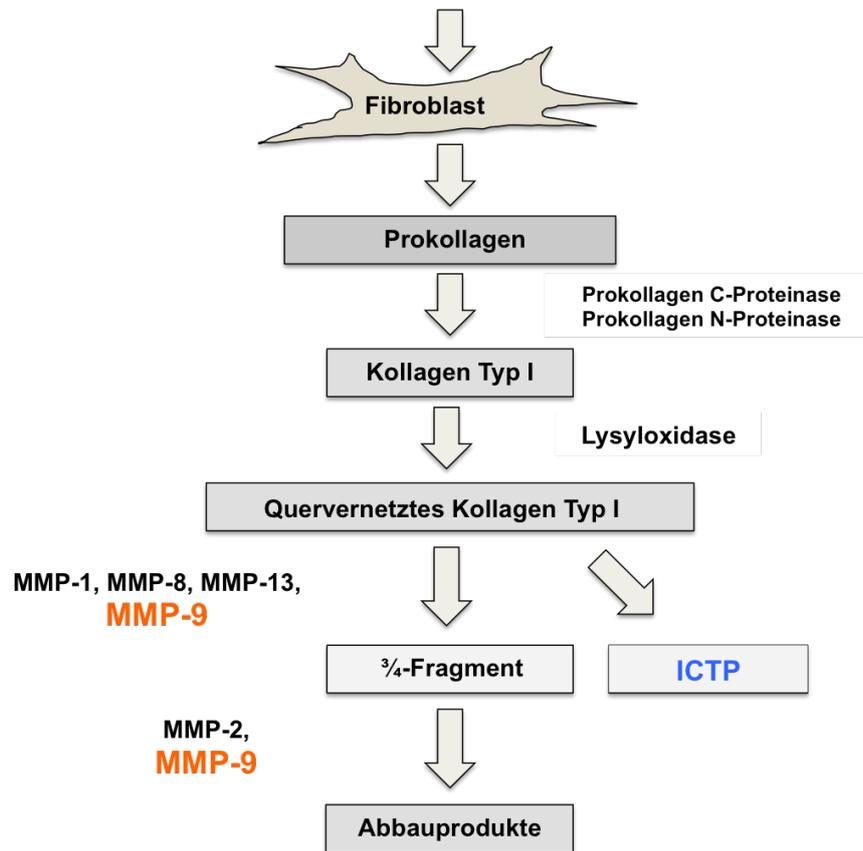


Abb.3: Stufen der Kollagensynthese und des Kollagenabbaus. TNF- α (Tumor necrosis faktor- α), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 (Interleukin-6), IFN- γ (Interferon- γ), TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1), TGF- β 3 (Transforming growth factor- β 3), ICTP (C-terminal telopeptide of collagen typ I).

1.8. Matrix-Metalloproteinase-9 und seine Regulation

Das Gen für MMP-9 (Synonym: Gelatinase B) befindet sich im Genlocus 20q11.2-q13.1 (Visse et al., 2003). Wie alle MMPs spielt MMP-9 im Abbau der in der extrazellulären Matrix befindlichen Struktur- und Signalproteine eine entscheidende Rolle (Spinale et al., 2007). Als Substrate für MMP-9 dienen Kollagen I, III, IV und V, Fibronectin, Elastin und das nach Spaltung durch Kollagenasen entstandene denaturierte fibrilläre Kollagen I (Bigg et al., 2007, Romanic et al., 2001). MMP-9 kann von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden. Hierzu gehören kardiale Myozyten, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und neutrophile Granulozyten (Coker et al., 2001). Weitere MMP-9 exprimierende Zellen sind Immunzellen wie TH1- und TH2-Lymphozyten (Oviedo-Orta et al., 2008), Neutrophile Granulozyten (Ardi et al., 2007), Endothelzellen (Wang et al., 2006), sowie im Herzen kardiale Fibroblasten (Mias et al., 2009).

Bekannte Transkriptionsfaktoren, die die MMP-9- Expression regulieren, sind AP-1 (Activator protein 1) und NF- κ B (Moon et al., 2004). AP-1 ist ein heterodimer bestehend aus c-Jun und c-Fos, wobei die Dimerisierung dieser beiden Proteine eine DNA-bindende Domäne bildet (Steinmüller et al., 2001). Die Synthese von c-Fos wird induziert durch phosphoryliertes Elk-1. Diese Phosphorylierung wiederum erfolgt über ERK1/2 (Karin et al., 1995). In der Zellkultur von MVEC (microvascular endothelial cells) wiesen Moshal et al. eine Regulation von MMP-9 durch ERK1/2 nach Inkubation mit Homozystein nach (Moshal et al., 2006). In adulten kardialen Fibroblasten zeigten Xie et al., dass eine Hemmung von ERK1/2 und JNK zu einer Hemmung der IL-1 β induzierten erhöhten Expression von MMP-9 führt. Auch die PKC (Proteinase C) spielt eine Rolle in der Expression und Aktivität von MMP-9. Eine Hemmung der PKC führte in derselben Studie zu einer Hemmung der Aktivität von ERK1/2 und JNK und zu einer Hemmung der Expression und Aktivität von MMP-9 (Xie et al., 2004). In aortalen glatten Muskelzellen zeigten Moon et al. eine gesteigerte MMP-9-Expression und Promotoraktivität nach TNF α - Stimulation über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Gleichzeitig führte eine Hemmung von ERK1/2 zu einer signifikanten Herunterregulation der TNF α -induzierten MMP-9-Expression (Moon et al., 2004). Den gleichen Zusammenhang zwischen TNF α , ERK1/2 und MMP-9-Expression konnte auch durch eine bereits zuvor veröffentlichte Untersuchung in glatten Muskelzellen der Arteria Karotis der Ratte nachgewiesen werden, ebenfalls mit einer Herunterregulierung der TNF α -induzierten MMP-9-Expression nach Hemmung von ERK1/2 (Cho et al., 2000). Die Bindung von AP-1 an den MMP-9-Promotor wurde in mehreren Studien als für eine Induktion von MMP-9 als absolut notwendig herausgearbeitet. Am distalen Promotor existiert eine weitere Bindungsstelle für AP-1 sowie auch für NF- κ B. In Fibroblasten haben diese Bindungsstellen einen synergistischen Effekt auf eine kombinierte Stimulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren: Bond et al. zeigten in der Zellkultur mit Fibroblasten einen geringen Effekt sowohl einer alleinigen Stimulation mit PDGF (Plated derived growth factor) oder bFGF (basic fibroblast growth factor) als auch einer alleinigen Stimulation mit TNF α und IL-1 auf die Sekretion von MMP-9. Dagegen führte eine Kombination aus IL-1 α oder TNF α mit PDGF sowie die Kombination aus bFGF mit IL-1 α oder TNF α zu einem synergistischen Effekt mit überproportional höheren MMP-9-Konzentrationen im Kulturmedium (Bond et al., 1998). Hieraus sowie aus Daten von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) schlossen die Autoren, dass die Bindung von NF- κ B essentiell für eine suffiziente Expression von

MMP-9 nach Stimulation mit den genannten Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist. Andere Transkriptionsfaktoren, welche ebenfalls synergistisch mit der AP-1-Bindungsstelle des MMP-9-Promotors zusammenwirken, sind SP-1 (Specificity protein-1) und PEA 3 (Polyoma enhancer aktivator 3). Des Weiteren sind auch Micro-RNAs als Regulatoren der MMP-9-Expression beschrieben worden (Dixon et al., 2015).

Wie bereits zuvor beschrieben reguliert AMPK eine Reihe von physiologischen Vorgängen wie Zellwachstum und Proliferation, Mitochondrienfunktion, Inflammation und oxidativen Stress (Ruderman et al., 2013). Morizane et al. beschrieben eine erhöhte MMP-9 Expression in AMPK α 1/ AMPK α 2-KO-Mäusen verbunden mit einer gesteigerten Lokalisation von NF- κ B im Zellkern in embryonalen Fibroblasten. Eine Aktivierung von AMPK führte zu einer verminderten Expression von MMP-9 in WT-Mäusen (Morizane et al., 2011). Im Modell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte führte eine Aktivierung von AMPK zu einer Verminderung von ECM-Remodeling der Pulmonalarterien mit einer verminderten Aktivität von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 (Li et al., 2016). Interessanterweise zeigten Zhang et al. in ihrer Untersuchung auf intrazellulärer Ebene eine Spaltung und damit Inaktivierung von AMPK α in Leukozyten der Maus nach LPS-Stimulation. Gleichzeitig führte eine Aktivierung von AMPK auch in diesem Modell zu einer verminderten Expression von MMP-9. Diese Beobachtungen weisen auf einen negativen Feedback-Mechanismus von AMPK und MMP-9 hin (Zhang et al., 2015).

Zusammenfassend wird MMP-9 durch unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege reguliert, unter anderem über ERK1/2 und AMPK. Als Gelatinase mit erweiterter Substratspezifität kann MMP-9 auch Kollagen I abbauen. Die entstehenden Spaltprodukte (ICTP) können im Serum nachgewiesen werden.

1.9. Ziel der Studie

Adiponektin (APN) ist ein multifunktionelles immunmodulatorisches Adipozytokin, welches ein kardiales Remodeling in unterschiedlichen Modellen der kardialen Schädigung (z.B., transaortales Banding, akuter Myokardinfarkt, Myokarditis) inhibiert. MMPs sind für den Umbau der extrazellulären Matrix, in der im Rahmen des kardialen Remodeling Kollagen akkumuliert, verantwortlich.

Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, ob

1. Adiponektin zu einer vermehrten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) *in vitro* in kardialen Zellen (kardialen Myozyten, kardialen Fibroblasten und Immunzellen) führt.
2. Eine veränderte Expression dieser MMPs auf RNA- und Proteinebene gleichzeitig mit einer gesteigerten Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen *in vitro* verbunden ist.
3. Die intrazellulären Signal- und Transduktionsmechanismen einer MMP- Induktion durch Adiponektin im Hinblick auf eine Immunaktivierung zu charakterisieren.
4. Den Einfluss von Adiponektin auf die Expression und Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen im Rahmen des kardialen Remodelings bei einer CVB3-Myokarditis sowie nach Myokardinfarkt in einem *In-vivo*-Mausmodell zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollen die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse in *In-vivo*-Modellen der kardialen Schädigung bestätigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Ausgangspunkt für die vorliegenden Experimente waren neonatale Wistar Unilever Ratten, zur Verfügung gestellt von den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité Berlin. Des Weiteren erfolgten Experimente mit APN-Knockout Mäusen und C57BL/6 (C57 Black 6) Wildtypmäusen, zur Verfügung gestellt von Jackson Laboratories. Die Entwicklung der APN-KO-Mäuse erfolgte durch die Herstellung eines Vectors mit dem Ersatz von Exon 2 des Adipoq-Gens mit einer PGK-neo-cassette (Phosphoglycerate kinase I). Danach wurden die Vektoren in embryonale Stammzellen mittels Elektroporation eingebracht und schließlich in Blastozysten injiziert. Die so entstandenen Chimären wurden mehrfach mit Wildtypmäusen gekreuzt, bis heterozygote und schließlich homozygote Tiere entstanden.

Die Vorliegenden Untersuchungen wurden durch Institutional Ethics Committee geprüft und genehmigt. Sie entsprechen den Grundsätzen der Declaration of Helsinki (6th revision, veröffentlicht 2008). Die Tierhaltung erfolgte im Rahmen aller Experimente bei konstanter Raumtemperatur von 22°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 40-50 %, einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Primärkultur neonataler kardialer Myozyten und Fibroblasten der Ratte

Die Anlage der Zellkulturen neonataler Rattenfibroblasten- und myozyten erfolgte aus isolierten Herzen 1-3 Tage alter Wistar Unilever Ratten. Die Herzen wurden entsprechend nach Eröffnung des Brustkorbs entnommen, mit einer Schere grob zerkleinert und für 18 h bei 4°C in kalter HBSS (Hänks Buffered Salt Solution, Gibco) mit 600 µg/ml Trypsin (Gibco) inkubiert. Anschließend erfolgte der Verdau in 5 ml HBSS versetzt mit Collagenase Typ II (Worthington) bei einer Konzentration von 1 mg/ml. Unter starkem Rühren bei einer Temperatur von 37°C erfolgte ca. alle 10 min der Austausch mit Auffangen der entstehenden Zelllösung und Zugabe frischer HBSS/Collagenase Typ II-Lösung zu den verbleibenden Gewebsteilen, bis sich diese vollständig aufgelöst hatten. Die entstandene Zelllösung wurde gefiltert (Porengröße 100 µm) und anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zentrifugat wurde in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco) versetzt mit 20

% FBS (Fetal Bovine Serum, PAA) über 90 Minuten bei 37°C in Zellkulturflaschen inkubiert. Hierbei kommt es zur Sedimentation der nicht-Myozytenfraktion. Anschließend erfolgte die Anlage der Fibroblasten-Zellkultur unter Verwendung des Sediments und die Anlage der Myozytenkultur unter der Verwendung des Überstands. Das Kulturmedium für die Fibroblasten-Zellkultur bestand aus DMEM versetzt mit 20 % FBS und 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin, Biochrom). Die Zellen wurden in Zellkulturgefäße bis zur Konfluenz gezüchtet und in einer Verteilung von 1:3 passagiert. Die morphologische Charakterisierung ergab einen Fibroblastenanteil von > 95 % nach der ersten Passage. Alle Experimente mit kardialen Fibroblasten wurden nach der ersten oder zweiten Passage durchgeführt.

Die Anlage der Myozytenkultur erfolgte mit dem Überstand aus dem oben genannten Schritt. Dieser wurde mit 300 g für 5 min zentrifugiert und in DMEM versetzt mit 10 % FBS, 10 % Pferdeserum (PAA) und 1 % P/S in Zellkulturgefäßen (BD Falcon) kultiviert. Mit diesem Protokoll wurden Zellpopulationen bestehend aus 90-95 % kardialen Myozyten gezüchtet.

2.2.2. Primärkultur adulter muriner Splenozyten

Quelle des Materials waren 6-8 Wochen alte adulte APN-KO-Mäuse und WT-Mäuse (C57BL/6). Die Milz der Tiere wurde entnommen und in kalter PBS-Lösung (Phosphate buffered saline, PAA) auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Milz vorsichtig durch ein Zellsieb mit der Porengröße 100 µm in PBS-Lösung gedrückt. Zur weiteren Zellseparation erfolgte die Spülung der Zelllösung durch eine Nadel mit aufgesetzter Spritze. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert. Zum Lysieren verbliebener Erythrozyten erfolgte die Zugabe von destilliertem Wasser auf das Zellpellet für 30 s. Abschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, PAA) versetzt mit 10 % FBS und 1 % P/S in entsprechenden Zellkulturgefäßen.

2.3. *In-vitro*-Untersuchungen der Signaltransduktion und MMP-Expression in primären kardialen Zellen

Zunächst erfolgte die Inkubation der neonatalen kardialen Fibroblasten und neonatalen kardialen Myozyten der Ratte mit 20 µg/ml rekombinantem APN (R&D Systems) für 24 h in der Zellkultur und Bestimmung der MMP-2-, MMP-3-, MMP-9- und MMP-13-Expression mittels PCR. Als nächstes wurden die Zellkulturen neonataler Fibroblasten und neonataler Myozyten mit 20 µg/ml rekombinantem APN für 24 h inkubiert und die MMP-9 und MMP-2-Aktivität im Kulturmedium mittels Zymographie bestimmt. Außerdem erfolgte eine Inkubation kardialer Fibroblasten mit unbehandeltem und Hitzebehandeltem (95°C über 15min) APN sowie LPS (1 µg/ml, Enzo Life Science) und hitzebehandeltem LPS (1 µg/ml, 95°C über 15 min) für 24 h und nachfolgend die Messung der MMP-9-Aktivität mittels Zymographie. Kontrollen neonataler kardialer Fibroblasten und Kardiomyozyten wurden mit 20 µg/ml BSA (bovine serum albumin, Roth) anstelle des APN behandelt.

Zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion (AMPK, ERK1/2, PKC und JNK) wurden neonatale kardiale Fibroblasten in der Zellkultur mit dem ERK1/2 – Inhibitor PD098059 (20 µmol/l), JNK-Inhibitor SP600125 (20 µmol/l), PKC-Inhibitor Cherylerthrine (5 µmol/l) und AMPK-Inhibitor Compound C (20 µmol/l) über 1 Stunde inkubiert. Daraufhin erfolgte die Stimulation in frischem Kulturmedium versetzt mit rekombinantem humanem APN (20 µg/ml) über 24 h. Danach erfolgte die Messung der MMP-9-Aktivität mittels Zymographie aus dem Kulturmedium.

Dasselbe Vorgehen wurde zur zeitabhängigen Messung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 und AMPK in neonatalen Fibroblasten nach Inkubation mit APN in der Zellkultur über 5, 15, 30 und 60 min angewandt. Die dabei verwendete Konzentration von APN betrug ebenfalls 20 µg/ml. Die Messung von phosphorylierten und nichtphosphorylierten ERK1/2 bzw. AMPK erfolgte mittels Westernblot.

Um zu untersuchen, ob AMPK und ERK1/2 die inflammationsinduzierte Hochregulation von MMP-9 in kardialen Fibroblasten vermitteln, erfolgte eine Inkubation der neonatalen Fibroblasten in der Zellkultur mit dem AMPK-Inhibitor Compound C (20 µmol/L) und dem ERK1/2 –Inhibitor PD098059 (20 µmol/l), jeweils über 1 h, sowie anschließend die Inkubation mit dem Zytokin TNFα (10 ng/ml) und den TLR-Liganden LPS (1 µg/ml) und R-848 (5 µg/ml), jeweils über 24 h. Die MMP-9-Aktivität im Kulturmedium wurde nachfolgend mittels Zymographie gemessen.

Um zu untersuchen, ob auch APN einen Einfluss auf die Expression von MMP-9 nach proinflammatorischer Stimulation hat, erfolgte die Inkubation neonataler kardialer Fibroblasten mit TNF α (10 ng/ml), LPS (1 μ g/ml) und R-848 (5 μ g/ml) über 18 h nach Stimulation mit rekombinanten APN (20 μ g/ml) über 6 h. Die Messung der MMP-9-Aktivität im Kulturmedium erfolgte mittels Zymographie.

2.4. Murines Modell des akuten Vorderwandinfarktes

Um das Remodeling nach ischämischer Schädigung des Herzgewebes zu untersuchen, wurde ein *In-vivo*-Modell des Myokardinfarktes in C57BL/6- Wildtyp und APN-Nullmäusen (Jackson Laboratories) angewandt. Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte durch operative Ligatur der LAD (Lutgens et al, 1999). Nach Einleitung einer Anästhesie mittels Isofluran 2 %, der Intubation mittels 22G-Braunüle und der Beatmung mit Isofluran 2 % zur Narkoseaufrechterhaltung erfolgte die Thorakotomie zwischen der 2./3. Rippe links. Die Ligatur der LAD fand im 2-3 mm Abstand des Abgangs aus dem Hauptstamm mittels 7-0 Etibond-Faden statt. Abschließend erfolgte eine Überblähung der Lungen mit Hilfe des Beatmungsgerätes um Restluft aus dem Thoraxraum zu eliminieren, sowie abschließend der Verschluss des Brustkorbs mittels Naht. Die Operationen der Sham-Tiere geschah nach demselben Protokoll einschließlich Thorakotomie, definitionsgemäß entsprechend ohne Ligatur der LAD. Postoperativ erfolgte eine p.o.- Analgesie mittels Metamizol 500 mg/ml als Gabe von 1-2 Tropfen in die Mundhöhle (200 mg/kg KG) und nachfolgend als Trinkwasserzugabe (200 mg/kg KG) alle 6h bis zum Zeitpunkt der Tötung. Diese wurde am Tag 4 postoperativ mittels manueller cervikaler Dislokation (Genickbruch) durchgeführt. Die Herzen wurden entfernt, Gewebe sowohl aus dem Infarktarnbereich als auch aus nichtinfarzierten Myokard entnommen und bis zur Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt.

2.5. Coxsackievirus B3 (CVB3)-Modell der subakuten Myokarditis

Die Umsetzung des CVB3-Modells erfolgte in 6-8 Wochen alten APN-KO-Mäusen und C57BL/6-Wildtypmäusen wie bereits bei Jenke et al. beschrieben (Jenke et al., 2014). Zur Induktion einer CVB3-Myokarditis erfolgte die Einleitung und Aufrechterhaltung einer Anästhesie mittels Isofluran 2 % per inhalationem und die intraperitoneale Applikation von in 200 μ l PBS gelösten 5×10^5 plaquebildenden Einheiten (plaque

forming units) von durch Transfektion abgeleiteten und gereinigten Coxsackievirus B3 (Nancy strain; ATCC-Nummer: VR-30, zur Verfügung gestellt von Prof. K. Klingel, Universität Tübingen) (Klingel et al., 1992). Die Kontrollgruppe erhielt 200 µl PBS intraperitoneal. Die Tötung erfolgte an Tag 7 nach intraperitonealer Injektion/Infektion mittels manueller cervikaler Dislokation. Zum Nachweis der Infektion erfolgte die Durchführung einer PCR, wobei eine Anzahl CVB3-positiver cDNA Kopien von 10^3 /ng cDNA aus dem linken Ventrikel als Grenze für den Einschluss in die vorliegende Studie dienten.

2.6. Molekularbiologische Untersuchungen

2.6.1. Extraktion von RNA

Die Extraktion der RNA erfolgte mittels Rneasy[®] Mini Kit von Qiagen. Die verwendeten Zellen stammten aus der Zellkultur von neonatalen Fibroblasten und neonatalen Myozyten der Ratte, sowie im Falle der *In-vivo*-Untersuchungen aus Herzmuskelgewebe des LV und Milzgewebe von CVB3-infizierten APN-KO-Mäusen und C57BL/6 Wildtyp-Mäusen. Die kultivierten kardialen Zellen wurden nach dem Rneasy[®] Mini Kit Protokoll in der Kulturschale nach Abpipettieren des Kulturmediums durch Zugabe von 350 µl RLT-Lysepuffer (RNeasy[®] Mini Kit) versetzt mit β-Mercaptoethanol (Verhältnis 100:1) lysiert. Mittels Gummischwaber (rubber policeman) wurde das Lysat gesammelt und zusammen mit dem RLT-Lysepuffer/β-Mercaptoethanol in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Im Falle des Herzmuskelgewebes des LV und des Milzgewebes wurden entsprechende Stücke wie oben beschrieben ebenfalls in 350 µl RLT-Lysepuffer versetzt mit β-Mercaptoethanol (Verhältnis 100:1) gegeben. Danach erfolgte die Homogenisierung mittels Vortexer, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Nach anschließender Inkubation über 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit. Der Überstand wurde in ein weiteres frisches Eppendorfröhrchen abpipettiert und mit 350 µl 70 % Ethanol in eine RNAeasy[®] Spinsäule übertragen. In dieser erfolgte die erste Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen/min über 15 s. Die nun auf der Membran der RNAeasy[®] Spinsäule befindliche RNA wurde in 3 Schritten (einmalig durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer (Rneasy[®] Mini Kit), zweimalig Zugabe von 500 µl RPE-Puffer (Rneasy[®] Mini Kit), jeweils mit anschließender Zentrifugation mit 10.000 Umdrehungen/min über 15 s) gewaschen. Abschließend erfolgte die Lösung der RNA

von der Membran der Spinsäule durch Zugabe von 50 µl RNase freien Wassers und Zentrifugation in ein frisches Eppendorfröhrchen bei 10.000 Umdrehungen/min über eine Dauer von 1 min. Die entstandene RNA-Lösung wurde bei -80°C eingelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte via Spektrophotometrie unter Verwendung des NanoDrop®-1000-Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierfür wurde je 1 µl jeder Probe auf die Messoptik des Gerätes aufgetragen. Die Entsprechende Konzentration der jeweiligen Probe berechnet sich aus ihrer optischen Dichte nach der Formel: c (Konzentration) = OD 260 nm (optische Dichte) x 40 µg/ml (Multiplikationsfaktor für RNA). 500 ng RNA-Lösung wurde abschließend mit RNase freiem Wasser auf ein jeweiliges Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt.

Die Messung der Integrität der gewonnenen RNA erfolgte mittels 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Hierbei werden RNA-Proben ähnlich einer Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach der Größe der enthaltenen RNA-Fragmente aufgetrennt. Aufgrund einer konstanten Ladungs-Größenbeziehung der RNA-Fragmente bewegen sich kleinere RNA-Molekül schneller durch eine Polymermatrix. Als Referenz dient eine RNA-Referenzprobe (RNA 6.000 Nano Ladder), welche definierte RNA-Größen enthält und eine Zuordnung der Größe der eingesetzten und in den Proben enthaltenen RNA-Fragmente ermöglicht. Aus dem beschriebenen Verfahren wurde dann mittels Software über einen Algorithmus die sogenannte RIN (RNA integrity number) generiert, welche ein Maß für die Integrität der in der Probe befindlichen RNA darstellt.

2.6.2. Synthese der cDNA

Die Herstellung der verwendeten cDNA aus neonatalen Fibroblasten und neonatalen Myozyten der Ratte erfolgte mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT (Applied Biosystems). Hierbei wurde zunächst die entsprechende Menge des RT-Mastermix unter Kaltstellen auf Eis hergestellt. Die verwendeten Mengen der verwendeten Reagenzien zeigt Tabelle 1. 10 µl dieses Mastermix wurden in einzelne Eppendorfröhrchen pipettiert und 10 µl RNA-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation, um den Inhalt am Boden zu sammeln und eventuelle Luftblasen zu eliminieren. Die Durchführung der Reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte in einem Blockcycler bei 25°C über 10 min, anschließend bei 37°C über 120 min und abschließend bei 85°C über 5 min. Die Aufbewahrung der entstandenen cDNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

Tab.1: Zusammensetzung des Mastermix

Reagenzien	Volumen (µl)
10x RT Puffer	2.0
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2.0
Multiscribe® Reverse Transkriptase	1.0
Nukleasefreies Wasser	4.2
Gesamtvolumen	10.0

2.6.3. Real-time-PCR

Zur Durchführung der Quantitativen Real-time-PCR wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix und der TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) für die Expressionbestimmung von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13, NKp46, F4/80, CD3z, CD4, CD8a sowie GAPDH und HPRT1 als Referenzgen verwendet. Die verwendeten eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab.2: Zusammensetzung PCR-Proben

Komponenten	Volumen für 1 Reaktion (µl)
TaqMan® Gen Expression Assay	0.4
cDNA (c=15 ng/µl)	1.6
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	4.0
Nukleasefreies Wasser	2.0
Endvolumen	8.0

Nach leichtem Schütteln und kurzem Zentrifugieren zum Sammeln der jeweiligen Probe am Boden der Eppendorfröhrchen erfolge die Beladung der Wells der PCR-Platten, der Verschluss der jeweiligen Platte mit der dazugehörigen Klebefolie und eine erneute kurze Zentrifugation sowie die Durchführung der PCR mittels 7900 HAT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Das Temperaturprofil war wie folgt definiert: Erwärmen auf 95°C über 10 min zur Denaturierung der cDNA und Aktivierung der DNA-Polymerase gefolgt von 40 Zyklen mit je 15 Sekunden mit 95°C und je 1 min mit 60°C. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Bestimmung des jeweiligen ΔCt -Wertes mit der Formel $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GAPDH}}$.

2.6.4. Proteinextraktion und Westernblot- Analysen

Die Extraktion der zu untersuchenden Proteine erfolgte aus der Zellkultur oder direkt aus adultem Herzmuskelgewebe unter Verwendung eines Zellysepuffers (Cell Signaling). Im Falle der Zellkultur wurde jede Platte mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen, um Reste des Zellmediums zu entfernen. Nachfolgend wurden 400 µl Lysepuffer versetzt mit einem Proteinase-Inhibitor (Complete Mini, Roche, eine Tablette pro 10 ml Puffer) und einem Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP[®], Roche, eine Tablette pro 10 ml Puffer) (um eine Proteinolyse und eine weitere Änderung des bestehenden Phosphorylierungsstatus zu verhindern) hinzugegeben und die Platten über 5 min auf Eis inkubiert. Abschließen wurden die Lösungen bei 14.000 g über 10 min in einer gekühlten Zentrifuge zentrifugiert.

Im Falle der Proteinextraktion aus Herzmuskelgewebe erfolgte die Gabe kleiner Herzmuskelgewebstücke in 400 µl Lysepuffer (Cell Signaling) und die Homogenisation auf Eis mittels Pellet Pestle[®] Motor (Kontes). Nach Inkubation über 30 min bei 4°C wurden die Proben bei 16.000 g über 5 min zentrifugiert und der Überstand entsprechend abpipettiert.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Die Messung der Proteinkonzentration der entstandenen Lösung erfolgte mittels der BCA-Methode (bicinchoninic acid assay) unter Verwendung eines BCA-Protein-Assay-Kits (Pierce). Hierbei wird über eine Referenzprobe bekannter Proteinkonzentration über die Extinktion (gemessen bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Nanodrop[®] 1000 Spectrometer (Thermo Fisher)) und einen einfachen Dreisatz die Proteinkonzentration der gewünschten Probe berechnet. Zur Durchführung des Westernblots erfolgte der Einsatz von 30 µg Protein versetzt mit 5 µl eines Ladepuffers aus 375 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin, 12,6 % SDS und 600 mM DTT (Dithiothreitol). Die Gemische wurde zur Proteindenaturierung bei 95°C in einem Wasserbad (WNE Excellent, Memmert) über 5 min inkubiert und entsprechend in die Kammern der Sammelgele aufgetragen. Pro Gel erfolgte zusätzlich der Auftrag eines Markers (Protein Ladder, Fermentas). Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele zeigen die Tabellen 3 und 4. Das Gießen der Gele erfolgte in hierfür vorgesehenen Rahmen (Bio-Rad).

Tab.3: Zusammensetzung Trenngel

Trenngel 10 %	Menge pro Gel in ml
Wasser	2,05
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1,65
Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5M Tris)	1,25
SDS 10 %	0,05
TEMED	0,003
APS 10 %	0,025

Tab.4: Zusammensetzung Sammelgel

Sammelgel 4 %	Menge pro Gel in ml
Wasser	1,525
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,325
Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,5M Tris)	0,625
SDS 10 %	0,025
TEMED	0,003
APS 10 %	0,013

Nach Befüllen der Blotkammer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS) erfolgte das Auftrennen durch das Anlegen einer Spannung von 200 V. Zum Blotten auf Nitrozellulosemembran wurde das Mini-Protean Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad) genutzt und erfolgte bei 100 V über 90 min. Anschließend wurde die Membran vorsichtig vom Gel getrennt, in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) gegeben und mit 3 ml Blocklösung (50 ml TBS-Tween + 5 % BSA: 100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 2,5 g BSA) zunächst über 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Markierung des zu bestimmenden Proteins (ERK, p-ERK, AMPK, p-AMPK) wurde die Membran über Nacht bei 4°C mittels Blocklösung versetzt mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Folgende Antikörper (Cell Signaling) wurden in der jeweils genannten Verdünnung eingesetzt: AMPK α (D5A2) Rabbit mAb (#5831) (Verdünnung 1:1000), Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb (#2535) (Verdünnung 1:1000), p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) Rabbit mAb (#4695) (Verdünnung 1:1000), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®] Rabbit mAb (#4370) (Verdünnung 1:2000).

Danach schloss sich ein 3-maliges Waschen mit TBS-Tween und die Inkubation über 1h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper gelöst in Blocklösung an. Als

sekundärer Antikörper (Cell Signaling) wurden Anti-rabbit IgG und HRP-linked Antibody (#7074) verwendet.

Zum Erreichen der Chemilumineszenz-Reaktion mit der an den sekundären Antikörper gekoppelten HRP (horseradish peroxidase) wurde eine entsprechende Entwicklerlösung genutzt (SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (A+B, je 1 ml), welche nach flachen Ausbreiten der Nitrozellulosemembran aufgetragen wurde. Anschließend erfolgte die digitale Fotografie der Banden in einer Dunkelkammer und die Auswertung der Bandenintensität mittels ImageJ-Software.

2.6.5. Zymographische Analysen der MMP- Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 erfolgte aus LV-Gewebe und aus dem Kulturmedium der Zellkultur. Im Falle von Material aus dem LV wurde die Proteininsolation wie oben beschrieben unter der Verwendung von 30 µg Protein durchgeführt. Im Falle der Untersuchung aus den Kulturmedien erfolgte der Einsatz von 20 µl Kulturmedium. In beiden Fällen wurde das Material mit Tris (0,5 mol/l pH 6.8), 50 %-igem Glycerin und 10 % SDS sowie mit 0,1 % Bromphenolblau vermischt und über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 10 %-igem Polyacrylamidgel in der gleichen Zusammensetzung wie im Falle des Westernblots, versetzt mit 0,1 % Gelatine (5 mg pro Gel), bei einer Spannung von 150 V nach dem bereits im Kapitel 2.6.4. beschriebenen Protokoll unter Verwendung derselben Kammern. Für jedes Gel wurde auch wie im Falle des Westernblots ein Marker (Fermentas) zum Ablesen der entsprechenden Proteingröße eingesetzt.

Um das in den Gelen enthaltene SDS zu entfernen wurden diese in einem Triton[®] X-100 enthaltenen Puffer (Sigma Aldrich) über 60 min eingelegt und gewaschen. Danach erfolgte das Einlegen in einem weiteren Puffer (Inkubationspuffer: 0,01 M Tris, 0,4 M Tris-Hcl, 2 M NaCl, 0,07 M CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, 0,6 % Brij-35) über Nacht bei 37°C. Zur Färbung der Gele wurden diese über 30 min in je 100 ml einer Fixierlösung (10 % Essigsäure, 40 % Ethanol) eingelegt und nachfolgend für 20 min in einer Stocklösung (0,2 % Brilliant Blue G 250, 90 % Ethanol) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mittels einer Entfärberlösung (10 % Essigsäure, 20 % Ethanol) über ca 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Auswertung der entfärbten Banden wurde mithilfe Image-J-Software durchgeführt.

2.6.6. ELISA zum Nachweis von Kollagen- Spaltprodukten

Zum Nachweis eines gesteigerten Abbaus von Kollagen im Rahmen des Myokardinfarktes bzw. der CVB3-Myokarditis erfolgte die Messung der Konzentration von ICTP (C-terminal telopeptide of collagen typ I) im Mausserum. Blut wurde nach einer Lagerung in vertikaler Position für 60 min bei 4°C mit 2000 g über 20 min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei -80°C gelagert. Zur Durchführung der Messung der ICTP-Konzentration erfolgte die Verwendung eines Mouse-ICTP-ELISA-Kits (Abbexa). Der Test arbeitet auf der Grundlage eines Sandwich-ELISA erfolgte nach der dem Kit beigefügten Anleitung. Hierfür wurde eine Standard-Reihe angelegt. Eine Standardlösung mit einer Konzentration von 5000 pg/ml wurde mit einer Standard-Verdünnungslösung entsprechend den finalen Konzentrationen 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312,5 pg/ml, 156,25 pg/ml und 78,125 pg/ml verdünnt. Die Extinktion gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm dient später der Erstellung der Standardkonzentrationskurve. Nachfolgend werden 100 µl der jeweiligen Standardverdünnungslösung, eine Kontrolle und die entsprechenden Serumproben (nach einer Verdünnung von 1:10 mit Probenverdünnungspuffer) in die mit dem Kit gelieferte Well-Platte gegeben. Diese ist mit einem ersten Antikörper (Goat-Antibody) beschichtet, welcher ICTP bindet. Nach einer Inkubationszeit von 90min bei 37°C erfolgt das 2-malige Waschen mit dem mitgelieferten Waschpuffer und die Inkubation mit 100 µl einer Lösung eines 2. Antikörpers (Biotin-konjugierter Antikörper gerichtet gegen ein 2. Ektop von ICTP, Verdünnung 1:100) über 60 min bei 37°C. Nachfolgend wurden alle Wells 3x mit einem Waschpuffer über 1-2 min gewaschen. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 100 µl SABC (Streptavidin-HRP conjugate, Verdünnung 1:100), die Inkubation über 30 min bei 37°C und nachfolgend ein 5-maliges Waschen aller Wells mit Waschpuffer. Nach Zugabe von 90 µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat in jedes Well und inkubation in Dunkelheit bei 37°C über 15-20 min entsteht ein sichtbarer Farbumschlag in der Standardreihe. Während dieser Inkubation erfolgt die Umsetzung von TMB (Tetramethylbenzidin) durch die HRP (Horseradishperoxidase) in ein blaues Endprodukt. Die Färbung der Probe ist dabei direkt proportional zu der Konzentration der HRP, welche wiederum direkt proportional zu der Konzentration der ICTP ist. Nach sichtbarer Färbung der Standardreihe erfolgt das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung in jedes Well sowie anschließend die Messung der Extinktion mit einem Spectrometer bei 450 nm (Gemini EM Microplate Reader).

2.7. HE-Färbung und mikroskopische Analysen

Zur Ermittlung des Grades der inflammatorischen Infiltration des linken Ventrikels im Rahmen der CVB3-Myokarditis erfolgte die Erhebung eines Infiltrationsscores zum Vergleich zwischen den unterschiedlichen Tieren mittels Mikroskopie. Hierfür wurden Kryoschnitte des linken Ventrikels von CVB3-infizierten WT und APN-KO-Mäusen durchgeführt. Gewebquerschnitte des linken Ventrikels wurden zunächst in Tissue-Tek® OCT Compound (Sakura) eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Schnitte von 5 µm Dicke wurden mithilfe eines Microm 560 HM-Kryostat-Klingenträger (Thermo Fisher) angefertigt. Anschließend erfolgte die Anfertigung einer HE-Färbung und die Mikroskopie mittels AE20 – Mikroskop (Motic) und 200-facher Vergrößerung mit der Bestimmung eines Infiltrationsscores: Multiplikation des Flächenanteils der von Entzündungsinfiltraten betroffenen Gewebeareale mit dem durchschnittlichen Schweregrad der Infiltrate. Dabei wurde der Schweregrad der Infiltrate definiert als 0 (keine Immunzellinfiltration), 1 (geringe Immunzellinfiltration mit wenigen sichtbaren Immunzellen pro Fokus), 2 (Mittlere Immunzellinfiltration mit weniger als 100 Immunzellen pro Fokus) und 3 (Schwere Immunzellinfiltration mit mehr als 100 Immunzellen pro Fokus). Pro Tier erfolgte die Untersuchung von 4 Foki. Zur statistischen Auswertung wurde für jede Gruppe der Mittelwert gebildet.

2.8. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten unter der Verwendung der Software GraphPad PRISM Version 5.04 und Version 8.0.0. Dabei wurden für die jeweiligen Gruppen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt und graphisch dargestellt. Eine Normalverteilung der Ergebnisdaten wurde nicht angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte daher mittels nichtparametrischer Tests. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde dabei der Mann-Whitney-U-Test verwendet, zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Post-hoc-Tests durch Mann-Whitney-U-Test für den paarweisen Vergleich zwischen einzelnen Gruppen. Bonferroni-Korrekturen wurden nicht vorgenommen. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem einseitigen Wert von $p < 0,05$ angenommen.

2.9. Verwendete Materialien und Geräte

Materialien	Hersteller
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad
7-0 Ethilon Mono	Ethicon
APS 10 %	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Brij-35	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Roth
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Cohan-Vannas-Federschere	Fine Science Tools
Collagenase Typ II	Worthington
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
DMEM 31885	Gibco
DTT (Dithiothreitol)	Biomol
Einwegskalpell	Dahle
Eosin B	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
FBS (Fetal bovine serum)	PAA
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Gummiwischer (rubber policeman)	Fisher Scientific
Halsey Nadelhalter	Fine Science Tools
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Gibco
High Capacity cDNA Reverse Trascription Kit	Applied Biosystems
Horse Serum	PAA
Isofluran	Abbot
Isofluran 2 %	Abbot
Liberase TH Research Grade	Roche Applied Science
Lysepuffer (10x)	Cell Signaling
Marker (Protein Ladder)	Fermentas
Maus ICTP ELISA Kit	Abbexa
Metamizol 500 mg/20Ggt	Hexal
MgCl ₂	Sigma-Aldrich
Moria Bonn Iris Schere	Fine Science Tools
NaCl	Merck
NaCl	Merck
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare
Nukleasefreies Wasser	Applied Biosystems

Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet)	Sigma-Aldrich
PBS (phosphate buffered saline)	PAA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP®)	Roche Applied Science
Pipetten	Eppendorf
Proteinase-Inhibitor	Roche Applied Science
Reaktions-Röhrchen (15/50 ml)	Falcon
Reaktionsröhrchen (0,2/0,5/1,5 ml)	Eppendorf
RNA 6000 Nano Ladder	Agilent Technologies
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RPMI-1640	PAA
Rundbodenplatten (96 Well)	Sarstedt
SDS 10 %	Sigma-Aldrich
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermoscientific
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck
Tissue-Tek OCT Compound	Sakura
Tris	Sigma-Aldrich
Trixon X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco
Tween 20	Bio-Rad
Vasofix Braunüle 22 G	B.Braun Melsungen AG
Zellfilter (Cell strainer), Porengröße 100 µm	PB Falcon
Zellfilter (Cell strainer), Porengröße 40 µm	PB Falcon
Zellfilter (Cell strainer), Porengröße 70 µm	PB Falcon
Zellkulturplatten	BD Falcon
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Geräte und Software	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
7900 HAT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher
AE20 Inverted Microscope	Motic
Blotkammer: Mini PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad
Gemini EM Fluorescence Micorplate Reader	Molecular Devices
GraphPad Prism 5.04	GraphPad
GraphPad Prism 8.0.0	GraphPad
HERAinc Incubator	Thermo Fisher
HERAsafe Clean Bench	Thermo Fisher
ImageJ 1.44	National Institutes of Health
Isoflurane Vaporizer	Rockmart

LEICA DMI4000B	LEICA Microsystems
Microcentrifuge 5415R	Eppendorf
Microm 560 HM-Kryostat-Klingenträger	Thermo Fisher
Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Mouse Ventilator Minivent Type845	Harvard
Multifuge 1S-R Zentrifuge	Thermo Fisher
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher
Pellet Pestle® Motor (Homogenisator)	Kontes
pH 211 Micoprocessor pH Meter	Hanna Instruments
SDS 2.2.2.	Applied Biosystems
SUNRISE Plate reader spectrophotometer	Tecan
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad (WNE Excellent)	Memmert

Proteine und Inhibitoren	Hersteller
Cherylerythrine (PKC-Inhibitor)	Sigma-Aldrich
Compound C (AMPK-Inhibitor)	Sigma-Aldrich
LPS (E.Coli)	Enzo Life Science
PD098059 (ERK1/2-Inhibitor)	Sigma-Aldrich
R-848	Enzo Life Science
Rekombinantes humanes Adiponektin	R&D Systems
Rekombinantes TNF α (Ratte)	R&D Systems
SP600125 (JNK-Inhibitor)	Sigma-Aldrich

RT-PCR Gene Expression Assays	Hersteller
CD3z (Mm00446171_m1 Maus)	Applied Biosystems
CD4 (Mm00442754_m1) Maus	Applied Biosystems
CD8a (Mm01182107_g1) Maus	Applied Biosystems
F4/80 (Mm00802529_m1) Maus	Applied Biosystems
GAPDH (Mm99999915_g1) Maus	Applied Biosystems
GAPDH (RN99999916_s1) Ratte	Applied Biosystems
HPRT1 (Mm01545399_m1) Maus	Applied Biosystems
MMP-13 (Rn01448194_m1) Ratte	Applied Biosystems
MMP-2 (Rn01538170_m1) Ratte	Applied Biosystems
MMP-3 (Rn00591740_m1) Ratte	Applied Biosystems
MMP-9 (Mm0442991_m1) Maus	Applied Biosystems
MMP-9 (Rn00579162_m1) Ratte	Applied Biosystems
NKp46 (Mm01337324_g1) Maus	Applied Biosystems

Primäre Antikörper	Hersteller
AMPK α (D5A2) Rabbit mAb (#5831)	Cell Signaling
p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) Rabbit mAb (#4695)	Cell Signaling
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb (#2535)	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®] Rabbit mAb (#4370)	Cell Signaling

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074)	Cell Signaling

3. Ergebnisse

3.1. Adiponektin führt zu einer signifikant erhöhten Expression von enzymatisch aktivem MMP-9

Kardiale Fibroblasten und Myozyten sind entscheidende Zelltypen im Rahmen des kardialen Remodelings (Cohn et al., 2000; Burchfield et al., 2013). Um zu untersuchen, ob APN das kardiale Remodeling über die Veränderung der Aktivität der MMPs im Herzen beeinflusst, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Messung der Expression von MMPs nach Inkubation von neonatalen kardialen Fibroblasten und Myozyten mit rekombinatem APN. Die Analyse der MMP-Expression wurde mittels quantitativer Realtime-PCR durchgeführt. Analysiert wurde die Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Während APN keinen Einfluss auf die Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-13 hatte, zeigte sich hinsichtlich der MMP-9 eine signifikant erhöhte Expression nach Inkubation mit APN, sowohl in kardialen Fibroblasten ($p < 0,05$) wie auch in kardalen Myozyten ($p < 0,05$).

Abb.4A

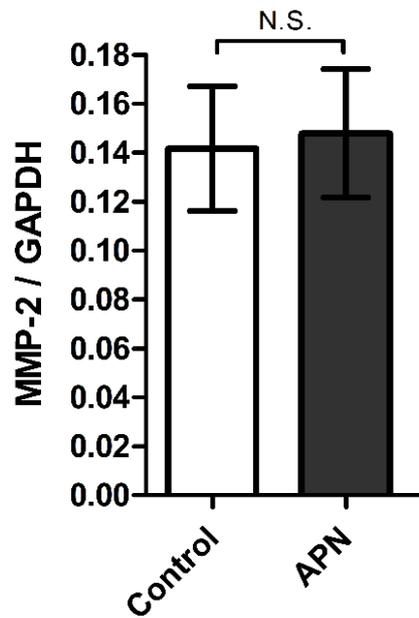


Abb.4B

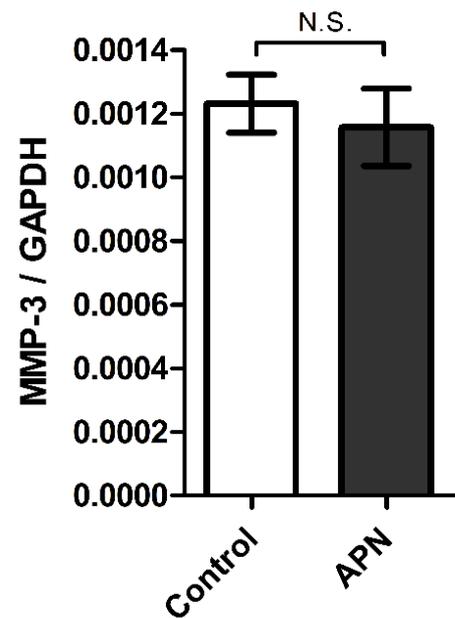


Abb.4C

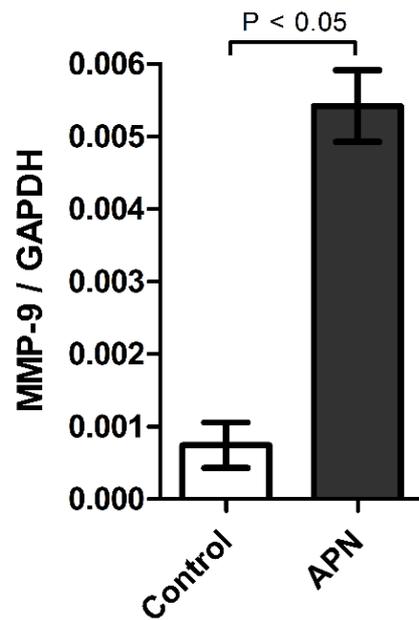


Abb.4D

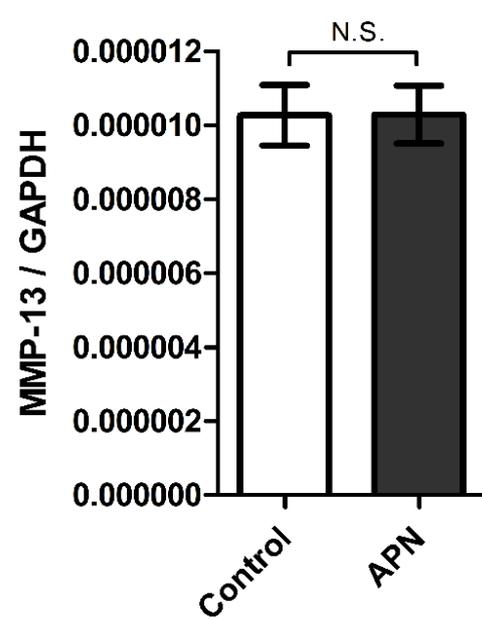


Abb.4A-D: APN induziert die MMP-9 mRNA Expression in neonatalen kardialen Fibroblasten (NRFB) der Ratte. Kardiale Fibroblasten wurden mit 20 µg/ml APN oder 20 µg/ml BSA (Control) über 24h in der Zellkultur inkubiert. Die Messung der mRNA-Expression von (A) MMP-2, (B) MMP-3, (C) MMP-9 und (D) MMP-13 erfolgte mittels qRT-PCR. Angaben in Mean ± SEM (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Abb.5A

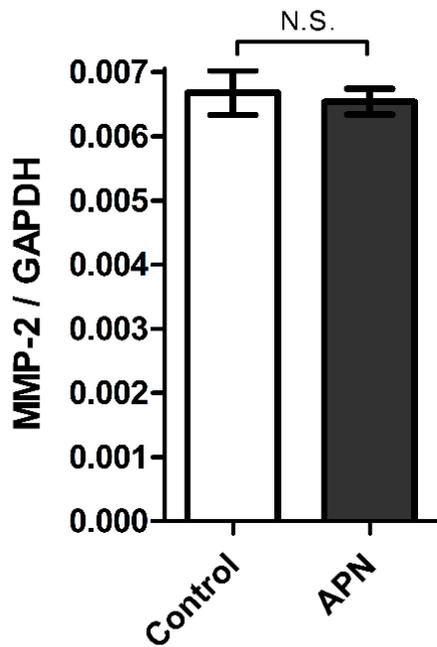


Abb.5B

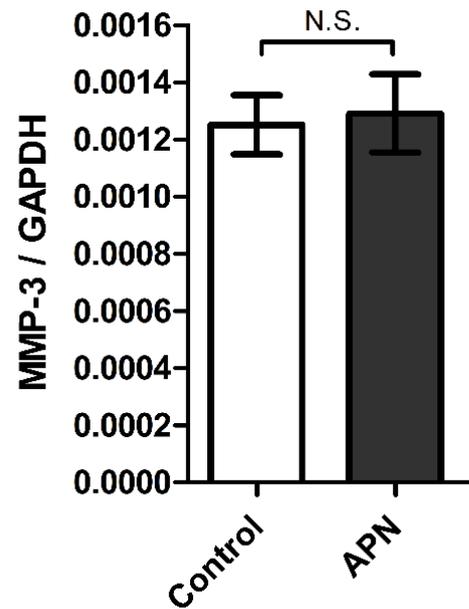


Abb.5C

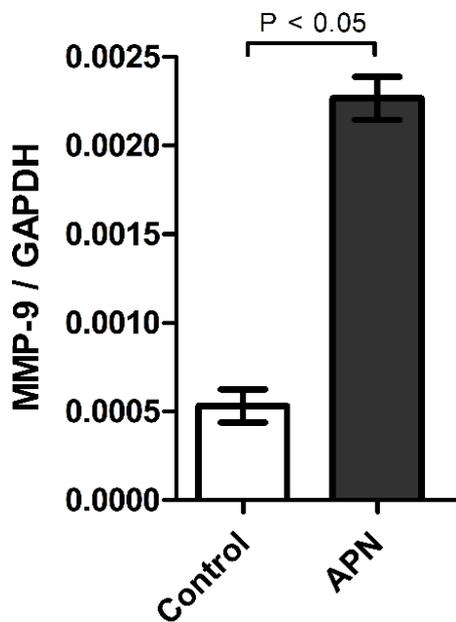


Abb.5D

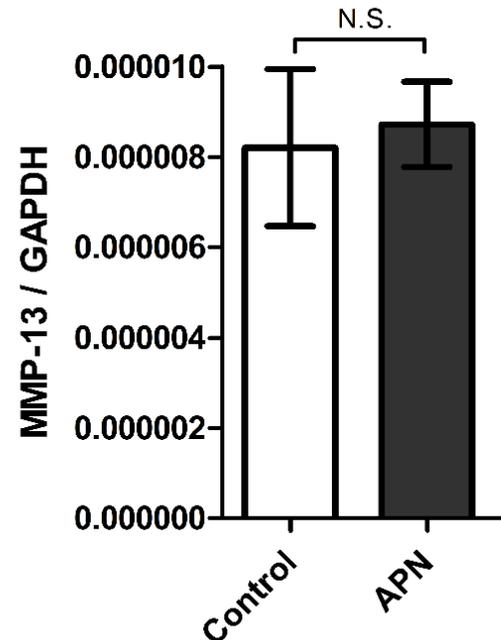


Abb.5A-D: APN induziert die Expression von MMP-9 mRNA in neonatalen kardialen Myozyten der Ratte (NRVM). Kardiale Monozyten wurden mit APN 20 µg/ml oder 20 µg/ml BSA (Control) über 24h in der Zellkultur inkubiert. Die Messung der mRNA-Expression von (A) MMP-2, (B) MMP-3, (C) MMP-9 und (D) MMP-13 erfolgte mittels qRT-PCR. Angaben in Mean ± SEM (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Um zu überprüfen, ob diese gesteigerte Expression von MMP-9 nach Inkubation mit APN auch mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität assoziiert ist, erfolgte die Durchführung einer Zymographie aus dem Überstand der Zellkultur neonataler kardialer Fibroblasten und Myozyten. Gleiches erfolgte für MMP-2. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6A und 6B dargestellt. MMP-9 zeigte hier eine signifikant erhöhte gelatinolytische Aktivität nach Inkubation mit APN, sowohl in neonatalen kardialen Fibroblasten ($p < 0.05$) als auch in neonatalen kardialen Myozyten ($p < 0.05$) im Vergleich zur Kontrolle (20 $\mu\text{g/ml}$ BSA). Für MMP-2 ergab sich nach APN-Inkubation kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Abb.6A

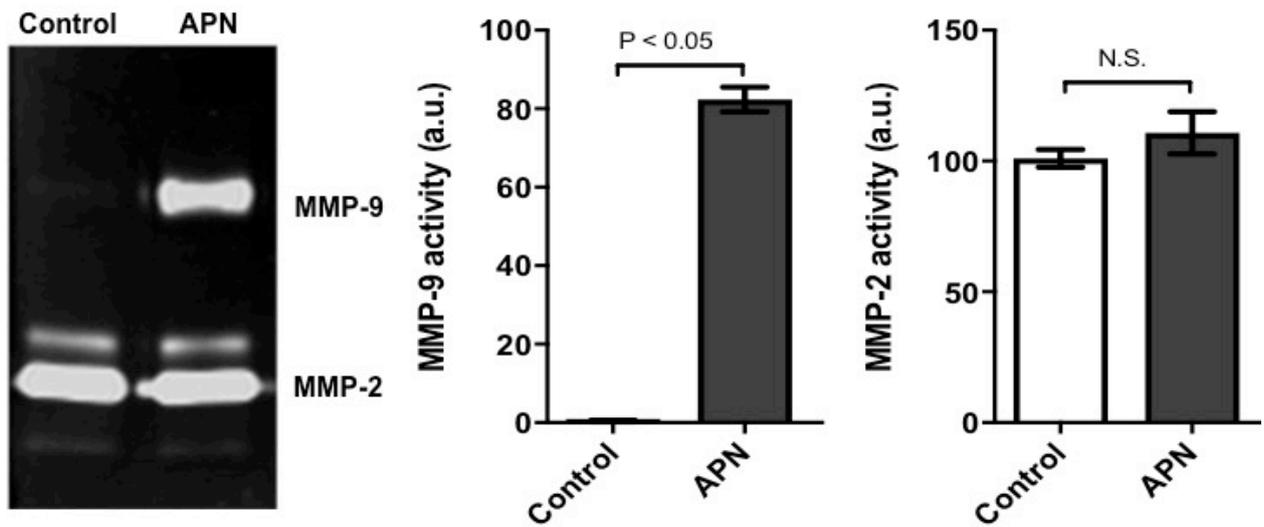


Abb.6B

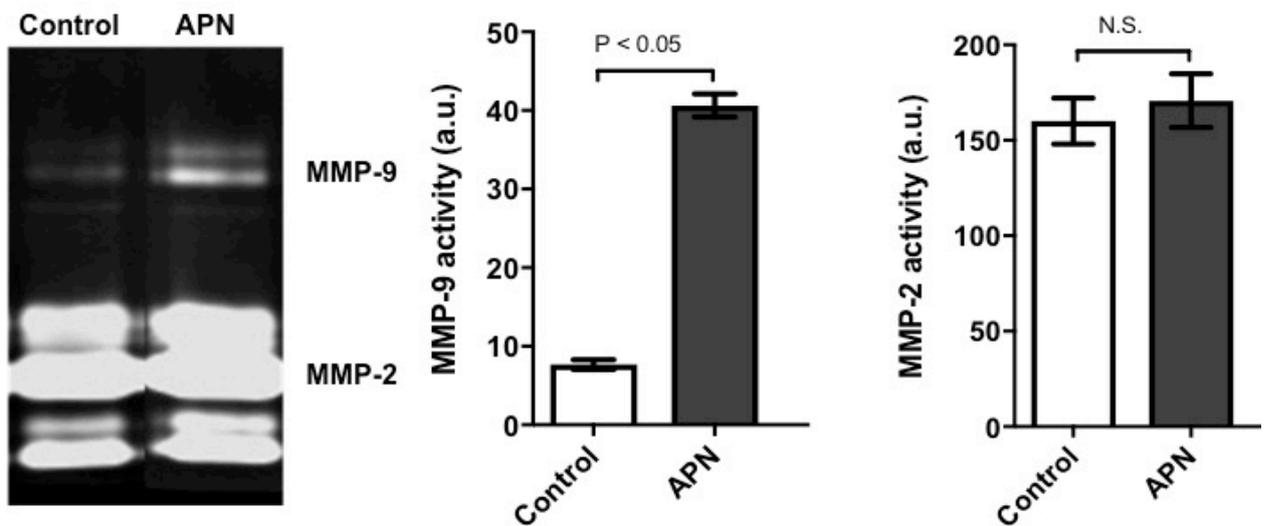


Abb.6A-B: APN induziert die Expression von enzymatisch aktivem MMP-9 in kardialen neonatalen Fibroblasten und kardialen Myozyten. APN hat keinen Einfluss auf die Expression von MMP-2, weder in kardialen neonatalen Fibroblasten (6A) noch in kardialen Myozyten (6B). Neonatale kardiale Fibroblasten und neonatale kardiale Myozyten wurden mit APN (20 µg/ml) oder 20 µg/ml BSA (Control) über 24h in Zellkultur inkubiert. Die Messung der MMP-Aktivität im Zellkulturmedium erfolgte mittels Zymographie. Angaben in Mean ± SEM (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.2. Die MMP-9-Expression ist nicht LPS-induziert

Woo et al. wiesen in ihrer Arbeit von 2004 eine Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Expression von MMP-9 in Makrophagen nach (Woo et al., 2004). Gleichzeitig zeigten Turner et al. eine Kontaminationen von unterschiedlichen rekombinanten APN bis zu einer Konzentrationen von 30 pg/ μ g (Turner et al., 2009). Lipopolysaccharid ist hitzebeständig und kann über diesen Weg nicht inaktiviert werden, während APN unter Hitze denaturiert. Um sicherzustellen, dass die beobachtete erhöhte Expression von MMP-9 nach Inkubation mit APN nicht auf eine Wirkung von LPS im Sinne einer Kontamination des verwendeten rekombinanten APNs zurückzuführen ist, erfolgte eine Inkubation kardialer Fibroblasten mit unbehandelten bzw. hitzebehandelten (95°C über 15 min) APN. Nachfolgend wurde eine Zymographie zur Messung der MMP-9-Aktivität durchgeführt. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 7A und 7B dargestellt. Eine Inkubation mit APN führte zu einer signifikant erhöhten Expression von MMP-9 ($p < 0,05$). Durch eine Hitzebehandlung von APN kam es zu einem kompletten Verlust dieses Signals, also zu einem Verlust der gesteigerten Expression von MMP-9. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachtete Hochregulation von MMP-9 APN spezifisch ist. Gleichzeitig kam es zu einer erhöhten Expression von MMP-9 nach Inkubation mit LPS und hitzebehandeltem LPS gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden LPS-Gruppen. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die gemessene APN-abhängige Hochregulation der Expression von MMP-9 unabhängig von einer möglichen Endotoxin-Kontamination erfolgte.

Abb.7A

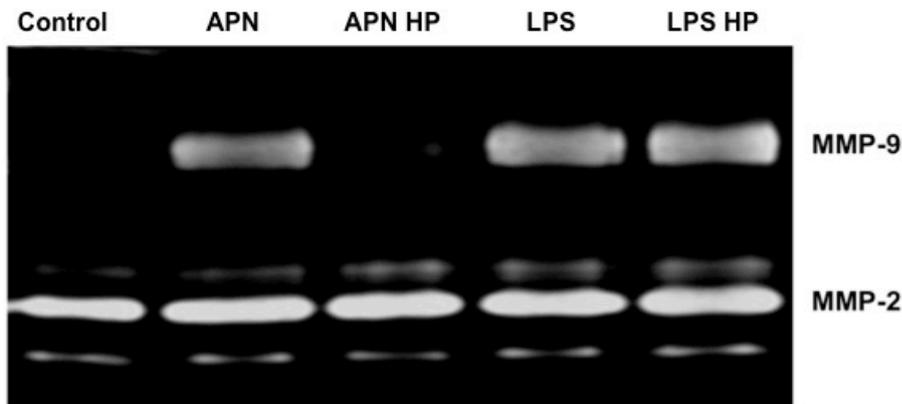


Abb.7B

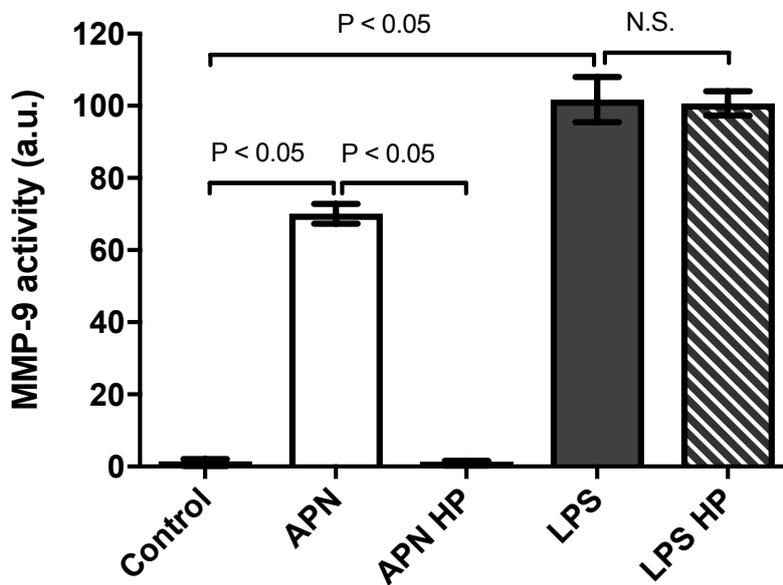


Abb.7A-B: APN induziert die Hochregulation der MMP-9-Expression in kardialen Fibroblasten unabhängig von einer Endotoxin-Kontamination. Kardiale Fibroblasten wurden mit APN (20 µg/ml), hitzebehandeltem APN (APN HP, 20 µg/ml, 95°C über 15 min), LPS (1 µg/ml) und hitzebehandeltem LPS (LPS HP, 1 µg/ml, 95°C über 15min) sowie Control (20 µg/ml BSA) über 24h inkubiert. (A) Die Messung der MMP-9-Aktivität erfolgte mittels Zymographie. (B) Quantitative Auswertung der gelatinolytischen MMP-9-Aktivität. Angaben in Mean ± SEM (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.3. AMPK und ERK1/2 sind Mediatoren der Adiponektin-induzierten MMP-9-Expression in kardialen Fibroblasten

Bisherige Untersuchungen zeigten eine Beteiligung der extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), der c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), der Proteinkinase C (PKC) und der AMP-activated protein kinase (AMPK) bei der Aktivierung von MMP-9 in verschiedenen spezifischen Zelltypen (Xie et al., 2004, Suzuki et al., 2004). Um zu untersuchen, ob die genannten Kinasen auch in der Signaltransduktion der APN-induzierten MMP-9-Expression in kardialen Zellen beteiligt sind, erfolgte die Inkubation kardialer neonataler Fibroblasten in der angelegten Zellkultur mit den jeweiligen Inhibitoren der genannten Kinasen (ERK1/2-Inhibitor: PD0098059; JNK-Inhibitor: SP600125; PKC-Inhibitor: Cherylerythrine, AMPK-Inhibitor: Compound C) über jeweils eine Stunde, gefolgt von der Inkubation mit APN oder Kontrolle (BSA 20µg/ml) über 24h. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8A und 8B dargestellt. Während die Inkubation mit SP600125 und Cherylerythrine keine Änderung der APN-induzierten MMP-9-Expression induzierte, führte die Inkubation mit PD0098059 und Compound C zu einer signifikanten Verminderung der APN-induzierten MMP-9-Expression ($p < 0.01$). Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung von ERK1/2- und AMPK-abhängigen Signaltransduktionswegen bei der APN-abhängigen Hochregulation von MMP-9 hin.

Abb.8A

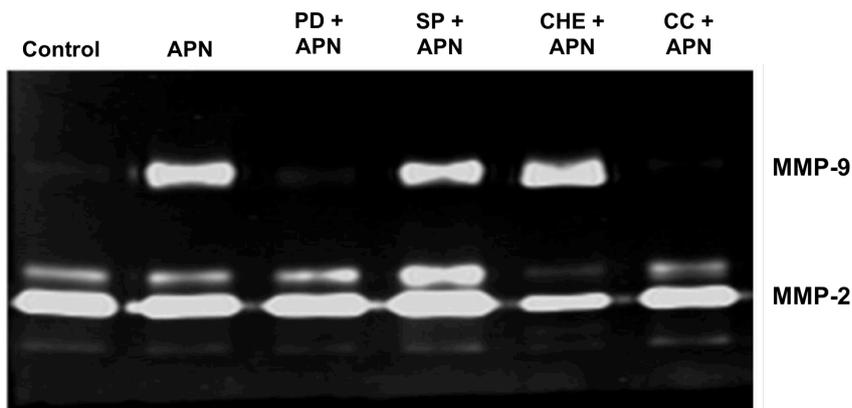


Abb.8B

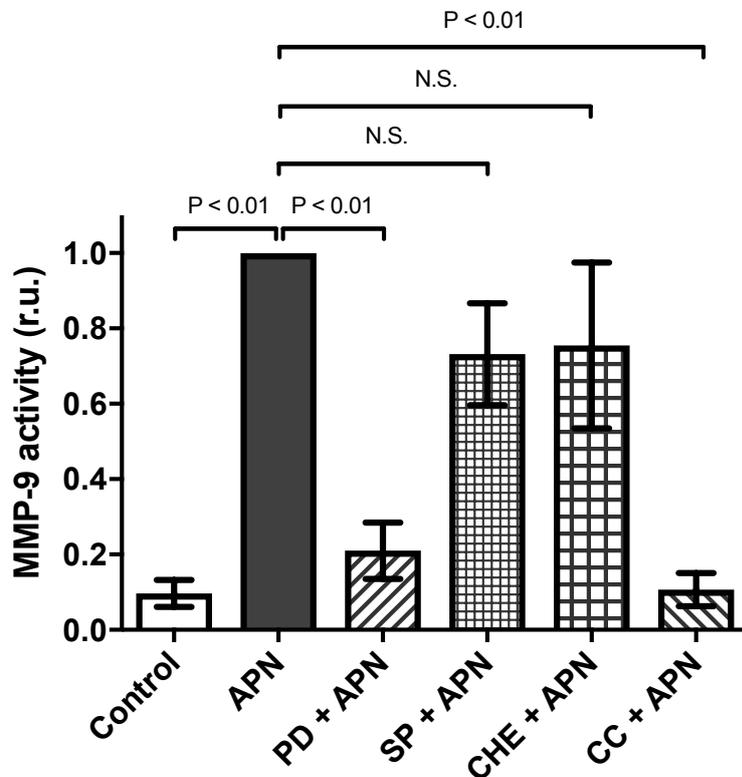


Abb.8A-B: APN induziert die Proteinexpression von MMP-9 in neonatalen kardialen Fibroblasten in der Zellkultur über eine Aktivierung von AMPK und ERK1/2. Kardiale Fibroblasten wurden mit den folgenden Kinaseinhibitoren über 1h inkubiert: ERK1/2-Inhibitor PD0098059 (PD, 20 $\mu\text{mol/l}$), JNK-Inhibitor SP600125 (SP, 20 $\mu\text{mol/l}$), PKC-Inhibitor Cheryerythrine (CHE, 5 $\mu\text{mol/l}$) und AMPK-Inhibitor Compound C (CC, 20 $\mu\text{mol/l}$). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit APN (20 $\mu\text{g/ml}$) oder BSA 20 $\mu\text{g/ml}$ (Control) für 24h. (A) Die Messung der MMP-9-Aktivität erfolgte mittels Zymographie. (B) Quantitative Auswertung der gelatinolytischen MMP-9-Aktivität. Die Inkubation mit PD0098059 und Compound C führte zu einer signifikant verminderten APN-induzierten MMP-9-Proteinexpression. Angabe in Mean \pm SEM (n = 4-6). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.4. Adiponektin führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der Kinasen AMPK und ERK1/2

Um zu überprüfen, ob APN zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Kinasen AMPK und ERK1/2 und damit zu ihrer Aktivierung führt, erfolgte die Messung des Grades der Phosphorylierung von AMPK und ERK1/2 mittels Immunoblot. Hierzu wurden kardiale Fibroblasten über 5, 15, 30 und 60 min mit APN inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9A-D dargestellt. APN induzierte einen zunehmenden Phosphorylierungsgrad von AMPK und ERK1/2 mit verlängerter Inkubationszeit der kardialen Fibroblasten. Diese Beobachtung war in Zellen, welche mit BSA (20 µg/ml) inkubiert wurden, nicht nachweisbar. Es zeigte sich eine zeitabhängige Aktivierung von AMPK im Sinne einer Phosphorylierung mit Erreichen eines Plateaus nach 15 min Inkubation mit APN. Auch ERK zeigt eine Aktivierung im Sinne einer Phosphorylierung nach Inkubation mit APN, hier mit Erreichen eines Plateaus bereits nach 5 min APN Inkubation.

Abb.9A

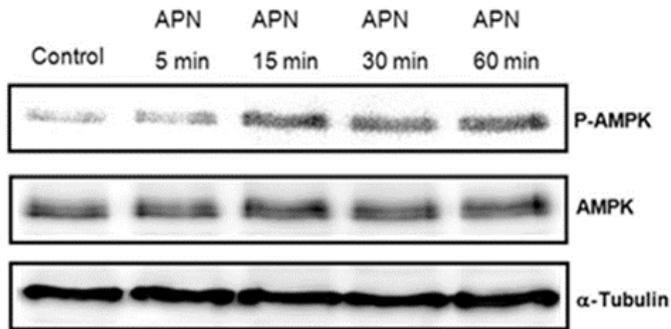


Abb.9B

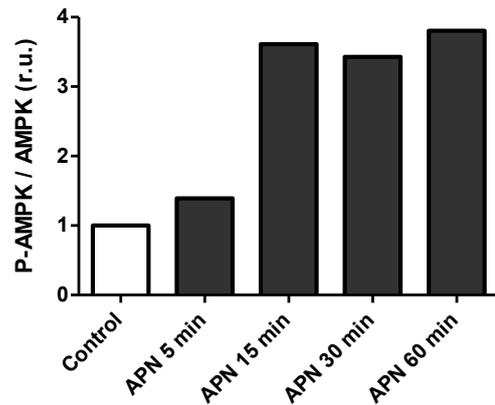


Abb.9C

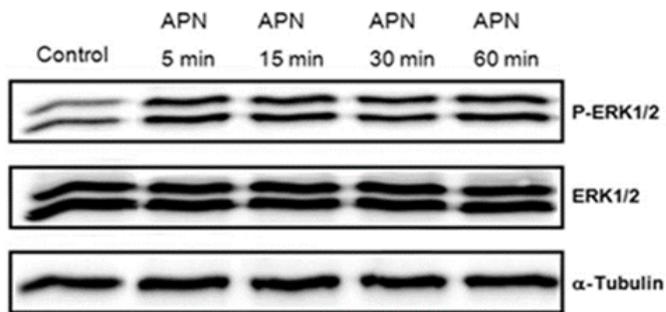


Abb.9D

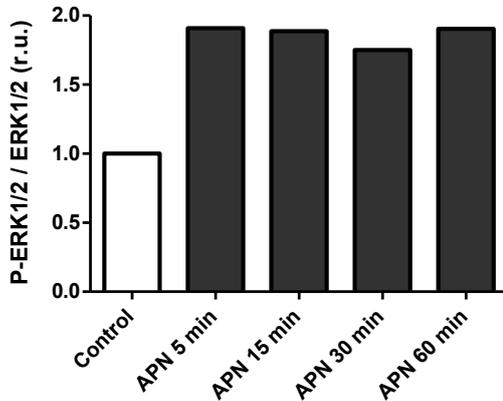


Abb.9A-D: Der Grad der Phosphorylierung von AMPK und ERK1/2 nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer mit APN zu. Kardiale Fibroblasten wurden über 5, 15, 30 und 60 min mit APN (20 μ g/ml) oder BSA (20 μ g/ml) in der Zellkultur inkubiert. Die Messung der Konzentration von phosphorylierter AMPK (A) und ERK1/2 (C) erfolgte mittels Westernblot. Als Referenzgen zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge erfolgte die quantitative Bestimmung von α -Tubulin. (B) Graphische Darstellung des Verhältnisses von pAMPK / AMPK. (D) Graphische Darstellung des Verhältnisses von pERK1/2 / ERK1/2.

3.5. AMPK und ERK1/2 sind Regulatoren einer inflammationsinduzierten MMP-9-Aktivierung in kardialen Fibroblasten

Die kardiale Aktivierung von MMP-9 wird durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Sauerstoffradikale) und TLR- (Toll-like receptor) Liganden vermittelt, welche typischerweise im Rahmen einer kardialen Schädigung in hohen Konzentrationen auftreten (Siwik et al., 2000, Siwik et al., 2001). Um zu untersuchen, ob AMPK und ERK1/2 die Inflammationsinduzierte MMP-9-Aktivierung in kardialen Fibroblasten vermitteln, erfolgte eine Inkubation neonataler Fibroblasten in der Zellkultur mit dem AMPK-Inhibitor Compound C (20 $\mu\text{mol/L}$) und dem ERK1/2 –Inhibitor PD0098059 (20 $\mu\text{mol/l}$), jeweils über 1h, sowie anschließend die Inkubation mit dem Zytokin TNF α (10 ng/ml) und den TLR-Liganden LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) oder R-848 (5 $\mu\text{g/ml}$), jeweils über 24h. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Die Inkubation von TNF α , LPS und R-848 führt zu einer signifikant erhöhten MMP-9-Aktivität in der Zymographie gegenüber der Kontrollgruppe ohne Stimulation ($p < 0,01$ und $p < 0,05$). Im Falle einer Prä-Inkubation mit Compound C ergab sich eine signifikant verminderte Hochregulation der stimulierten MMP-9-Aktivität (TNF α vs. CC + TNF α ($p < 0,05$); LPS vs. CC + LPS ($p < 0,05$); R-848 vs. CC + R-848 ($p < 0,05$)). Im Falle einer zusätzlichen Prä-Inkubation mit PD0098059 zeigte sich eine signifikante Verminderung der Aktivierung der MMP-9-Aktivität (TNF α vs. PD + TNF α ($p < 0,01$); LPS vs. PD + LPS ($p < 0,01$); R-848 vs. PD + R-848 ($p < 0,05$)). Zusammenfassend führten die AMPK- und ERK1/2-Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung einer inflammationsinduzierten erhöhten MMP-9- Aktivität. Damit erweisen sich nachweislich AMPK und ERK1/2 als Regulatoren der inflammationsinduzierten MMP-9-Aktivität in kardialen Fibroblasten.

Abb.10A

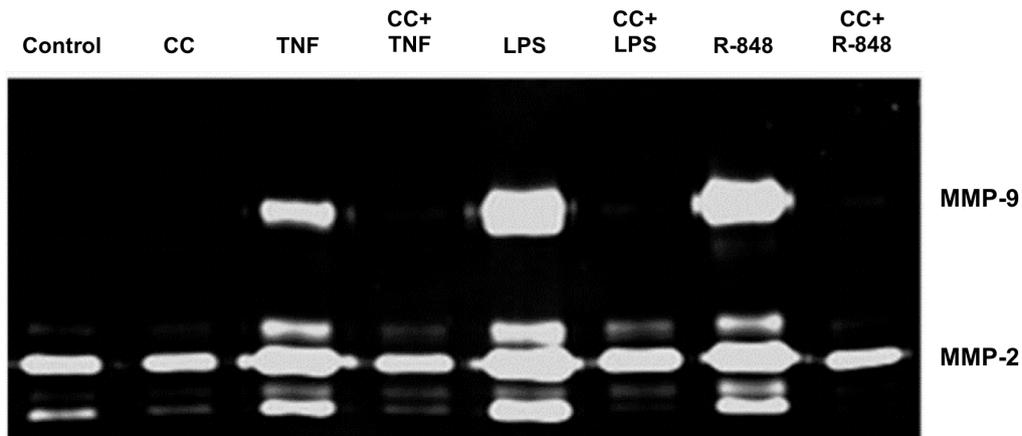


Abb.10B

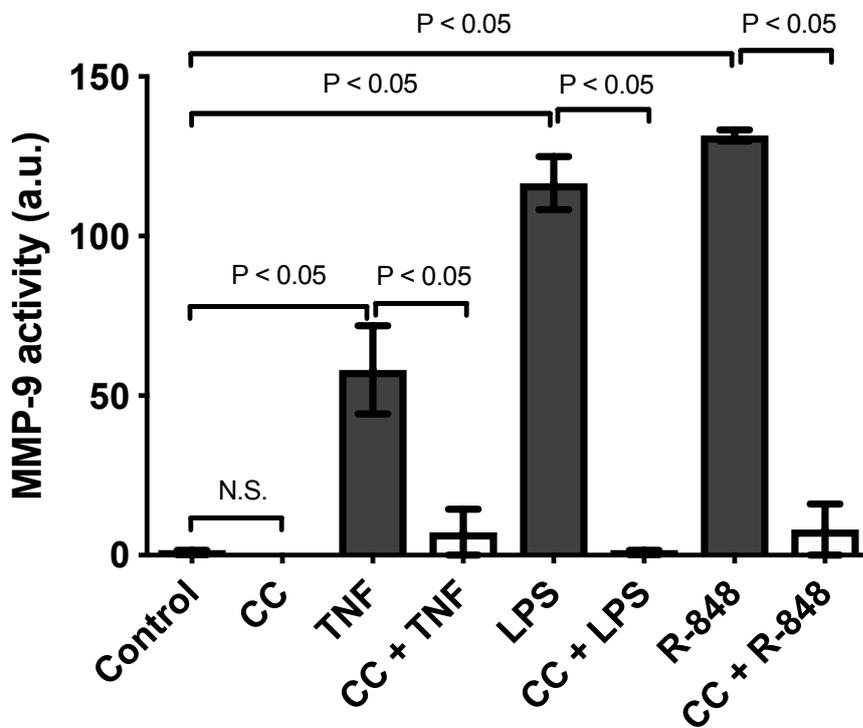


Abb.10A-B: AMPK fungiert als Regulator der inflammatorisch induzierten Aktivität von MMP-9. Neonatale kardiiale Fibroblasten wurden mit Compound C über 1h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$, LPS oder R-848 über 24h. (A) Die Messung der MMP-9-Aktivität im Kulturmedium erfolgte mittels Zymographie. Angabe in Mean \pm SEM (n = 4). (B) Quantitative Auswertung der MMP-9-Aktivität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

Abb.11A

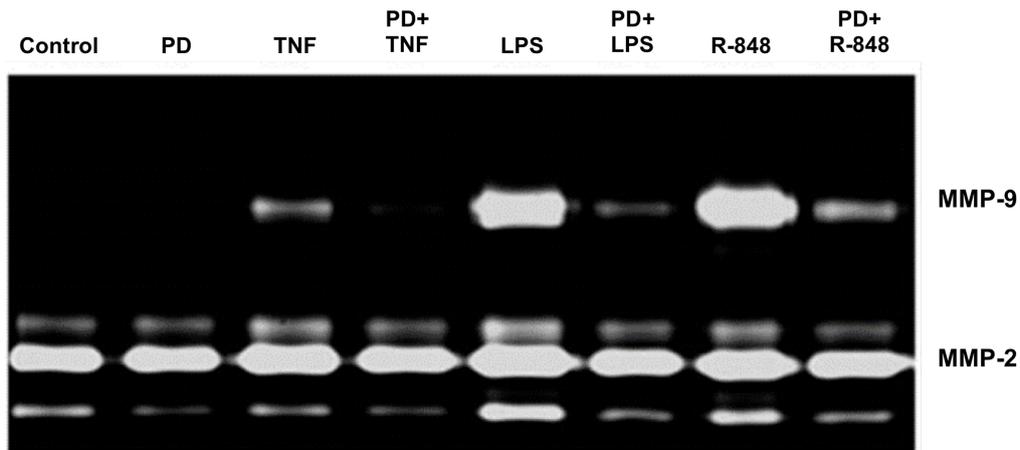


Abb.11B

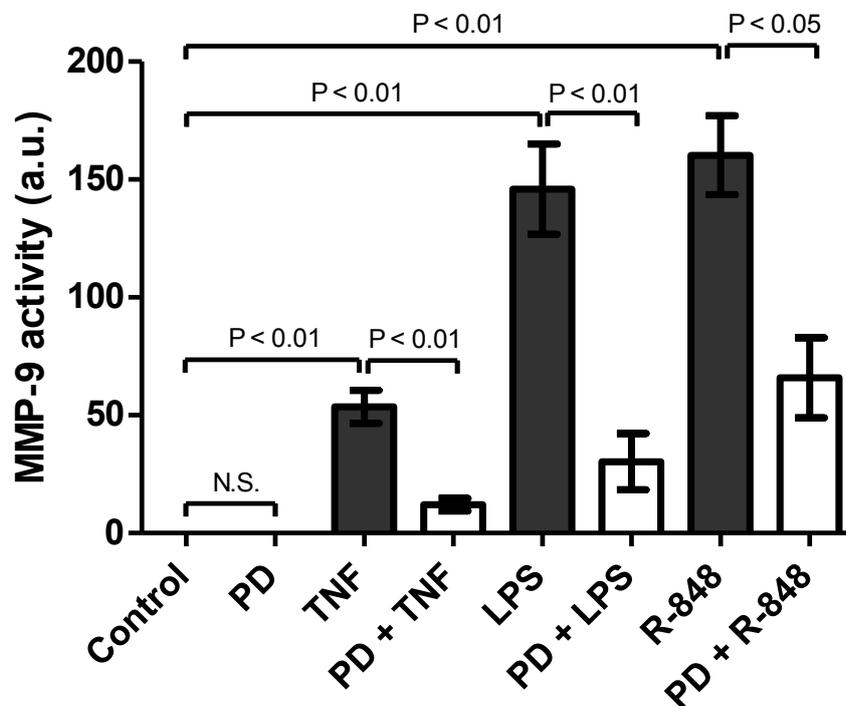


Abb.11A-B: ERK1/2 fungiert als Regulator einer inflammatorisch induzierten MMP-9-Aktivität. Neonatale kardiiale Fibroblasten wurden mit PD0098059 über 1h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit TNF α , LPS oder R-848 über 24h. (A) Die Messung der MMP-9-Aktivität im Kulturmedium erfolgte mittels Zymographie. Angabe in Mean \pm SEM (n = 5). (B) Quantitative Darstellung der MMP-9-Aktivität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.6. Adiponektin aktiviert MMP-9 in kardialen Fibroblasten nach proinflammatorischer Stimulation

Um zu untersuchen, ob auch APN einen Einfluss auf die Aktivierung von MMP-9 nach proinflammatorischer Stimulation hat, erfolgte die Inkubation neonataler kardialer Fibroblasten aus der Zellkultur mit rekombinantem APN (20 µg/ml) oder BSA als Kontrolle (20 µg/ml) über 6h, gefolgt von einer Inkubation mit TNFα (10 ng/ml), LPS (1 µg/ml) und R-848 (5 µg/ml) über 24h. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12A und B dargestellt. Die Inkubation mit APN führte zu einer signifikant erhöhten MMP-9-Aktivität als Antwort auf eine Inkubation mit TNFα, LPS und R-848, jeweils gegenüber den inflammatorischen Stimuli allein. Dabei zeigte sich zunächst eine signifikant erhöhte MMP-9-Aktivität nach APN-Inkubation gegenüber der Kontrollgruppe. Einen ähnlichen Effekt zeigte eine Inkubation mit BSA gefolgt von TNFα, LPS und R-848 (jeweils $p < 0,05$). Bei der seriellen Inkubation mit APN mit jeweils TNFα, LPS oder R-848 zeigten sich nochmals signifikant erhöhte Werte der MMP-9-Aktivität gegenüber den jeweiligen Gruppen ohne vorhergehende APN-Inkubation ($p < 0,05$). Die kombinierte Inkubation von APN und TNFα zeigte gegenüber einer alleinigen Inkubation mit APN keine erhöhten Werte der MMP-9-Aktivität ($p > 0,05$).

Diese Ergebnisse weisen auf einen synergistischen Effekt einer proinflammatorischen Stimulation sowie einer APN-induzierten Aktivierung von MMP-9 hin.

Abb.12A

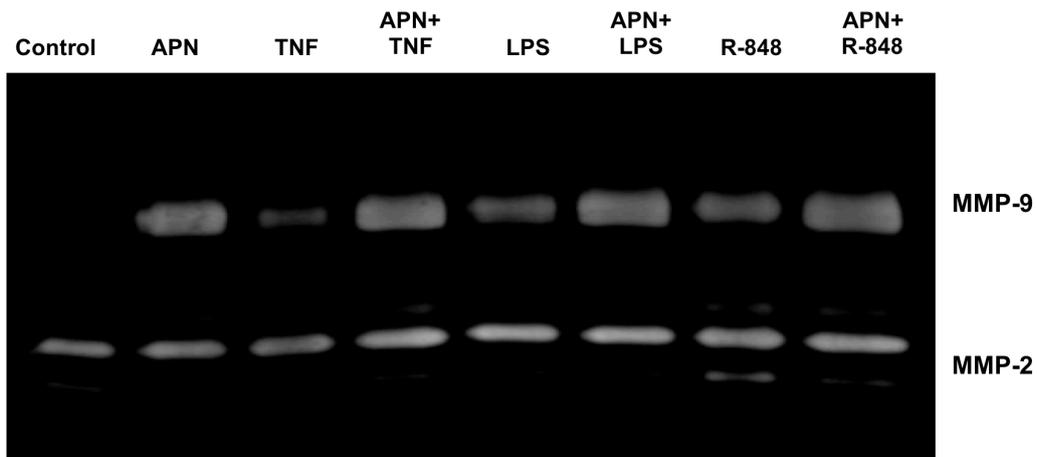


Abb.12B

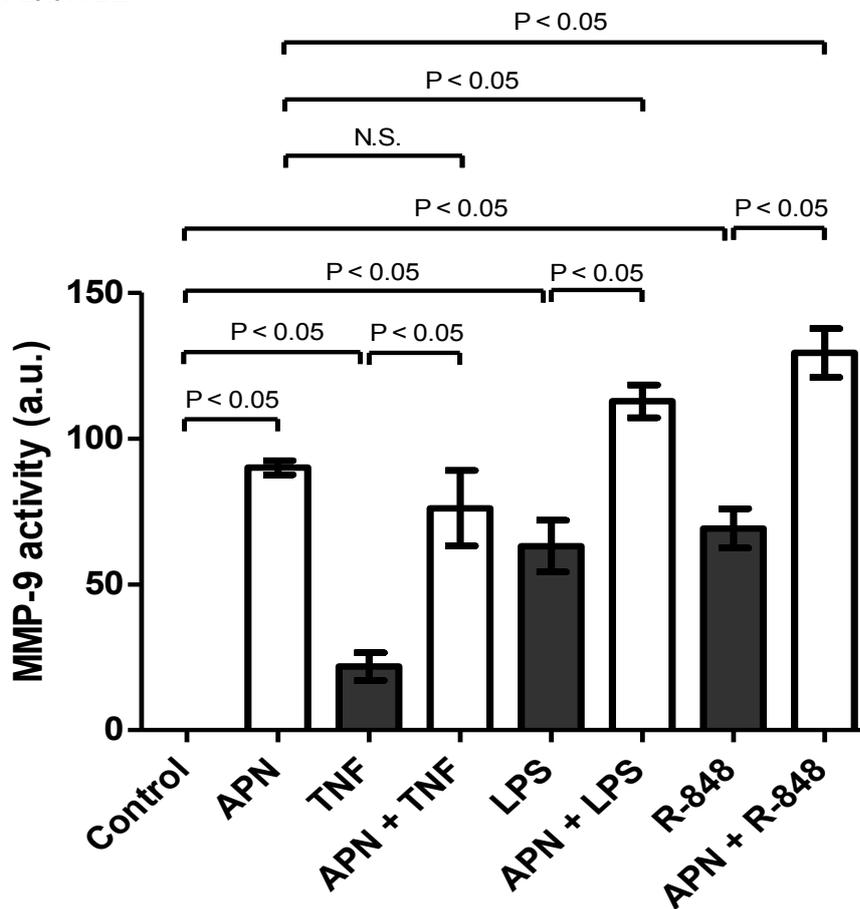


Abb.12A-B: APN verstärkt die MMP-9-Aktivierung nach proinflammatorischer Stimulation in neonatalen kardialen Fibroblasten. Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit APN (20 µg/ml) oder BSA (20 µg/ml) über 6h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit TNFα (10 ng/ml), LPS (1 µg/ml) und R-848 (5 µg/ml) über 18h. (A) Die Messung der MMP-9-Aktivität erfolgte mittels Zymographie aus dem Kulturmedium. (B) Quantitative Darstellung der MMP-9-Aktivität. Angabe in Mean ± SEM (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.7. Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte MMP-9-Aktivität nach kardialer Schädigung im Rahmen der experimentellen subakuten CVB3-Myokarditis

Die experimentelle CVB3-Myokarditis ist ein etabliertes Modell pathogen-induzierter entzündlicher Herzerkrankungen und ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes Remodeling der kardialen extrazellulären Matrix (Marchant et al., 2009). Um den Einfluss von APN auf die kardiale MMP-9-Aktivität im Rahmen der inflammatorischen Herzerkrankung zu untersuchen und die zuvor aufgeführten *In-vitro*-Ergebnisse zu bestätigen, erfolgte die Anwendung des CVB3-Myokarditismodells in Wildtyp- und APN-KO-Mäusen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13A-D dargestellt. In den nichtinfizierten Tieren ließen sich nur geringe kardiale MMP-9-Aktivitäten nachweisen und es war kein signifikanter Unterschied in der MMP-9-Aktivität bzw. dem MMP-9/MMP-2-Aktivitätsverhältnis zwischen der WT- und der APN-KO-Gruppe zu beobachten (Abb.13A, C-D). Im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis wiesen beide Gruppen am 7. Tag nach Infektion eine signifikant erhöhte kardiale MMP-9-Aktivität sowie ein signifikant erhöhtes MMP-9/MMP-2-Aktivitätsverhältnis (jeweils $p < 0,01$) im Vergleich zu den nichtinfizierten Tieren auf (Abb. 13A-D). Im Vergleich zur Gruppe der infizierten WT-Mäuse zeigte die Gruppe der infizierten APN-KO-Mäuse dabei jedoch einen signifikant verminderten Anstieg der MMP-9-Aktivität ($p < 0,01$) bzw. einen signifikant verminderten Anstieg des MMP-9/MMP-2-Aktivitätsverhältnis ($p < 0,05$) (Abb.13B-D). Diese Resultate bestätigen die in den verangegangenen Abschnitten dargestellten *In-vitro*-Ergebnisse eines spezifischen stimulierenden APN-Effektes auf die MMP-9-Expression in kardialen Myozyten und Fibroblasten.

Abb.13A

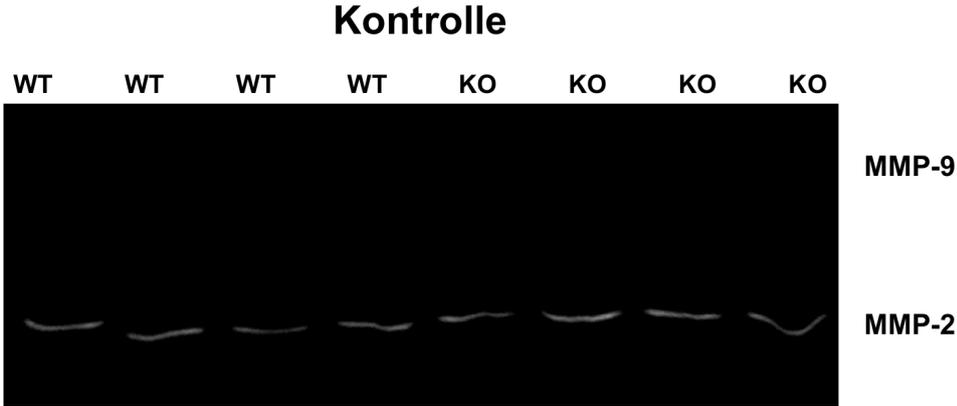


Abb.13B

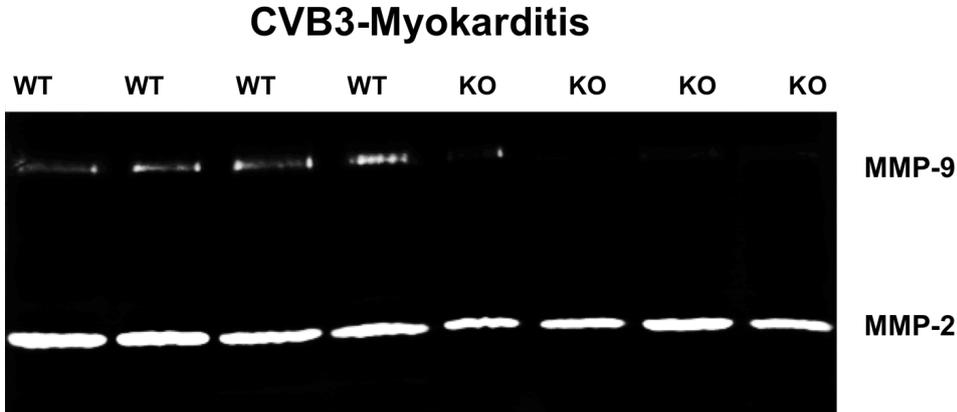


Abb.13C

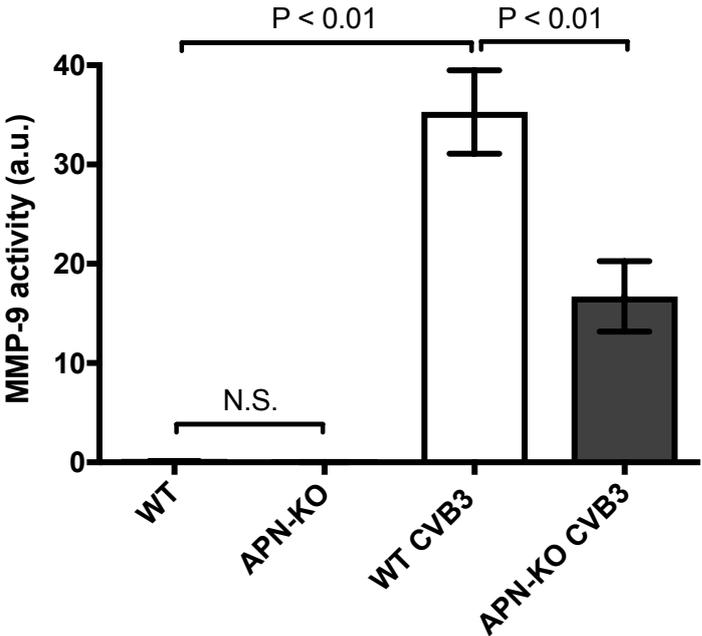


Abb.13D

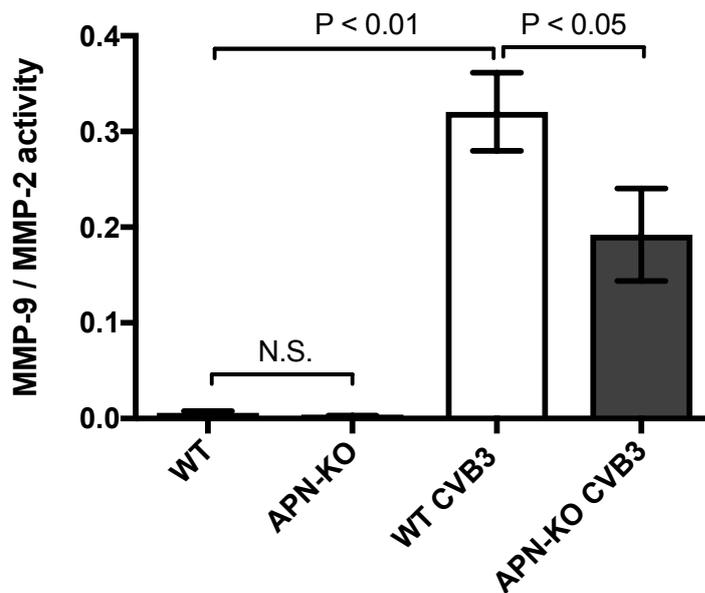


Abb.13A-D: APN-KO-Mäuse zeigen einer verminderte MMP-9-Aktivität im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis. (A-B) Die Messung der MMP-9- und MMP-2-Aktivität erfolgte mittels Zymographie. (C) Quantitative Auswertung der MMP-9-Aktivität. (D) Verhältnis der MMP-9- und MMP-2-Aktivität. Angaben in Mean ± SEM (n = 8-10 je Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.8. Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte MMP-9-Expression in der Milz im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis

Neben kardialen Fibroblasten stellen im Rahmen von entzündlichen Herzerkrankung den Herzmuskel infiltrierende Immunzellen wie dendritische Zellen und T-Zellen eine weitere Quelle der Expression von MMP-9 dar (Vermaelen et al., 2003; St-Pierre et al., 2000). Um zu untersuchen, ob APN auch einen Einfluss auf die Expression von MMP-9 in Immunzellen im Rahmen der CVB3-Myokarditis hat, erfolgte die Bestimmung der MMP-9-Expression bei APN-KO-Mäusen in Splenozyten der Milz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. APN-KO-Mäuse ohne CVB3-Infektion zeigten keinen signifikanten Unterschied der MMP-9-Expression gegenüber WT-Tieren. Im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis zeigte sich in WT- und APN-Knockouttieren am Tag 7 nach Infektion eine signifikant erhöhte Expression von MMP-9 ($p < 0,01$). APN-KO-Mäuse waren verglichen mit WT-Tieren zu diesem Zeitpunkt durch eine signifikant verminderte MMP-9-Expression charakterisiert ($p < 0,01$).

Abb.14

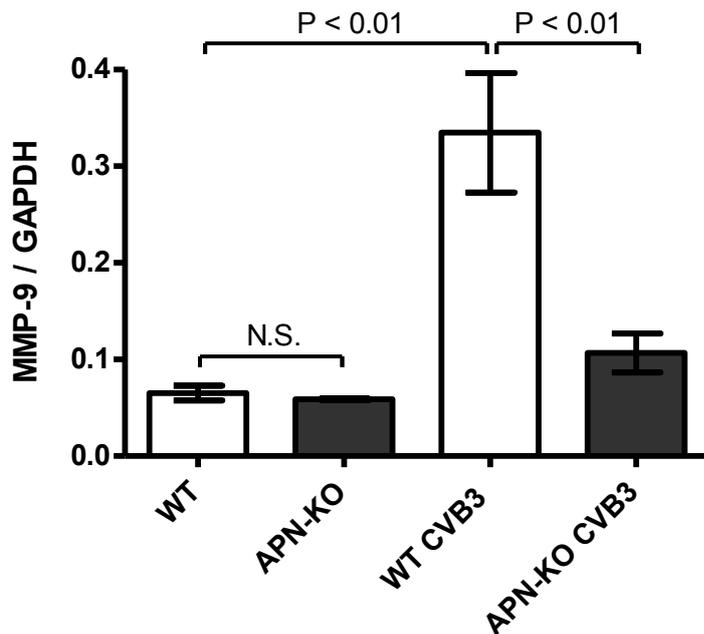


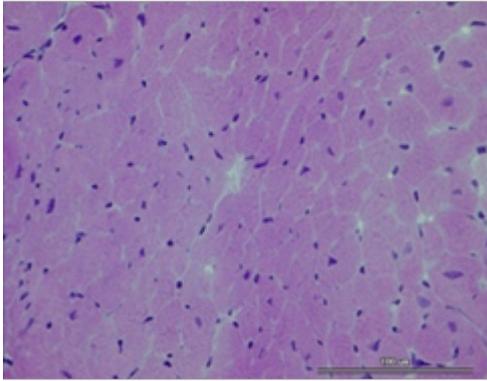
Abb.14: APN-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte Hochregulation von MMP-9 in der Milz im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis. Es erfolgte die Messung der MMP-9-mRNA-Expression in der Milz in Wildtyp- (WT) und APN-Knockoutmäusen (APN-KO) am Tag 7 post-infektionem im Rahmen der CVB3-Myokarditis mittels qRT-PCR. Angaben in Mean ± SEM (n = 5-6 Tiere pro Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.9. Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte kardiale Immunezellinfiltration im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis

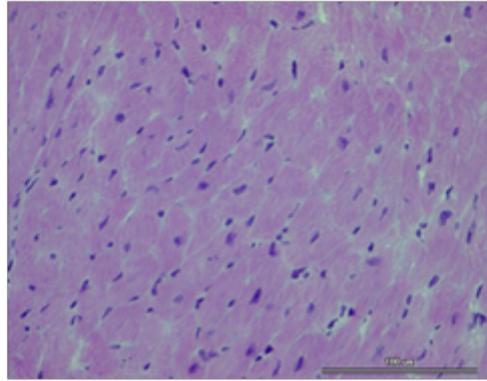
Um zu untersuchen, ob eine verminderte MMP-9-Expression bei CVB3-infizierten APN-KO-Mäusen auch mit einer verminderten Immunezellinfiltration im Herzmuskel assoziiert ist, erfolgte die HE-Färbung von Herzmuskelproben und die Erfassung des Immunezellinfiltrationscores. Beispiele für Schnitte mit HE-Färbung sind in Abbildung 15A dargestellt. Die Ergebnisse des Infiltrations-Score der jeweiligen Gruppen zeigt Abbildung 15B. Dabei zeigten nichtinfizierte APN-KO-Mäuse und WT-Mäuse keine nachweisbare Immunezellinfiltration, wohingegen CVB3-infizierte WT-Tiere eine signifikant verstärkte Immunezellinfiltration gegenüber nichtinfizierten WT-Tieren aufwiesen ($p < 0,01$). CVB3-infizierte APN-KO-Mäuse waren im Vergleich zu CVB3-infizierten Wildtyp-Tieren durch eine signifikant verminderte Immunezellinfiltration im Herzmuskel am Tag 7 post-infektionem gekennzeichnet ($p < 0,01$).

Abb.15A

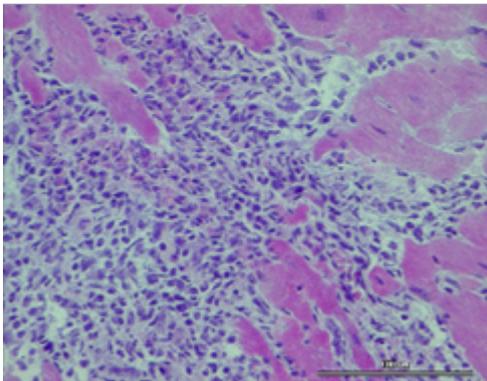
WT



APN-KO



WT CVB3



APN-KO CVB3

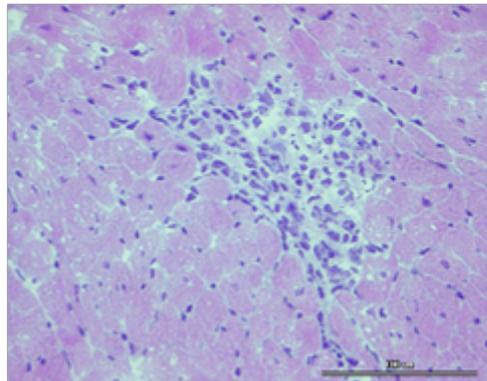


Abb.15B

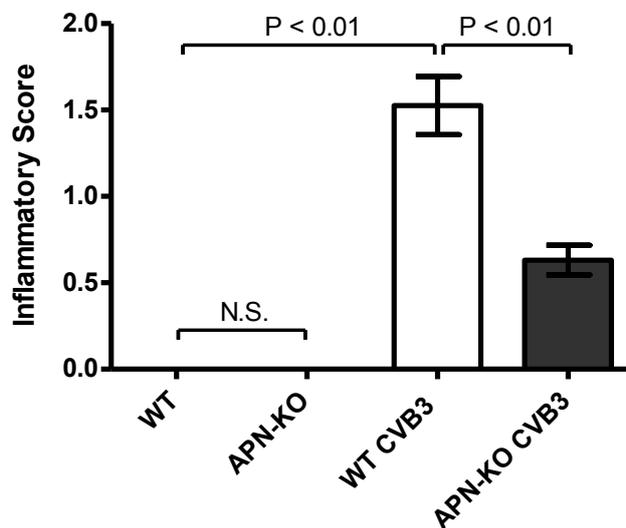


Abb.15A-B: APN-Knockoutmäuse (APN-KO) zeigen einer verminderte kardiaale Immunzell-Infiltration im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis. (A) Kardiale Immunzellinfiltration im HE-Schnitt des linken Ventrikels (LV) in WT- und APN-KO-Mäusen am Tag 7 post-infektionem. (B) Quantitative Auswertung des Inflammationsscores. Angabe in Mean ± SEM (n = 10-14 Tiere pro Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

Zur genaueren Spezifizierung der infiltrierenden Immunzellen erfolgte die Bestimmung der immunzellenspezifischen Oberflächenmarker NKp46 (natürliche Killerzellen), F4/80 (Makrophagen) CD3Z, CD4 und CD8a (T-Zellen) mittels qPCR im linksventrikulären Myokardgewebe (Jenke et al., 2014). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Gegenüber nichtinfizierten Mäusen zeigte sich in der subakuten CVB3-Myokarditis in WT- und APN-KO-Mäusen eine verstärkte Infiltration inflammatorischer Zellen einhergehend mit einer signifikanten Erhöhung der myokardialen Expression von NKp46, F4/80 und CD4. Allerdings war in der subakuten CVB3-Myokarditis in APN-KO-Mäusen die Expression von NKp46, CD3Z, CD4 und CD8a im Vergleich zu WT-Mäusen jeweils signifikant reduziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kardiale Immunzellinfiltration in WT- und APN-KO-Mäusen mit und ohne CVB3-Myokarditis. Mean \pm SEM; * signifikanter Unterschied vs. WT; # signifikanter Unterschied vs. WT CVB3.

	WT	APN-KO	WT CVB3	APN-KO CVB3
NKp46 / HPRT1	0.0011 \pm 0.0001	0.0013 \pm 0.0001	0.0481 \pm 0.0088*	0.0224 \pm 0.0033 [#]
F4-80 / HPRT1	0.2218 \pm 0.0256	0.2096 \pm 0.0088	1.3049 \pm 0.1673*	0.7939 \pm 0.0520 [#]
CD3z / HPRT1	0.0173 \pm 0.0032	0.0167 \pm 0.0011	0.0630 \pm 0.0135*	0.0300 \pm 0.0038 [#]
CD4 / HPRT1	0.0082 \pm 0.0006	0.0087 \pm 0.0008	0.0451 \pm 0.0102*	0.0206 \pm 0.0027 [#]
CD8a / HPRT1	0.0015 \pm 0.0003	0.0019 \pm 0.0002	0.0460 \pm 0.0082*	0.0223 \pm 0.0034 [#]

3.10. Adiponektin führt zu einer erhöhten Expression von MMP-9 im Herzen im Rahmen des Myokardinfarktes ohne Erreichen des Signifikanzniveaus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben kommt es im Rahmen des Myokardinfarktes mit Ausbildung einer Nekrose zur einer lokalen Inflammationsreaktion sowie zu erhöhter Vorlast und folgender erhöhter Wandspannung. Diese Vorgänge triggern ein kardiales Remodeling mit Fibrosierung und als Folge gegebenenfalls die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Um zu untersuchen, ob APN auch im Rahmen des Myokardinfarktes einen Einfluss auf die MMP-9-Expression ausübt, erfolgte die Induktion einer Myokardnekrose durch LAD-Ligatur und die Messung der MMP-9-Expression in WT- und APN-KO-Mäusen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16

dargestellt. Im Rahmen des Myokardinfarktes kam es zu einer signifikant erhöhten Expression von MMP-9 in WT- und APN-KO-Mäusen. Im Vergleich zur WT-Gruppe mit Myokardinfarkt zeigte die Gruppe der APN-KO-Mäuse mit Myokardinfarkt eine verminderte MMP-9-Expression ohne Erreichen des Signifikanzniveaus.

Abb.16A



Abb.16B

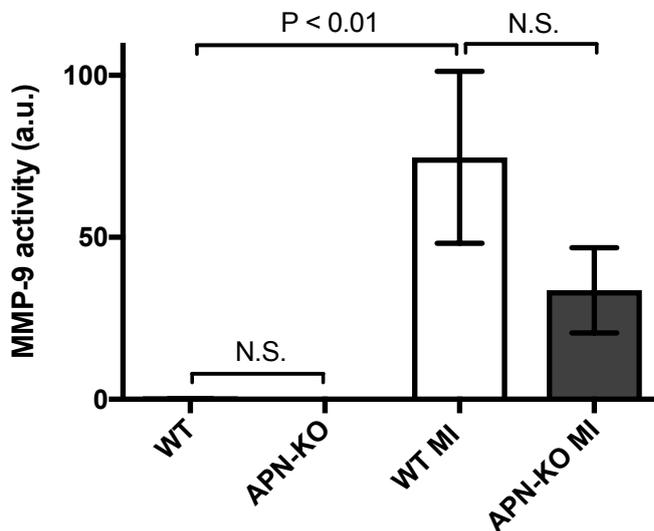


Abb.16A-B: MMP-9-Expression 4 Tage nach Myokardinfarkt (MI) in Wildtyp (WT)- und APN-KO-Mäusen (KO) im LV. Die Messung erfolgte mittels Zymographie. Angabe in Mean ± SEM (n = 4-6 Tiere je Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

3.11. Adiponektin-Knockoutmäuse zeigen eine verminderte Konzentration von Kollagen-Spaltprodukten (ICTP) im Rahmen der CVB3-Myokarditis

Eine reduzierte MMP-9-Aktivität weist auf einen verminderten MMP-vermittelten Umsatz der extrazellulären Matrix im Vergleich zu WT-Mäusen hin. Kollagen Typ I ist der Kollagentyp, welcher in der extrazellulären Matrix des Herzmuskels den Hauptanteil aller Kollagentypen, sowohl bei gesunden Probanden, als auch im Rahmen einer

myokardialen Fibrose darstellt (Spinale, 2007). Des Weiteren beschrieben Bigg et al. Kollagen Typ I als eine Substrat von MMP-9 (Bigg et al., 2007). Um zu untersuchen, ob bei APN-KO-Mäusen auch ein verminderter Umsatz von Kollagen Typ I als mögliche Folge einer verminderten MMP-9-Aktivität im Rahmen der CVB3-Myokarditis im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachzuweisen ist, erfolgte die Bestimmung von Kollagen Typ I –Spaltprodukten (ICTP (C-terminal telopeptide of collagen typ I)) im Serum von WT- und APN-KO-Mäusen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. In nicht infizierten Tieren zeigte sich kein Unterschied in der Serumkonzentration von ICTP zwischen APN-KO und WT-Tieren. In Übereinstimmung mit einer erhöhten Aktivität von MMP-9 7 Tage nach CVB3 Infektion waren infizierte Tiere durch erhöhte ICTP-Serumkonzentrationen gekennzeichnet. In Übereinstimmung mit einer verminderten MMP-9-Aktivität zeigten APN-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren eine signifikante Verminderung der gesteigerten Konzentration der Kollagen Typ I-Spaltprodukte im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis.

Abb.17

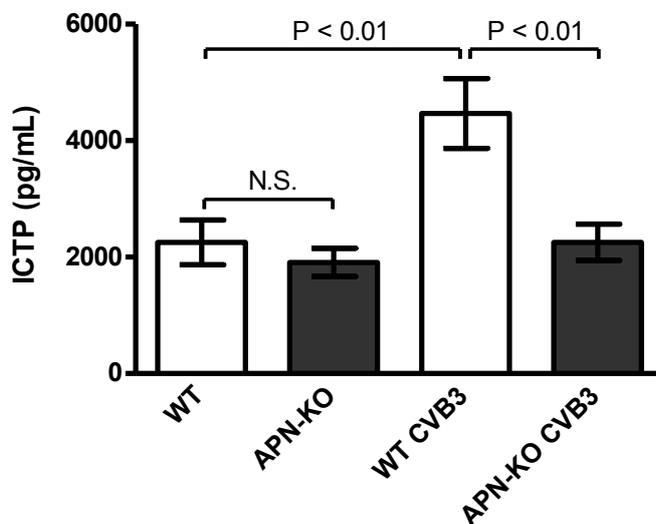


Abb.17: APN-KO-Mäuse zeigen einer Verminderte Konzentration von Kollagen I-Spaltprodukten im Vergleich zum WT im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis im Serum. Die Messung erfolgte am Tag 7 post-infektionem mittels ELISA (n = 8-11 Tiere pro Gruppe). Angaben in Mean ± SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Post-hoc-Testung mittels Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In kultivierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten führt APN zu einer Hochregulation der MMP-9-mRNA und Proteinexpression über eine Aktivierung von AMPK und ERK1/2 ohne Einfluss auf die Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-13. In kardialen Fibroblasten kontrolliert sowohl AMPK als auch ERK1/2 die Hochregulation der MMP-9-Expression durch proinflammatorische Stimuli. Entsprechend führte APN in kardialen Fibroblasten nach Triggerung durch LPS und R-848 zu einer weiteren Steigerung der Hochregulation von MMP-9 *ex vivo*. Die gemachten *In-vivo*-Beobachtungen bestätigen die *In-vitro*-Ergebnisse. Es zeigte sich eine Verminderung der kardialen MMP-9-Aktivität in APN-KO-Tieren im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis am Tag 7 post-infektionem und nach Induktion eines Myokardinfarkts, Letzteres jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus. Die MMP-9-Expression in der Milz war in APN-KO-Mäusen im CVB3-Myokarditismodell am Tag 7 post-infektionem ebenfalls vermindert und korrelierte mit einer verminderten Immunzellinfiltration im Herzmuskel dieser Tiere. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte eine signifikante Verminderung der Kollagenspaltprodukte (ICTP) im Herzmuskel bei APN-KO-Mäusen im Rahmen der subakuten CVB3-Myokarditis als Zeichen eines reduzierten Umsatzes von Kollagen Typ I gezeit werden. Diese Ergebnisse implizieren eine APN vermittelte Verminderung des adversen kardialen Remodelings nach kardialer Schädigung durch eine Hochregulation der MMP-9 Expression in kardialen und Immunzellen. APN vermittelt einen verstärkten Kollagenabbau, welcher die Inhibition der kardialen Fibrose mit Verbesserung der linksventrikulären Funktion erklären könnte. Wie bereits dargestellt ist die Fibrose ein Kennzeichen des kardialen Remodelings, welches im Rahmen von Erkrankungen wie DCM, Druckbelastung des Ventrikels, Myokardinfarkt und entzündlicher Herzerkrankungen auftritt und aufgrund von Funktionseinschränkungen durch diese Umbauvorgänge als adverses kardiales Remodeling bezeichnet wird (Cohn et al., 2000). Aufgrund der einerseits steigenden Bedeutung der Inflammation in der Pathophysiologie des adversen Remodelings im Rahmen verschiedener Erkrankungen und andererseits der dem APN zugeschriebenen breiten multifunktionalen antiinflammatorischen Wirkung könnte das Adipozytokin zukünftig ein mögliches Ziel neuer therapeutischer Interventionen darstellen.

4.2. Die Adiponektin-induzierte Hochregulation von MMP-9 über AMPK und ERK1/2

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass die Hochregulation von MMP-9 in neonatalen kardialen Fibroblasten und Myozyten durch APN erfolgt. Dabei zeigte sich in neonatalen kardialen Fibroblasten eine APN abhängige Aktivierung von AMPK (AMP-activated protein kinase) und ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2).

Eine mögliche Regulation von AMPK und ERK1/2 durch APN ist bereits in verschiedenen Studien in unterschiedlichen Zelltypen und anhand unterschiedlicher Modelle untersucht worden. Eine Entdeckung im Rahmen der myokardialen Hypertrophie war, dass ein Adiponektinmangel bei APN-KO-Mäusen mit einer fehlenden Phosphorylierung der kardialen AMPK einhergeht (Shimano et al., 2010). Später untersuchten Essick et al. den Einfluss von APN und oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auf das Remodeling und die Hypertrophie von kardialen Myozyten. Dabei zeigte sich in der Zellkultur ventrikulärer Kardiomyozyten eine Inhibition der Hypertrophie durch APN in Verbindung mit einer Aktivierung von AMPK, einer gleichzeitigen Hemmung von ERK1/2 sowie einer verminderten Expression von MMP-9. Nach Infusion von Angiotensin II wurde in APN-KO-Mäusen eine verminderte p-AMPK und eine vermehrte p-ERK1/2 Expression verbunden mit einer verstärkten MMP-9-Expression im Vergleich zu WT-Tieren beobachtet (Essick et al., 2011). Eine weitere Untersuchung hinsichtlich des Einflusses von APN auf AMPK und ERK1/2 stammt von Fujita et al., hier unter Verwendung von neonatalen kardialen Fibroblasten in der Zellkultur. Die Autoren konnten eine Aktivierung von AMPK entsprechend einer zunehmenden dosisabhängigen Phosphorylierung von AMPK (p-AMPK) durch APN wie in der vorliegenden Arbeit nachweisen. Gleichzeitig führte eine Inkubation von AT II zu einer Verminderung von p-AMPK und zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 (p-ERK1/2). Die zusätzliche Inkubation mit APN zeigte nachfolgend eine Umkehr der genannten Vorgänge mit einer Erhöhung von p-AMPK und einer Verminderung von p-ERK1/2 (Fujita et al., 2008).

Die beschriebenen Daten stehen hinsichtlich der Aktivierung von AMPK durch APN im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen. Auch hier konnte ein erhöhter Phosphorylierungsstatus von AMPK *in vitro* in der Zellkultur kardialer Fibroblasten nach Inkubation mit APN nachgewiesen werden. Fang et al. zeigten in ihrer Arbeit ebenfalls eine Aktivierung von AMPK durch APN über eine Phosphorylierung in Kardiomyozyten.

Diese Phosphorylierung scheint über eine APN-abhängige und AdipoR1-vermittelte Translokation der LKB1 (Liver kinase B1 (Synonym: STK11 (Serine/threonin Kinase 11)) aus dem Nucleus in das Zytosol zu erfolgen (Fang et al., 2010). Die Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus Skelettmuskelzellen. Zhou et al. zeigten in C2C12-Zellen eine Interaktion von APPL1 (Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1) mit den APN-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2, wobei APN die Interaktion von APPL1 mit AdipoR1, nicht aber mit dem AdipoR2 verstärkte. Diese führte ebenfalls zu einer Translokation von LKB1 aus dem Nucleus in das Zytosol und konsekutiv zu einer Phosphorylierung von AMPK. Als zweiten Weg der APN-abhängigen Phosphorylierung von AMPK identifizierte die gleiche Arbeitsgruppe die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese Aktivierung bedingt eine vermehrte Synthese von Inositoltriphosphat (IP3), welches seinerseits an den IP3-Rezeptor bindet und zu einer Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt. Dieses Kalzium aktiviert wiederum die CaMKK (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase), welche AMPK phosphoryliert. Die Hemmung von PLC mit einem spezifischen PLC-Inhibitor induzierte eine 30%ige Reduktion der APN-abhängigen AMPK-Phosphorylierung, sodass angenommen werden kann, dass dieser Aktivierungsweg im Vergleich zum APPL1/LKB1-abhängigen Aktivierungsweg eine untergeordnete Rolle spielt. (Zhou et al., 2009). Ob aber auch in kardialen Fibroblasten die adiponektinabhängige Aktivierung von AMPK über die oben genannten Signaltransduktionswege erfolgt, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden.

Die Regulation von ERK1/2 durch APN in den oben genannten Untersuchungen (Fujita et al., 2008; Essick et al., 2011) scheint widersprüchlich zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Diese könnte im Falle der Arbeit von Essick et al. auf die unterschiedlichen Zelltypen (Kardiomyozyten vs. Fibroblasten) zurückzuführen sein. Auch erfolgten alle *In-vitro*-Untersuchungen der kardialen Myozyten ausschließlich nach Inkubation mit H₂O₂ (als Reaktive Sauerstoffspezies) sowie die Inkubation mit rekombinanten APN über 18h (Essick et al., 2011). Im Falle der Arbeit von (Fujita et al., 2008) wurde der Einfluss von APN auf ERK1/2 nur im Zusammenhang mit einem zusätzlichen Agens (Inkubation von AT II + APN) untersucht. Eine Inkubation nur mit APN mit nachfolgender Messung von p-ERK1/2 ist in beiden genannten Untersuchungen nicht erfolgt. Zusätzlich unterschied sich auch bei Fujita et al. die Inkubationszeit der kardialen Fibroblasten mit APN, wobei hier für 120min inkubiert

wurde (Fujita et al., 2008), in der vorliegenden Untersuchung für maximal 60min. Entsprechend kann in der vorliegenden Arbeit ein Abfall der p-ERK1/2-Konzentration nach 120 min nicht ausgeschlossen werden.

Auch der Einfluss von AMPK und ERK1/2 auf die Expression von MMPs war bereits Ziel mehrerer Studien. Hinsichtlich der Rolle von AMPK als Teil der Signalkaskade der MMP-9-Expression zeigten Morizane et al. eine erhöhte Expression von MMP-9 bei AMPK α -Knockoutmäusen in embryonalen Fibroblasten. Umgekehrt führte die Aktivierung von AMPK zu einer verminderten MMP-9-Expression (Morziane et al., 2011). Dieser Widerspruch gegenüber den Daten der vorliegenden Arbeit ist ggf. durch die Quelle der Fibroblasten (kardiale neonatale Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit und embryonale Fibroblasten in der Studie von Morizane et al.) erklärbar. Auch unterscheidet sich das Modell durch die Verwendung von AMPK-Knockoutmäusen grundsätzlich. Sowohl Morizane et al. als auch die vorliegende Arbeit konnte keinen Zusammenhang zwischen AMPK und der Expression von MMP-2 herstellen. Dagegen wiesen Wang et al. eine vermehrte Expression von MMP-2 durch AMPK α 2 in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC = vascular smooth muscle cells) nach (Wang et al., 2012). In Chondrozyten führt die Aktivierung von AMPK (durch APN) zu einer vermehrten Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 (Kang et al., 2010). Zusammenfassend ist die Regulation von MMPs komplex. Die Regulation der MMPs insbesondere durch AMPK scheint sich in verschiedenen Zelltypen teilweise gegensätzlich zu unterscheiden.

Hinsichtlich der Regulation von MMP-9 durch ERK1/2 konnte in unterschiedlichen Zelltypen eine erhöhte Expression von MMP-9 durch ERK1/2 nachgewiesen werden (Moshal et al., 2006, Moon et al., 2004, Cho et al., 2000). In adulten kardialen Fibroblasten zeigten Xie et al., dass eine Hemmung der MAPK ERK1/2 und JNK zu einer Hemmung der IL-1 β induzierten erhöhten Expression von MMP-9 führt, ohne Einfluss auf MMP-2 (Xie et al., 2004). Diese Untersuchungen stehen im Einklang mit der hier vorgelegten Studie, in der APN in neonatalen Fibroblasten zu einer Aktivierung von ERK1/2 mit konsekutiv erhöhter MMP-9-Expression führte.

Die Inflammation ist ein wichtiger Teil des kardialen Remodellings des akuten Myokardinfarktes (Westman et al., 2016). Dabei spielt das proinflammatorische Zytokin IL-1 β eine wichtige Rolle (Bujak et al., 2009). Nach myokardialer Schädigung führen lokale und endogen ausgeschüttete TLR-Liganden über eine Modulation der Funktion kardialer Fibroblasten zu einer Änderung des Expressionsmusters von Komponenten

der extrazellulären Matrix und der Expression von Metalloproteinasen (Manabe et al., 2002). IL-1 β beispielsweise reguliert neben der Produktion von Kollagen auch die Expression von MMPs und TIMPs in kardialen Fibroblasten (Bujak et al., 2009). Insbesondere die Expression von MMP-9 in kardialen Fibroblasten ist als Antwort auf proinflammatorische Stimuli gesteigert (Siwik et al., 2000).

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung proinflammatorischer Stimulantien (TLR-Liganden LPS und R-848) AMPK und ERK1/2 als wichtige Regulatoren einer entzündungs-induzierten Expression von MMP-9 in kardialen Fibroblasten/Myozyten identifiziert. In diesem Zusammenhang steigerte APN die Inflammations-induzierte Expression von MMP-9 *in vitro*.

4.3. Adiponektin und MMP-9 in der viralen Myokarditis

Verschiedene Studien haben den Einfluss von APN auf die Expression von Zytokinen und die Immunzellinfiltration im Myokard im Rahmen von viralen Myokarditiden untersucht. Takahashi et al. beschrieben den Einfluss von APN in einem Modell der Enzephalomyokarditis-Virus Myokarditis in adipösen Mäusen mit Leptinmangel. Die Autoren konnten eine signifikante Verminderung von APN-mRNA und Proteinkonzentration im Herzen der übergewichtigen Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren nachweisen. Diese verminderte APN-mRNA-Expression war mit einer signifikanten Erhöhung von TNF α -mRNA- und Proteinkonzentration am Tag 4 und Tag 8 post-infektionem verbunden. Assoziiert mit diesen Beobachtungen zeigten die Tiere mit Leptinmangel schwerere myokardiale Nekrosen, eine gesteigerte Apoptoserate und vermehrte kardiale mononukleäre Zellinfiltrationen mit einem signifikant erhöhten inflammatorischen Score gegenüber den WT-Tieren. Die Substitution von Leptin in den adipösen Mäusen führte zu einer verminderten Ausprägung der Myokarditis mit Hochregulation der APN-mRNA- und Proteinexpression sowie einer erhöhten Expression von AdipoR1 in Kardiomyozyten. Gleichzeitig war nach Substitution von Leptin und resultierender APN-Hochregulation eine Verminderung der TNF α -mRNA- und Proteinkonzentration nachweisbar. Histologisch zeigte sich hinsichtlich der Zellinfiltrationen und der Apoptoserate nach Leptinsubstitution und entsprechender APN-Hochregulation kein signifikanter Unterschied zu den WT-Tieren (Takahashi et al., 2006).

Die histologischen Ergebnisse dieser Untersuchung stehen im Widerspruch zu der vorliegenden Studie, in der in APN-KO-Mäusen mit CVB3-Infektion verminderte inflammatorische Infiltrate nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig waren in der vorliegenden Arbeit in diesen Tieren die Oberflächenmarker NKp46, F4/80, CD3z, CD4 und CD8a vermindert nachweisbar. Die Diskrepanz der Beobachtungen könnte in der Verwendung unterschiedlicher viraler Erreger und Modelle der Myokarditis sowie dem Einsatz von adipösen Mäusen mit Leptinmangel erklärt werden. Außerdem erfolgte die Untersuchung von Takahashi et al. mit kleineren Fallzahlen (4-6 Tiere pro Gruppe) (Takahashi et al., 2006).

Auch in anderen Myokarditismodellen konnte ein antiinflammatorischer Effekt von APN nachgewiesen werden. So zeigt die Arbeit von Jenke et al. am Modell der experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) eine protektive antiinflammatorische Wirkung von APN (Jenke et al., 2013). Die Induktion einer EAM führte zunächst zu einer erhöhten kardialen Expression von TLR4 sowie proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF α . Eine APN-Überexpression durch einen Adiponektin-Gentransfer war verbunden mit einer signifikanten Verminderung der Expression proinflammatorischer Zytokine sowie einer verminderten mononuklären Zellinfiltration und verringerter myokardialer Schädigung, gemessen anhand der Apoptoserate und der Troponin I- Serumkonzentration. *In vitro* wurde eine Hemmung der TLR4-Signalkaskade durch eine Inhibition der NF- κ B- abhängigen IL-6- und TNF α -Expression nachgewiesen (Jenke et al., 2013). Zusammenfassend charakterisiert das Beispiel der EAM abermals die antiinflammatorischen Wirkungen von APN. Die beobachtete verminderte Immunezellinfiltration nach APN- Überexpression im EAM-Modell scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu stehen. In der Arbeit von Jenke et al. erfolgte eine Überexpression von APN mittels eines Vektors und die histologische Untersuchung am Tag 21 nach Immunisation (Jenke et al., 2013), während in der hier vorliegenden Arbeit mit APN-KO-Tieren gearbeitet und die histologischen Untersuchungen am Tag 7 postinfektionem durchgeführt wurden. Abgesehen von methodischen Unterschieden dürfen auch die unterschiedlichen Myokarditismodelle (EAM vs. CVB3) nicht gleichgesetzt werden. Die EAM wird durch ein chronisches Autoimmuninfiltrat charakterisiert, während eine CVB-Virusmyokarditis eine pathogeninduzierte Entzündungsreaktion darstellt. Eine antiinflammatorische Wirkung von Adiponektin ist protektiv im Autoimmun- Myokarditis-Modell, während eine Hemmung der Entzündungsreaktion im CVB3-Modell die Clearance des Pathogens

verzögern sollte. Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte sich eine verminderte Immunzellinfiltration in APN defizienten Mäusen in der vorliegenden Arbeit, während Jenke et al. in ihrer Untersuchung von 2014 am Modell der CVB3-Myokarditis eine verstärkte Immunzellinfiltration in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis nach APN- Überexpression nachwies (Jenke et al., 2014). Grundsätzlich müssen in der CVB3-Myokarditis eine akute, und subakute Phase der Erkrankung unterschieden werden, da diese durch Unterschiede im Zytokinmilieu und in der Zusammensetzung der infiltrierenden Zellen charakterisiert sind. In der Untersuchung von Jenke et al. waren in der akuten Phase der Erkrankung (Tag 3 post-infektionem) eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine (IFN β , IFN γ , IL-12 und TNF α) verbunden mit einer gesteigerten Infiltration von proinflammatorischen M1-Makrophagen und aktivierten NK-Zellen im Sinne einer gesteigerten angeborenen Immunantwort in APN-defizienten Mäusen nachweisbar. Diese Hochregulation der innate Immunantwort wurde durch einen APN- Gentransfer inhibiert. Demgegenüber zeigte sich in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis (Tag 7 post-infektionem) eine verminderte Infiltration von inflammatorischen Zellen mit Verminderung der kardialen Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF α) in APN-KO-Tieren im Sinne einer schnelleren Clearance des Virus, während die inflammatorische Komponente nach APN-Gentransfer signifikant stärker ausgeprägt war (Jenke et al., 2014). Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit eine verminderte Immunzellinfiltration in APN-KO-Mäusen in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis. Diese Daten sind mit einem antiinflammatorischen Effekt von Adiponektin bzw. einer überschießenden innate Immunantwort und besserer viraler Clearance nach CVB3 Infektion in APN- KO-Tieren vereinbar.

Eine Migration von Entzündungszellen (z.B. T-Zellen, Monozyten) durch eine Gewebe setzt eine Lyse der ECM voraus. Hierfür sind Entzündungszellen in der Lage, Matrix-Metalloproteinasen zu exprimieren und zu sezernieren. Induziert wird dies über die Synthese von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 durch das „entzündete“ Endothel. Eine Bindung von T-Zellen und Monozyten an diese Adhäsionsmoleküle induziert eine Expression von MMPs, unter anderem auch von MMP-9. Die Sekretion dieser MMPs befähigt die Entzündungszellen, das Endothel zu durchschreiten und in das Gewebe einzudringen. Ein APN-Mangel führt zwar zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion an das Endothel (Lang et al., 2009), könnte jedoch die eigentliche Zellmigration durch einen folgenden Mangel an hierfür benötigten MMPs vermindern

(St-Pierre et al., 2000). APN-KO Tiere waren in unserer Arbeit durch eine verminderte MMP-9-mRNA-Expression in Splenozyten charakterisiert. Kardial zeigte sich eine verminderte Immunezellinfiltration in Verbindung mit einer verminderten MMP-9-Aktivität in APN-KO-Mäusen. Insofern scheinen nicht nur die APN-Plasmakonzentrationen (Bobbert et al., 2011), sondern auch die APN-Konzentrationen im Myokard (Jenke et al., 2014) mit der Immunezellinfiltration im Zusammenhang zu stehen. Eine erniedrigte APN Konzentration in unserem Modell könnte direkt über eine verminderte Chemokinexpression die Migration von Immunezellen inhibieren (Jenke et al., 2014), zum anderen aber indirekt über eine verminderte Expression von MMP-9 in Splenozyten deren Transmigration in das Myokard hemmen. Insofern stellt der Nachweis einer verminderten MMP-9-Expression insbesondere in Splenozyten bei APN-defizienten Mäusen in der vorliegenden Studie eine weitere Erklärung für die in der CVB3-Myokarditis beobachtete verminderte kardiale Akkumulation mononukleärer Zellen dar.

Den Zusammenhang zwischen Inflammation und kardialem Remodeling untersuchten Bobbert et al. in einer Studie mit 173 Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) (Bobbert et al., 2011). Die Autoren konnten einen inhibitorischen Effekt von APN auf die chronische autoimmune Entzündungsreaktion sowie auf das kardiale Remodeling im Verlauf der Erkrankung nachweisen. Patienten mit DCMi wiesen signifikant höhere APN-Plasmakonzentrationen bei Studienbeginn (im Durchschnitt $35 \pm 5,65$ Tage nach Auftreten von Symptomen einer Herzinsuffizienz und nach angiographischen und echokardiographischen Ausschluss anderer Ursachen einer kardialen Dysfunktion) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit DCM ohne kardiale Inflammation auf. Diese erhöhten APN-Plasmakonzentrationen korrelierten direkt mit der Serumkonzentration von inflammatorischen Markern wie CRP, IL-8 und löslichen TNF-Rezeptor1 sowie mit dem Grad der kardialen Infiltration inflammatorischer Zellen ($CD3^+$ - und $CD45R0^+$ Zellen). Auch konnte bei Studienbeginn eine erhöhte APN-mRNA-Expression im Herzen nachgewiesen werden, welche indirekt mit der Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion korrelierte. Interessanterweise zeigen im Follow-up nach 6 Monaten die Patienten mit inflammatorischer DCM und initial hohen APN-Konzentrationen eine im Vergleich zu der Patientengruppe mit initial niedrigen APN-Plasmakonzentrationen eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion und eine Verminderung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters. In Übereinstimmung mit diesen Daten

war in Kontrollbiopsien nach 6 Monaten eine signifikant verminderte myokardiale Infiltration mit CD3-T-Zellen im Vergleich zur initialen Myokardbiopsie in Patienten mit hoher APN-Expression nachweisbar. *In-vivo*-Daten derselben Arbeit zeigten eine erhöhte kardiale APN-Expression 3 Wochen nach Induktion einer experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) in der Maus und eine vermehrte Expression von TNF α und IL-17, zwei Zytokinen, denen eine Schlüsselrolle in der Persistenz und Progression der inflammatorischen Antwort im Rahmen der EAM zukommt. Diese vermehrte Expression war nach APN-Gentransfer im Rahmen der EAM vermindert, was auf eine antiinflammatorische Wirkung von APN hinweist (Bobbert et al., 2011).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die antiinflammatorische Rolle von APN nicht nur im Mausmodell nachweisbar, sondern auch auf den menschlichen Organismus übertragbar ist. Die initial vermehrten Zellinfiltrationen bei DCMi Patienten verbunden mit erhöhten APN-Plasmakonzentrationen und Hochregulation der kardialen APN-Expression stehen im Einklang mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten verminderten kardialen Zellinfiltration bei APN-defizienten Mäusen. Eine Erklärung wäre auch hier eine Regulation der Expression von MMP-9 als Voraussetzung für eine suffiziente Zellmigration (St-Pierre et al., 2000). Desweiteren charakterisieren Bobbert et al. eine direkte Assoziation von hoher APN-Expression und einer Inhibition des adversen Remodelings bei der humanen inflammatorischen DCM. Die beobachtete verbesserte LV-Funktion und der signifikant verminderte LVEDD (Bobbert et al., 2011) könnte Folge einer durch APN induzierten vermehrten MMP-9-Expression mit der Folge einer Inhibition des adversen Remodelings sein. Ein gesteigerter Kollagenabbau mit erhöhtem Nachweis von Kollagenspaltprodukten (ICTP), wie in der vorliegenden Studie beobachtet, könnte hierzu beitragen. Diese Hypothese wird durch weitere Untersuchungen, welche im Modell der experimentellen CVB3-Myokarditis eine Hochregulation der MMP-9-Expression nachgewiesen haben, unterstützt (Marchant et al., 2009; Li et al., 2002; Cheung et al., 2006).

Neben seiner proteolytischen Wirkung auf die extrazelluläre Matrix besitzt MMP-9 auch immunmodulatorische Effekte aufgrund der proteolytische Aktivierung und Inaktivierung unterschiedlicher Zytokine und Chemokine. Beispielsweise wurde in der Zellkultur von Fibroblasten gezeigt, dass MMP-9 IL-1 β spaltet und inaktiviert (Ito et al., 1996). Cheung et al. wiesen in MMP-9-KO-Mäusen eine erhöhte Expression von IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-10 und MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α) im Rahmen der CVB3-Myokarditis am Tag 9 postinfektionem im Vergleich zu WT-Tieren nach. Assoziiert mit

der verstärkten kardialen Entzündungsreaktion wurde eine ausgeprägte myokardiale Schädigung (gesteigerte Myozytolyse und Kalzifizierungen) sowie eine erhöhte intramyokardiale Viruslast in MMP-9-KO-Tieren beschrieben. Interferone sind mitentscheidend für das Rekrutment von Immunzellen an den Ort der myokardialen Schädigung. Die Beobachtung einer fehlenden proteolytischen Spaltung von IFN- β durch MMP-9 mit resultierend erhöhten IFN- β Spiegeln sind ursächlich für die beobachtete gesteigerte Infiltration des infizierten Myokards mit CD45⁺-Entzündungszellen in MMP-9-KO-Tieren in diesem Modell. Gleichzeitig wiesen MMP-9-KO-Mäuse eine signifikant erhöhte Fibrosierung mit gesteigerter Kollagenansammlung im infizierten Myokard auf. Echokardiographisch waren neben einer verminderten linksventrikulären Funktion auch eine Verminderung der E-Welle als Hinweis auf eine diastolische Funktionsstörung als Zeichen des adversen kardialen Remodellings nachweisbar (Cheung et al., 2008). Die Daten in APN-KO Mäusen in der hier vorliegenden Studie zeigten eine verminderte Immunzellinfiltration verglichen mit WT-Tieren am Tag 7 post-infectionem, verbunden mit einer verminderten MMP-9-Aktivität im Myokard. Eine Erklärung für diese teils diskordanten Befunde verglichen mit Cheung et al. stellt die bestehende Restaktivität von MMP-9 bei APN-KO-Mäusen in unserem Modell dar. Zweitens sind temporäre Schwankungen (akute, subakute Phase der CVB3 Myokarditis) der Expression zu berücksichtigen, die gegenläufig sein können. Drittens ist der antiinflammatorische Effekt von APN mit der Beeinflussung verschiedener Prozesse der innate Immunität in diesem pathogen-induzierten Modell der Myokarditis als dominant anzusehen (Jenke et al., 2014), sodass die immunmodulatorischen Effekte einer verminderten MMP-9 Expression in unserem Modell wahrscheinlich nicht so stark zur Aussprägung kommen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie erstmals eine Assoziation zwischen der Regulation von MMP-9 und APN im Rahmen der CVB3-Myokarditis. Dabei wurde eine verminderte MMP-9-Expression und MMP-9-Proteinaktivität in APN-KO-Mäusen verbunden mit einer verminderten Akkumulation von Entzündungszellen im Myokard nachgewiesen. Die Ergebnisse einer verringerten Expression und Aktivität von MMP-9 in APN-defizienten Tieren *in vivo* bestätigen die Daten in der *In-vitro*-Zellkultur. Hier zeigte sich nach APN-Stimulation ohne und mit inflammatorischer Aktivierung der kardialen Fibroblasten eine signifikant erhöhte MMP-9 Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Frage, ob die *in vivo* beobachtete verminderte MMP-9-Expression in APN-KO Mäusen und deren differentielle Expression im Rahmen der CVB3-

Myokarditis auch über AMPK und/oder ERK1/2 abhängige Signaltransduktionswege reguliert wird kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden und bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

4.4. Adiponektin und MMP-9 im Rahmen des Myokardinfarktes

Die intensivsten Untersuchungen hinsichtlich des kardialen Remodelings stammen aus dem Modell des Myokardinfarktes. Gleichzeitig stellt Remodelling für diese Patientengruppe einen die Mortalität beeinflussenden Faktor dar (Cohn et al., 2000). APN scheint ein vielversprechender Kandidat für eine mögliche therapeutische Intervention des kardialen Remodelings nach Infarkt zu sein. So zeigte die Arbeitsgruppe von Shibata et al. eine Inhibition des myokardialen Remodelings durch APN (Shibata et al., 2007). Dabei waren APN-KO Mäuse in einem Modell des akuten Myokardinfarktes durch eine signifikante linksventrikulären Dilatation, eine ausgeprägteren Hypertrophie von Kardiomyozyten und einen verminderten maximalen intraventrikulären Druckanstieg (dP/dt_{max}) als Zeichen einer eingeschränkten linksventrikulären Kontraktilität charakterisiert. Histologisch zeigten APN-KO-Mäuse eine vermehrte Fibrose 4 Wochen nach Myokardinfarkt im Vergleich zum Wildtyp, verbunden mit einer verminderten Kapillardichte in der Periinfarktzone und erhöhter Apoptoserate. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von APN im Wildtyp nach Myokardinfarkt zu einer verminderten Hypertrophie, signifikant höherer Kapillardichte und verminderter Apoptose im Vergleich zu Wildtypmäusen ohne APN-Überexpression. Auch echokardiographisch kam es zu einer Verbesserung der Ventrikelfunktion mit sinkendem LVEDP (Linksventrikulären endistolischer Druck), verminderter LV-Dilatation und gesteigertem dP/dt_{max} (Shibata et al., 2007). Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass APN den myokardialen Schaden nach Ischämie inhibiert.

Die vorliegende Studie zeigt erstmals eine APN-induzierte Hochregulation von MMP-9-mRNA und MMP-9-Proteinexpression in kardialen Myozyten und Fibroblasten. Gleichzeitig war in der Zellkultur eine vermehrte Expression von MMP-9 mit einer gesteigerten MMP-9-Aktivität in beiden Zelltypen vergesellschaftet. Die Rolle von MMP-9 im Rahmen des Myokardinfarktes wurde bereits durch andere Studien untersucht. Diese Untersuchungen zeigten eine Hochregulation der MMP-9-Expression im Rahmen des Myokardinfarktes (Romanic et al., 2001, Kelly et al., 2007). Dabei ergeben sich in

den bisherigen Veröffentlichungen Teils divergente Ergebnisse. In der Betrachtung der Wirkung von MMP-9 muss dabei aber auch immer der zeitliche Verlauf der MMP-9-Expression bedacht werden. Kelly et al. zeigten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine initiale Peakphase der MMP-9-Plasmakonzentration bis 12h und einer anschließenden Plateauphase 12h nach Myokardinfarkt. Dabei waren höhere Plasmakonzentration während der Plateauphase (nach 12h) mit einer relativ besseren LV-Funktion sowie einem geringer ausgeprägten Remodeling mit einem relativ geringeren LV-Dilatation (LVEDV) im Vergleich zur Gruppe mit niedrigeren MMP-9-Plasmakonzentrationen assoziiert (Kelly et al., 2007). Demgegenüber stehen Untersuchungen am Mausmodell wie von Ducharme et al.: Hier wurde anhand von MMP-9-Knockoutmäusen gezeigt, dass ein Mangel an MMP-9 zu einer geringeren LV-Dilatation (verminderter endsystolischer- und enddiastolischer Diameter), nachweisbar am Tag 8 und Tag 15 nach Myokardinfarkt, führt (Ducharme et al., 2000). Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten mit einer kompensatorisch erhöhten Expression von anderen MMPs bei MMP-9-KO-Mäusen erklärt werden, wie sie für MMP-2 und MMP-13 bei Ducharme et al., interessanterweise auch bei nichtoperierten MMP-9-KO-Sham-Tieren beobachtet werden konnte (Ducharme et al., 2000), erklärt werden.

Ein Einfluss von APN auf die Expression von anderen MMPs wie MMP-2, MMP-3 und MMP-13 zeigte sich in kardialen Myozyten und Fibroblasten der hier vorliegenden Studie nicht. Diese fehlende Regulation weiterer MMPs durch APN ist konträr zu anderen vorangegangenen Veröffentlichungen. Dadson et al. wiesen eine AMPK-abhängige MMP-2- und MMP-13-Expression und -Aktivität durch APN nach (Dadson et al., 2014). Dieser Widerspruch könnte in den unterschiedlichen Isoformen von APN (globuläres vs. full length APN) oder in den verschiedenen Quellen des verwendeten rekombinanten APN (Eigenherstellung vs. industrielle Produktion in der vorliegenden Untersuchung) begründet sein. Auch unterschieden sich die verwendeten Zelltypen in den genannten Studien und der vorliegenden Arbeit. Als weitere Ursache kommt auch eine mögliche Endotoxin-Kontamination, auch im Falle von nicht-bakteriell hergestelltem rekombinanten APN, in Frage. Turner et al. zeigten, dass Lipopolysaccharid, wie es in Konzentrationen von bis zu 30 pg/ μ g in verschiedenen rekombinanten APN-Isolationen messbar war, einen Einfluss auf die Sensitivität des TLR- (Toll-like-receptor) Signaltransduktionsweges hatte (Turner et al., 2009). Die Signalkaskade der TLR-Familie mündet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-

κ B, der die Expression unterschiedlicher inflammatorischer Zytokine, unter anderem TNF α (Kawai et al., 2007), hochreguliert. Außerdem gilt NF- κ B wie bereits diskutiert, als Transkriptionsfaktor von MMP-9 (Bond et al., 1998). Lipopolisaccharid ist hitzebeständig und kann durch Erwärmen nicht inaktiviert werden (Gao et al., 2006). Aus diesen Gründen erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit ein Erhitzen des rekombinanten Materials als Kontrollexperiment und entsprechend der Nachweis, dass die beobachtete Hochregulation von MMP-9 auf den Einfluss von APN, und nicht auf den Einfluss von LPS zurückzuführen ist.

Die Kollagensynthese wird durch Zytokine beeinflusst. (Myo-) Fibroblasten synthetisieren das für die Fibrose charakteristische Kollagen. Ein regulatorisches Zytokin der inflammatorischen Aktivierung von Fibroblasten beim Myokardinfarkt stellt IL-1 β dar (Bujak et al., 2009, Spinale et al., 2007). So führt IL-1 β im ischämischen Myokard zur Aktivierung apoptotischer Signaltransduktionswege und zur Kollagen-Synthese. Umgekehrt führt eine Überexpression des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) im Maus- und Rattenmodell bei Myokardinfarkt zu einer Verminderung der Infarktgröße, verminderter Apoptoserate, einer verminderten kardialen Dilatation und in der Inflammationsphase nach Infarkt zu einer verminderten Infiltration des ischämischen Myokards mit neutrophilen Granulozyten (PMN) (Bujak et al., 2009). Ito et al. konnten wie bereits erwähnt zeigen, dass der Spaltung und somit der Inaktivierung von IL-1 β durch MMP-9 (sowie MMP-1, MMP-2 und MMP-3) eine bedeutende Rolle zukommt (Ito et al., 1996). Die erhöhte myokardiale Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β über Wochen nach stattgehabtem Myokardinfarkt ist mit einer signifikanten Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers verbunden (Ono et al., 1998). Somit könnte neben der direkten Spaltung von Kollagen durch MMP-9 die antifibrotische Wirkung und der positiver Einfluss von MMP-9 auf das kardiale Remodelling auch über einen regulatorischen Effekt durch den Abbau von Zytokinen bedingt sein. Durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Regulation von MMP-9 durch APN könnte damit der Abbau von proinflammatorischen Zytokinen einen weiteren Mechanismus der Wirkung von APN auf das kardiale Remodelling darstellen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für den experimentellen Myokardinfarkt ähnliche Ergebnisse wie für die experimentellen CVB3-Myokarditis. Am 4.Tag nach LAD-Ligatur kam es zu einer signifikant erhöhten kardialen MMP-9-Aktivität in Wildtypmäusen im Vergleich zur Sham-Gruppe. Diese erhöhte MMP-9-Aktivität war in APN-

Knockoutmäusen mit Myokardinfarkt vermindert nachweisbar, allerdings ohne Erreichen des Signifikanzniveaus. Die MMP-9 Expression in diesem Modell ist lokal und temporär unterschiedlich, sodass weitere Untersuchungen zur definitiven Charakterisierung der APN-Wirkungen notwendig sind. Vorangegangene Untersuchungen zeigten im Rahmen unterschiedlicher Herzerkrankungen bereits, dass APN ein adverses kardiales Remodelling inhibieren kann (Shibata et al., 2004; Fujita et al., 2008; Shibata et al., 2007). Verglichen mit Wildtypmäusen waren APN-Knockoutmäuse nach Infarkt durch eine signifikant vermehrte kardiale Fibrose, Hypertrophie, verminderte LV-Funktion und erhöhte Mortalität charakterisiert. Kürzlich konnte eine direkte Hemmung der Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten durch APN über eine Aktivierung von AMPK und PPAR α nachgewiesen werden (Fujita et al., 2008). In der vorliegenden Untersuchung führte eine fehlende APN-Expression in APN-KO-Mäusen zu einer numerischen Herunterregulation der kardialen MMP-9-Expression. Sollte sich dieser Trend in weiteren, temporär differenzierten seriellen Untersuchungen bestätigen, würde ein verminderter Kollagenabbau durch erniedrigte MMP-9 Expression neben der vermehrten Expression von Kollagen einen zusätzlichen Mechanismus des adversen kardialen Remodelings nach Herzinfarkt in APN defizienten Mäusen darstellen.

4.5. Adiponektin und die Induktion von MMP-9 im Rahmen weiterer Erkrankungen

Bereits in vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass APN zu einer gesteigerten Expression von Matrix-Metalloproteinasen in unterschiedlichen Zelltypen führt. Hierzu gehörten MMP-1 in synovialen Fibroblasten (Ehling et al., 2006), MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in Chondrozyten (Kang et al., 2010) sowie MMP-2 und MMP-9 in umbilikalen Endothelzellen (HUVACs) (Zhang et al., 2014). Zusätzlich war eine MMP-9-Expression in Chondrozyten (Lago et al., 2008), mikrovaskulären Endothelzellen (Adya et al., 2012) und Hepatozyten (Wanninger et al., 2011) nach Inkubation mit APN *in vitro* nachweisbar. Allerdings wurde die spezifische Regulation kardialer MMPs durch APN bisher nicht untersucht.

Die vorliegende Studie zeigt eine APN-induzierte Hochregulation von MMP-9 in kardialen Myozyten und Fibroblasten. Diese *In-vitro*-Daten werden durch Tierexperimente, welche das myokardiale Remodeling im Rahmen von Hypertension/Drucküberladung-induzierter linksventrikulärer Hypertrophie (Boluyt et al.,

1994; Diéz D, 2007) untersuchten, unterstützt. Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass APN-KO-Mäuse eine signifikant ausgeprägtere konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie verbunden mit einer erhöhten Wanddicke und ausgeprägteren Fibrose aufweisen. Diese phänotypischen Veränderungen führen zu einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion und erhöhter Mortalität im Vergleich zu Wildtypmäusen (Shibata et al., 2004; Fujita et al., 2008; Shibata et al., 2007; Shimano et al., 2010; O'Shea et al., 2010). Außerdem waren die beobachteten phänotypischen Unterschiede nach Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren in den APN-Knockoutmäusen signifikant vermindert, d.h. reversibel (Shibata et al., 2004).

Fujita et al. untersuchten die Wirkung APN auf die kardiale Fibrosierung am Modell einer Angiotensin-II-induzierten myokardialen Fibrosierung und Hypertrophie: APN-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich ausgeprägtere Fibrose des linken Ventrikels verbunden mit signifikant erhöhten Konzentrationen von Kollagen I und Kollagen III im Herzmuskelgewebe. Die genannten Beobachtungen waren unter APN-Überexpression rückläufig (Fujita et al., 2008). Ein weiterer Zusammenhang, welcher aus dieser Untersuchung hervorging war der zwischen APN und dem RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Das RAAS spielt nachweislich eine wichtige Rolle im Prozess des Remodelings. Eine Infusion von Angiotensin II bei Wildtyp- und APN-Knockoutmäusen führte zu einer Zunahme des fibrotischen Umbaus im Vergleich zu den Kontrollen, wobei diese Zunahme in der Gruppe der APN-KO-Mäuse signifikant höher war als in der Wildtypgruppe. Echokardiographisch war auch hier eine eingeschränkte Ventrikelfunktion unter Angiotensin II-Infusion nachzuweisen. Diese war signifikant ausgeprägter in der APN-KO-Gruppe. All diese Beobachtungen waren durch eine Überexpression von APN in der KO-Gruppe umkehrbar (Fujita et al., 2008). Die beobachtete antifibrotische Wirkung von APN steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in welcher eine APN-Defizienz im Rahmen der CVB3-Myokarditis mit einer verminderten Konzentration von Kollagenspaltprodukten (ICTP) vergesellschaftet war. Gleichzeitig wurde eine verminderte Expression von MMP-9 in APN-KO-Mäusen nachgewiesen, was einen Zusammenhang zwischen dem von der von Fujita et al. (Fujita et al., 2008) nachgewiesenen gesteigerten Fibrose bei APN-KO-Mäusen herstellt. Gleichzeitig zeigten O'Shea et al. in ihrer Arbeit ebenfalls eine signifikant verminderte kardiale MMP-9-Expression in APN-KO-Mäusen (O'Shea et al., 2010). Pharmakologisch kann die APN-Expression durch PPAR γ -Agonisten, die sogenannten Thiazolidindione (Synonym: Glitazone), hochreguliert werden.

Verschiedene Untersuchungen zeigten eine Hochregulation von APN durch Thiazolidindione mit Nachweis erhöhter APN-Spiegel im Serum therapierter Patienten (Otto et al., 2006). Kardial ist bei diesen Patienten eine Verminderung einer hypertensiven LV-Hypertrophie und einer myokardialen Fibrose nachweisbar (Li et al., 2010). Auch an der Niere konnte ein antifibrotischer Effekt von APN gezeigt werden: Higashi et al. wiesen eine verminderte renale Fibrose im Rahmen einer Thiazolidindione-induzierten Hochregulation von APN nach (Higashi et al., 2010). Kawai et al. zeigten am Modell der einseitigen Ureterobstruktion der Maus, dass eine Thiazolidindione-Gabe (Troglitazon) dosisabhängig zu einer Verminderung der Inflammation mit einem verminderten Nachweis von F4/80, einem Marker für Makrophagen, in der Niere führt (Kawai et al., 2009). Außerdem zeigte sich eine Verminderung der renalen Fibrose mit einer verminderten Akkumulation von Kollagen I im Vergleich zur Kontrollgruppe, verbunden mit einer verminderten renalen Expression von TGF- β , welches im Herzen für die Differenzierung von Fibroblasten eine Rolle zu spielen scheint (Kania et al., 2009, Xie et al., 2012).

Letztlich weisen neben experimentellen Untersuchungen auch klinische Studien auf einen Zusammenhang zwischen APN, MMP-9 und Gewebsfibrose hin. Eine Studie von Belo et al. zeigte signifikant verminderte APN-Plasmaspiegel verbunden mit verminderter MMP-9-Konzentration in adipösen Kindern (Belo et al., 2012). Gleichzeitig weisen adipöse Patienten eine verminderte APN-Expression im Fettgewebe (Milan et al., 2002), assoziiert mit dem Auftreten einer signifikanten Fettgewebsfibrose auf (Sun et al., 2010).

Auch Erkrankungen mit einer Sklerose als führendes klinisches Bild zeigen Assoziationen zwischen APN und MMP-9. Patienten mit Systemischer Sklerose beispielsweise sind durch eine verminderte MMP-9-Aktivität im Serum und eine verringerte MMP-9-Expression in Fibroblasten der Haut charakterisiert. Dies geht mit einem gesteigerten fibrotischen Umbau im Vergleich zu gesunden Probanden einher (Lakota et al., 2012; Fuzii et al., 2008). Auch war hier ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fibrose der Haut und systemischen APN-Spiegeln nachweisbar (Lakota et al., 2012). Im Rahmen des fibrotischen Umbaus der Leber bei Hepatitis C zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier sind mit zunehmenden Ausmaß der Fibrose verminderte MMP-9-Spiegel im Serum messbar (Badra et al., 2010), assoziiert mit gesteigerter Insulinresistenz und verminderten APN-Spiegeln (Lihn et al., 2005; Moucari et al., 2008). Auch sind verminderte APN-Spiegel mit einem vermehrten

fibrotischen Umbau der Leber bei Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis sowohl ohne Diabetes Mellitus (Musso et al., 2005) als auch bei Patienten mit Typ II-Diabetes (Leite et al., 2013) verbunden.

Im Herzen ist eine vermehrte Fibrose typischerweise mit einer diastolischen Dysfunktion assoziiert. Die arterielle Hypertonie wiederum ist typischerweise mit einer linksventrikulären Hypertrophie, einer vermehrten kardialen Fibrose (Díez J, 2007) und mit verminderten systemischen APN-Spiegeln assoziiert (Imatoh et al., 2008). Horio et al. zeigten in einer klinischen Studie, dass Thiazolidindione (Glitazone) als PPAR γ -Agonisten zu erhöhten APN-Plasmaspiegeln führen, verbunden mit einer Verbesserung der linksventrikulären diastolischen Funktion (Horio et al., 2005). Die Folge der durch Thiazolidindion- induzierten Erhöhung der APN-Plasmaspiegel ist eine Aktivierung von AMPK. Gleichzeitig führen Thiazolidindione über einen Einfluss auf die AMP/ATP-Verhältniss zu einer Aktivierung von AMPK (Moussa et al., 2012).

Zusammenfassend weisen experimentelle und klinische Daten auf einen Zusammenhang von niedrigen APN-Spiegeln und einem fibrotischen Umbau der Gewebe, zum Teil assoziiert mit erniedrigten MMP-9 Serumkonzentrationen, hin.

4.6. Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie zeigt einige Limitationen, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

Als eine Limitation muss die Verwendung von rekombinantem humanen APN, gewonnen aus einer Myelomzelllinie der Maus, gelten. Das in dieser Studie verwendete kommerziell erhältliche rekombinante APN enthält eine physiologische wie im humanen Serum vorliegende Zusammensetzung der verschiedenen molekularen Formen (LWM-, MMW-, HWM-APN) (R&D Systems; Bobbert et al., 2008). Es ist bekannt, dass die verschiedenen Formen auch unterschiedliche biologische Wirkungen ausüben. In einer klinischen Studie mit 49 Patienten mit Diabetes mellitus war zwar kein Unterschied der absoluten APN-Plasmakonzentrationen vor und nach einer antidiabetischen Therapie nachweisbar, jedoch erhöhte sich das Verhältnis von HMW zu Gesamt-APN und verminderte sich das Verhältnis von MMW zu Gesamt-APN nach suffizienter Blutzuckereinstellung signifikant. Das Verhältnis von LMW zu Gesamt-APN blieb dabei konstant. Bobbert et al. konnten außerdem eine direkte Assoziation von HMW-APN und der Aktivität der Myeloperoxydase (MPO) nachweisen (Bobbert et al., 2008).

Dieses Enzym wird von Neutrophilen Granulozyten und von Monozyten gebildet und spielt eine Rolle in der Atheroskleroseprogression sowie der Entwicklung weiterer kardiovaskulärer proinflammatorischer Erkrankungen (Baldus et al., 2003). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Zusammensetzung der molekularen APN-Formen trotz konstanter APN-Gesamtkonzentration mit unterschiedlichen biologische Wirkungen bzw. pathologischen Zuständen assoziiert sein können. Beispielsweise korreliert die Konzentrationen von HMW-APN mit der Schwere einer diabetischen Retinopathie und Nephropathie (Kato et al., 2008). Die vorliegende Untersuchung kann hinsichtlich der Wirkungen der einzelnen molekularen Formen auf die Expression von MMP-9 keine Aussage treffen. Es ist nicht auszuschließen, dass eine der genannten Formen mehr oder weniger anteilig für die hier untersuchten Regulationsmechanismen ist.

Eine weitere Limitation stellt die LPS-Kontaminationen rekombinanter Proteine dar. In diesem Zusammenhang wurde jede Charge von APN auf die LPS-Verunreinigung getestet. Hier ergaben sich abhängig von der verwendeten Charge unterschiedliche Ergebnisse. Die Verunreinigungen lagen dabei durchgehend unter 10 pg/ug Protein. Weiterhin wurde die LPS-Verunreinigung jedes Vials in der Zellkultur durch eine entsprechende Kontrolle (Inkubation mit der verwendeten LPS-Konzentration) in den Experimenten getestet. Die Verunreinigungen hatten keinen Einfluß auf die hier dargestellten Ergebnisse, so dass eine unspezifische Aktivierung ausgeschlossen werden kann.

Für die klinische Anwendung der experimentellen Ergebnisse sind Polymorphismen des APN-Gens von Bedeutung. Diese Polymorphismen scheinen einen Einfluss auf die Inzidenz und/oder Prävalenz von Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit zu haben. Diesbezüglich gut untersucht sind die Polymorphismen rs266729 (Austausch Cytosin für Guanin in Position -11377), rs2241766 (Austausch Thymin für Guainin in Position +45) und rs1501299 (Austausch Guanin für Thymin in Position+276). (Oliveira et al., 2011). Als Beispiel sei hier eine Untersuchung des Polymorphismus re2241766 angeführt: Individuen mit dem G-Allel haben eine höhere APN-mRNA-Expression und eine höhere APN-Plasmakonzentrationen (Menzaghi et al., 2007). Auch zeigen diese Patienten in Kombination mit einem Diabetes Typ II eine erhöhte Prävalenz für eine koronare Herzkrankheit (Lacquemant et al., 2004). He et al., zeigten eine Assoziation des Polymorphismus rs1501299 mit höherer Inzidenz für zerebrovaskuläre Vorfälle (He et al., 2015). Der Einfluss von Polymorphismen wurde in

der vorliegenden Studie nicht untersucht, würde allerdings den kausalen Zusammenhang zwischen APN-induzierter MMP-9 Hochregulation nicht grundsätzlich in Frage stellen, sondern dessen Wirkungen auf das kardiale Remodeling lediglich modifizieren.

Im Rahmen dieser Studie wurde der Zusammenhang von APN und kardialem Remodeling untersucht. Hierbei wurde aufgrund der *In-vitro*-Untersuchungen der Schwerpunkt auf die APN-abhängige Regulation von MMP-9 in kardialen Fibroblasten und Myozyten gelegt. Die Regulation weiterer MMPs (MMP-2, 8, 12, 13, 14, 28) im Rahmen der hier genutzten Tiermodelle (CVB3-Myokarditis und Myokardinfarkt) und ihrer Inhibitoren TIMP1, 2, 3 und 4 wurde nicht charakterisiert. Eine Regulation anderer beim kardialen Remodeling beteiligter Proteine durch APN kann aufgrund der vorhandenen Daten nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen APN induzierter MMP-9 Expression und MMP-9-Aktivität mit der Konzentration von Kollagenspaltprodukten am Modell der CVB3-Myokarditis.

Weitere Limitationen der Studie betreffen den Effekt von APN auf den Glukosemetabolismus, die Adipogenese und die Energiehomöostase, welche einen Einfluss auf die hier beobachteten Ergebnisse im Bezug auf das kardiale Remodeling ausüben können.

5. Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird eine durch Adiponektin vermittelte Hochregulation der MMP-9-Expression in kardialen Myozyten, kardialen Fibroblasten sowie infiltrierenden Immunzellen beschrieben. Die durch APN verursachte vermehrte MMP-9 Expression wird durch AMPK- und ERK1/2- abhängige Signaltransduktionswege, die durch verschiedenen Zellschädigungsmechanismen aktiviert werden, vermittelt. Die *in vitro* determinierte Hochregulation von MMP-9 konnte in einem *In-vivo*-Modell der murinen CVB3-Myokarditis bestätigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen identifizieren einen zusätzlichen Mechanismus der Inhibition des kardialen Remodelings durch das Adipozytokin nach myokardialer Schädigung. Zusätzlich zu einer direkten Hemmung der Kollagenexpression durch Adiponektin (Fujita et al., 2008) führt die Adiponektin-induzierte Hochregulation der MMP-9-Expression zu einer gesteigerten Aktivierung der MMP-9 mit vermehrter Spaltung von akkumulierendem Kollagen und erhöhtem Umsatz der extrazellulären Matrix (Abb.18). Diese Prozesse können die durch kardiale Schädigungsprozesse induzierte Fibrose inhibieren und dadurch zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen.

Die vorliegenden Ergebnisse könnten zu einer Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei der Herzinsuffizienz beitragen.

Abb.18

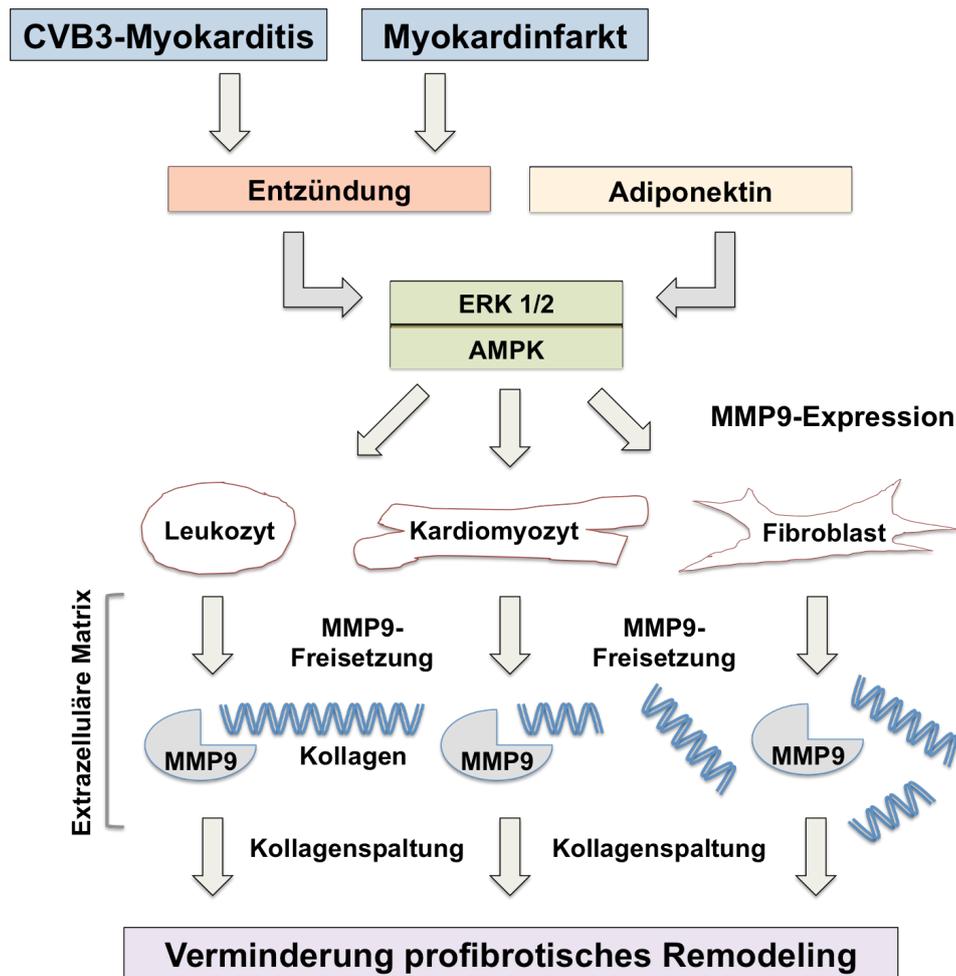


Abb.18: Adiponektin hemmt das profibrotische Remodeling der Extrazellulären Matrix durch eine Hochregulation von MMP-9. APN bedingt über eine Aktivierung von ERK1/2 und AMPK eine Hochregulation von MMP-9 in Leukozyten, Kardiomyozyten und Fibroblasten. Die erhöhte kardiale MMP9-Aktivität führt zu einer gesteigerten Kollagendegradation und folglich zu einer Verminderung der Kollagenakkumulation und Fibrosierung mit Inhibition des profibrotischen Remodelings.

6. Quellenverzeichnis

1. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Protective actions of globular and full-length adiponectin on human endothelial cells: novel insights into adiponectin-induced angiogenesis. *J Vasc Res.* 2012; 49(6):534-543.
2. Ahasic AM, Zhao Y, Su L, Sheu C-C, Thompson BT, Christiani DC. Adiponectin Gene Polymorphisms and Acute Respiratory Distress Syndrome Susceptibility and Mortality. *PLoS ONE.* 2014; 9(2): e89170. doi:10.1371/journal.pone.0089170.
3. Almer G, Saba-Lepek M, Haj-Yahya S, Rohde E, Strunk D, Fröhlich E, Prassi R, Mangge H. Globular Domain of Adiponectin: promising target for detection of atherosclerotic Lesions, *Biologics.* 2011;5: 95–105.
4. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(51):20262-20267.
5. Badra G, Lotfy M, El-Refaie A, Obada M, Abdelmonem E, Kandeel S, Fathy A. Significance of serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 in chronic hepatitis C patients. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010;57(1):29-42.
6. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108:1440-1445.
7. Baum J and Duffy HS. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(4):376-379,
8. Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Lanna CM, Carneiro PC, Izidoro-Toledo TC, Ferraz KC, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. *Int J Obes.* 2012;36(1):69-75.
9. Bigg HF, Rowan AD, Barker MD, Cawston TE. Activity of matrix metalloproteinase-9 against native collagen types I and III. *FEBS J.* 2007;274(5):1246-1255.
10. Bobbert P, Rauch U, Stratmann B, Golding-Lang P, Antoniak S, Bobbert T, Schultheiss HP, Tschoepe D. High molecular weight adiponectin correlates positively with myeloperoxidase in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;82:179-184.
11. Bobbert P, Scheibenbogen C, Jenke A, Kania G, Wilk S, Krohn S, Stehr J, Kuehl U, Rauch U, Eriksson U, Schultheiss HP, Poller W, Skurk C. Adiponectin expression in patients with inflammatory cardiomyopathy indicates favourable outcome and inflammation control. *Eur Heart J.* 2011;32:1134-1147.
12. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res.* 1994;75(1):23-32.
13. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett.* 1998;435:29-34.
14. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.* 2011;32:670-679.
15. Brennan ML, Penn MS, Van LF, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003;349:1595-1604.
16. Brilla CG, Scheer C, Rupp H. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix: modulation of cardiac fibroblast function by angiotensin II type 1 receptor antagonism. *J Hypertens Suppl.* 1997;15(6):13-19.
17. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009;57(3):165-176.

18. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling. Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128:388-400.
19. Caforio ALP, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*. 2002;4(4):411-417.
20. Caforio ALP, Paukweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Heliö T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss HP, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2013;34:2636-2648.
21. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83.
22. Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*. 2005;48(1):132-139.
23. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JC, Suarez A, Zhang J, McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15(2):63-74.
24. Cheung C, Marchant D, Walker EKY, Luo Z, Zhang J, Yanagawa B, Rahmani M, Cox J, Overall C, Senior RM, Luo H, Manus BM. Ablation of Matrix metalloproteinase-9 increases severity of viral myocarditis in mice. *Circulation*. 2008;117:1574-1582.
25. Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma and LXR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(1):151-158.
26. Cho A, Graves J, Reidy MA. Mitrogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2527-2532.
27. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1281-1292.
28. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-582.
29. Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:543-551.
30. Crocker SJ, Frausto RF, Whitmire JK, Benning N, Milner R, Whitton JL. Amelioration of coxsackievirus B3-mediated myocarditis by inhibition of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1. *Am J Pathol*. 2007; 171(6):1762-1773.
31. Dadson K, Chasiotis H, Wanaiampikul S, Tungtrongchitr R, Xu A, Sweeney G. Adiponectin mediated APPL1-AMPK signaling induces cell migration, MMP activation, and collagen remodeling in cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2014;115(4):785-93.
32. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem*. 2004;279:17070-17078.
33. Díez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens*. 2007;9:546-550.
34. Dixon MC, Wigle JT. Cardiac fibrosis and heart failure: cause or effect? Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015;239.
35. Dorn GW 2nd. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:283-291.

36. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2000;106:55-62.
37. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambone MA. Localization of types I, III, and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;20:267-276.
38. Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Turner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Schölmerich J, Neumann E, Müller-Ladner U. The potential of Adiponectin in driving arthritis. *J Immunol*. 2006;176:4468-4478.
39. Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, Ohashi K, Ghobrial J, Shibata R, Pimentel DR, Sam F. Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):984-993.
40. Fang X, Palanivel R, Cresser J, Schram K, Ganguly R, Thong FSL, Tuinei J, Xu A, Abel ED, Swenney G. An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):721-729.
41. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301:1045-1050.
42. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:103.
43. Folco EJ, Rocha VZ, López-Illasaca M, Libby P. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J Biol Chem*. 2009;284(29):25569-25575.
44. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-265.
45. Fujioka D, Kawabata K, Saito Y, Kobayashi T, Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Obata JE, Kitta Y, Umetani K, Kugiyama K. Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):2409-2416.
46. Fujita K, Maeda N, Sonoda M, Ohashi K, Hibuse T, Nishizawa H, Nishida M, Hiuge A, Kurata A, Kihara S, Shimomura I, Funahashi T. Adiponectin protects against Angiotensin II-Induced cardiac fibrosis through activation of PPAR- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(5):863-870.
47. Fuzii HT, Yoshikawa GT, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Fachin AL, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GAS, Andrade LEC. Affected and non-affected skin fibroblasts from systemic sclerosis patients share a gene expression profile deviated from the one observed in healthy individuals. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(5):866-874.
48. Gao B, Wang Y, Tsan MF. The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*. 2006;80:359-366.
49. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nicamhlaibh R, Risteli J, Borel O, Qvist P, Delmas PD, Foged NT, Delaisse JM. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res*. 2003;18:859-867.
50. Gélinas R, Mailleux F, Dontaine J, Bultot L, Demeulder B, Ginion A, Daskalopoulos EP, Esfahani H, Dubois-Deruy E, Lauzier B, Gauthier C, Olson AK, Bouchard B, Rosiers CD, Viollet B, Sakamoto K, Balligand JL, Vanoverschelde JL, Beauloye C, Horman S, Bertrand L. AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nature Communications*. 2018;9:374. DOI:10.1038/s41467-017-02795-4.
51. He P, Chen XL, Ding YP. Association between polymorphisms in the adiponectin gene (APM-1) and atherosclerotic cerebral infarction in a Hainan Chinese Han population. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4142-4149.
52. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (Matrix metalloproteinase-8) in human Atheroma. A novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104(16):1899-1904.

53. Higashi K, Oda T, Kushiyama T, Hyodo T, Yamada M, Suzuki S, Sakurai Y, Miura S, Kamagai H. Additive antifibrotic effects of pioglitazone and candesartan on experimental renal fibrosis in mice. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(5):327-335.
54. Hintze V, Höwel M, Wermter C, Grosse Berkhoff E, Becker-Pauly C, Beermann B, Yiallourous I, Stöcker W. The interaction of recombinant subdomains of the procollagen C-proteinase with procollagen I provides a quantitative explanation for functional differences between the two splice variants, mammalian tolloid and bone morphogenetic protein 1. *Biochemistry*. 2006;45(21):6741-6748.
55. Horio T, Suzuki M, Suzuki K, Takamisawa I, Hiuge A, Kamide K, Takiushi S, Iwashima Y, Kihara S, Funahashi T, Yoshimasa Y, Kawano Y. Pioglitazone improves left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2005;18(7):949-957.
56. Imatoh T, Miyazaki M, Momose Y, Tanihara S, Une H. Adiponectin levels associated with the development of hypertension: a prospective study. *Hypertens Res*. 2008;31(2):229-233.
57. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thorgersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1996;271(25):14657-14660.
58. Jenke A, Holzhauser L, Löbel M, Savvatis K, Wilk S, Weithäuser A, Pinkert S, Tschöpe C, Klingel K, Poller W, Scheibenbogen C, Schultheiss HP, Skurk C. Adiponectin promotes coxsackievirus B3 myocarditis by suppression of acute anti-viral immune responses. *Basic Res Cardiol*. 2014;109:408.
59. Jenke A, Wilk S, Poller W, Eriksson U, Valaperti A, Rauch BH, Stroux A, Liu P, Schultheiss H-P, Scheibenbogen C, Skurk C. Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99(3):422-431.
60. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1784-1792.
61. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003;88(4):660-672.
62. Kang EH, Lee YJ, Kim TK, Chang CB, Chung JH, Shin K, Lee EY, Lee EB, Song YW. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2010;16(9):1101-1109.
63. Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(8):247-252.
64. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 1995;270(28):16483-16486.
65. Kato K, Osawa H, Ochi M, Kusunoki Y, Ebisui O, Ohno K, Ohashi J, Shimizu I, Fujii Y, Tanimoto M, Makino H. Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy. *Clin Endocrinol*. 2008;68(3):442-449.
66. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007;13(11):460-409.
67. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest*. 2009;89(1):47-58.
68. Kelly D, Cockerill Gillian, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, Squire IB. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J*. 2007;28(6):711-718.
69. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(1):314-318.
70. Klingel K, Selinka HC, Zell R, Mall G, Bultmann B, Kandolf R. [Pathogenesis, diagnosis and therapy of heart disease caused by enteroviruses (molecular biological study)]. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 1998;1:5-10.
71. Kottyan LC, Woo JG, Keddache M, Banach W, Crimmins NA, Dolan LM, Martin LJ. Novel variations in the adiponectin gene (ADIPOQ) may affect distribution of oligomeric complexes. *SpringerPlus*. 2012;1:66.
72. Lacquemant C, Forguel P, Lobbens S, Izzo P, Diana C, Ruiz J. The adiponectin gene SNP + 45 is associated with coronary artery disease in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2004;21(7):776-781.

73. Lago R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(9):1101-1109.
74. Lakota K, Wei J, Carns M, Hinchcliff M, Lee J, Whitfield ML, Sodin-Semrl S, Varga J. Levels of adiponectin, a marker for PPAR-gamma activity, correlate with skin fibrosis in systemic sclerosis: potential utility as biomarker? *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R102. doi:10.1186/ar3827.
75. Lang K, Ratke J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal*. 2009;7:27. doi.org/10.1186/1478-811X-7-27.
76. Leite NC, Salles GF, Cardoso CR, Villela-Nogueira CA. Serum biomarkers in type 2 diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. *Hepatol Res*. 2013;43(5):508-515.
77. Li E, Han D, Zhang Y, Xie X, Ke R, Zhu Y, Liu L, Song Y, Yang L, Li M. Activation of AMPK prevents monocrotalin-induced extracellular matrix remodeling of pulmonary artery. *Med Sci Monit Basic Res*. 2016;22:27-33.
78. Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Pauschinger M. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res*. 2002;56(2):235-247.
79. Li P, Shibata R, Unno K, Shimano M, Furukawa M, Ohashi T, Cheng X, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone. *Hypertension*. 2010;55(1):69-75.
80. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 2005;6(1):13-21.
81. Long YC, Kharitonov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(7):791-795.
82. López B, González A, Díez J. Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation*. 2010;121(14):1645-1654.
83. Lutgens E, Daemen MJAP, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JFM. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res*. 1999;41(3):586-593.
84. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094-2099.
85. Malapaka RRV, Khoo S, Zhang J, Choi JH, Zhou XE, Xu Y, Gong Y, Li J, Yong E-L, Chalmers MJ, Chang L, Resau JH, Griffin PR, Chen YE, Xu HE. Identification and Mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*. 2012;287(1):183-195.
86. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts in fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2002;91(12):1103-1113.
87. Marchant D, McManus BM. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of viral heart disease. *Trends in Cardiovasc Med*. 2009;19(1):21-26.
88. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*. 2009;58(2):141-149.
89. Meng R, Pei Z, Zhang A, Zhou Y, Cai X, Chen B, Liu G, Mai W, Wei J, Dong Y. AMPK activation enhances PPAR α activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK 1/2 MAPK signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2011;511(1-2):1-7.
90. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*. 2007;56:1198-209.
91. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, Ordener C, Piercecchi-Marti MD, Auge N, Salvayre AN, Bourin P, Parini A, Cussac D. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009;27(11):2734-2743.

92. Milan G, Resistin and adiponevctin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res.* 2002;10(11):1095-1103.
93. Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement off he ras dependent pathway. 2004. *J Cell Physiol* 2004;198(3):417-427.
94. Morizane Y, Thanos A, Takeuchi K, Murakami Y, Kayama M, Trichonas G, Miller J, Foretz M, Viollet B, Vavvas DG. AMP-activated protein kinase suppresses matrix metalloproteinase-9 expression in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 2011;286(18):16030-16038.
95. Moshal KS, Sen U, Tyagi N, Henderson B, Steed M, Ovechkin AV, Tyagi SC. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am J Pysiol Cell Physiol.* 2006;290(3):883-891.
96. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RMA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2008;134(2):416-423.
97. Moussa A, Li J. AMPK in myokardial infarction and diabetes: the yin/yang effect. *APSB.* 2012;2:368-378
98. Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Michieli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(11):2438-2446.
99. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-573.
100. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified form human plasma. *J Biochem.* 1996;120(4):803-812.
101. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, Fowler AA. Hypoxia inducible factor-1 upregulates adipnectin in diabetic mouse hearts and attenuates post-ischemic injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;51(2):178-187.
102. O'Shea KM, Chess DJ, Khairallah RJ, Rastofi S, Hecker PA, Sabbah HN, Walsh K, Stanley WC. Effects of adiponectin deficiency on structural and metabolic remodeling in mice subjected to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(6):1639-1645.
103. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R, Walsh K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6153-6160.
104. Ohta H, Itoh N. Roles of FGFs as adipokines in adipose tissue development, remodeling, and metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:18. doi: 10.3389/fendo.2014.00018.
105. Oliveira CSV, Giuffrida FMA, Crispim PS, Reis AF. Adipoq and adiponectin: the common ground of hyperglycemia and coronary artery disease. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55(7):446-454.
106. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation.* 1998;98(2):149-156.
107. Otto C, Otto B, Göke B, Pfeiffer AF, Lehrke M, Vogeser M, Spranger J, Parhofer KG. Increase in adioponectin levels during pioglitazone therapy in relation to glucose control, insulin resistance as well as ghrelin and resistin levels. *J Endocrinol invest.* 2006; 29(3):231-236.
108. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000;102(11):1296-1301.
109. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates Angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-Activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1304-1309.
110. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Cardioprotection by Adiponectin. *Trans Cardiovasc Med.* 2006;16(5):141-146. doi:10.1016/j.tcm.2006.03.001.

111. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*. 2007;380(1-2): 24-30.
112. Oviedo-Orta E, Bermudez-Fajardo A, Karanam S, Benbow U, Newby AC. Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. *Immunology*. 2008;124(1):42-50.
113. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2005;579(23):5163-5169.
114. Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF- β and fibrosis in different organs – molecular pathway imprints. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1792(8):746-756.
115. Qi D, Young LH. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(8):422-429.
116. R&D Systems. Recombinant human adiponectin/Acrp30 Protein (o.J.), URL: https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-adiponectin-acrp30-protein-cf_1065-ap#product-details (Stand: 23.03.2018).
117. Richards AA, Stephens T, Charlton HK, Jones A, Macdonald GA, Prins JB, Whitehead JP. Adiponectin multimerization is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation of multimerization by alterations in posttranslational modifications. *Mol Endocrinol*. 2006;20(7):1673-1687.
118. Robinson K, Prins J, Venkatesh Bala. Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit Care*. 2011;15(2):221. doi: 10.1186/cc10021.
119. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci*. 2001;68(7):799-814.
120. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2764–2772.
121. Saegusa S, Fei Y, Takahashi T, Sumino H, Moriya J, Kawaura K, Yamakawa J, Itoh T, Morimoto S, Nakahashi T, Iwai K, Matsumoto M, Kanda T. Oral administration of candesartan improves the survival of mice with viral myocarditis through modification of cardiac adiponectin expression. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21(3):155-160.
122. Schultheiss HP, Kuhl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J*. 2011;32(21):2616-2625.
123. Sehgal I, Thompson TC. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor- β 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell*. 1999;10(2):407-416.
124. Shibata R, Izumiya Y, Sato K, Papanicolaou K, Kihara S, Colucci WS, Sam F, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(6):1065-1074.
125. Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*. 2004;10(12):1384-1389.
126. Shimano M, Ouchi N, Shibata R, Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T, Walsh K. Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(2):210-220.
127. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. 2000;86(12):1259-1265.
128. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(1):53-60.
129. Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2008;29(9):1168-1180.

130. Spinale FG, Zile MR. Integrating the myocardial matrix into heart failure recognition and management. *Circulation*. 2013;113(6):725-738.
131. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1285-1342.
132. St-Pierre Y, Potworowski EF. T cell control of extracellular matrix degradation. *Dev Immunol*. 2000;7(2-4):171-177.
133. Stansfield R, Gossiel Fatma, Morton A, Newman C, Eastell R. Type I collagen degradation during tissue repair: Comparison of mechanisms following fracture an acute coronary syndroms. *Bone*. 2014;69:1-5. doi:10.1016/j.bone.2014.08.017
134. Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C, Thiel G. Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J*. 2001;360(3):599-607.
135. Sun K, Scherer PE. *Adipose Tissue Dysfunction: A Multistep Process*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010;67-75.
136. Sun Y, Cleutjens JP, Diaz-Arias AA, Weber KT. Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. *Cardiovasc Res*. 1994;28(9):1423-1432.
137. Sutton MGSJJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-2988.
138. Suzuki A, Lu J, Kusakai G, Kishimoto A, Ogura T, Esumi H. AK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling. *Mol Cell Biol*. 2004;24(8):3526-3535.
139. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(7):861-868.
140. Takahashi T, Yu F, Saegusa S, Sumino H, Nakahashi T, Iwai K, Morimoto S, Kurabayashi M, Kanda T. Impaired expression of cardiac adiponectin in leptin-deficient mice with viral myocarditis. *Int Heart J*. 2006;47(1):107-123.
141. Tian R, Musi N, D'Agostino J, Hirshman MF, Goodyear LJ. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2001;104(14):1664-1669.
142. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes*. 2005. 54(12):3358-70.
143. Turner JJO, Smolinska MJ, Sacre B, Foxwell MJ. Induction of TLR tolerance in human macrophages by Adiponectin: Does LPS play a role? *Scand J Immunol*. 2009. 69(4):329-336.
144. Upadhyaya S, Kadamkode V, Mahammed R, Doraiswami C, Banerjee G. Adiponectin and IL-6: Mediators of inflammation in progression of healthy to type 2 diabetes in Indian population. *Adipocyte*. 2014;3(1):39-45.
145. Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, Maes T, Dhulst A, Louis R, Foidart JM, Noel, Pauwels R. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J Immunol*. 2003;171(2):1016-1022.
146. Villareal FJ. *Interstitial fibrosis in heart failure*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2004:103.
147. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-839.
148. Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeToureau Y, Wang Y, Chopp M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci*. 2006;26(22):5996-6003.
149. Wang S, Zhang C, Liang B, Zhang M, Lee J, Zhu H, Viollet B, Xia L, Zhang J, Zou MH. Activation of AMP-activated Protein Kinase alpha by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med*. 2012;18(6):902-910.

150. Wang WM, Ge G, Lim NH, Nagase H, Greenspan DS. TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J.* 2006;398(3):515-519.
151. Wang Y, Lam KSL, Chan L, Chan KW, Lam JBB, Lam MC, Hoo RCL, Mak WWN, Cooper GJS, Xu A. Post-translational Modifications of the Four Conserved Lysine Residues within the Collagenous Domain of Adiponectin Are Required for the Formation of its High Molecular Weight Oligomeric Complex. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16391-16400.
152. Wanninger J, Walter R, Bauer S, Eisinger K, Schäffler A, Dorn C, Weiss TS, Hellerbrand C, Buechler C. MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(2):603-607.
153. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, Waksman R, Bonow RO, Wu E, Epstein SE. Inflammation as a driver of adverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(17):2050-2060.
154. Wilk S, Scheibenbogen C, Bauer S, Jenke A, Rother M, Guerreiro M, Kudernatsch R, Goerner N, Poller W, Ellingsen-Merkel D, Utku N, Magrane J, Volk H-D, Skurk C. Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T-cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(8):2323-2332.
155. Wilk S, Jenke A, Stehr J, Yang C-A, Bauer S, Göldner K, Kotsch K, Volk H-D, Poller W, Schultheiss H-P, Skurk C, Scheibenbogen C. Adiponectin modulates NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2013;43(4):1024-1033.
156. Woo CH, Lim JH, Kim JH. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase activator protein-1 pathway in raw 264.7 cells. *J Immunol.* 2004;173(11):6973-6980.
157. Xie Y, Liao J, Li M, Wang X, Yang Y, Ge J, Chen R, Chen H. Impaired cardiac microvascular endothelial cells function induced by Coxsackievirus B3 infection and its potential role in cardiac fibrosis. *Virus Res.* 2012;169(1):188-194.
158. Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to Interleukin-1 β . *J Biol Chem.* 2004;279(38):39513-39519.
159. Xin X, Zhou L, Reyes CM, Liu F, Dong LQ. APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(1):103-110.
160. Yajima T, Knowlton KU. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation.* 2009;119(19):2615-2624.
161. Yajima T. Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. *Future Microbiol.* 2011;6(5):551-566.
162. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Mivagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohzeki T, Ohzeki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423(6941):762-769.
163. Yan AT, Shayne AJ, Brown KA, Gupta SN, Chan CW, Luu TM, Di Carli MF, Reynolds HG, Stevenson WG, Kwong RY. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation.* 2006;114(1):32-39.
164. Yoon MJ, Lee GY, Chung J-J, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor α . *Diabetes.* 2006;55(9):2562-2570.
165. Yu Q, Watson RR, Marchalonis JJ, Larson DF. A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):643-651.
166. Zhang Z, Amorosa LF, Coyle SM, Macor MA, Lubitz SE, Carson JL, Birnbaum MJ, Lee LY, Haimovich B. Proteolytic cleavage of AMPK α and intracellular MMP9 expression are both required for TLR-4-mediated mTORC1 activation and HIF-1 α expression in leukocytes. *J Immunol.* 2015;195(5):2452-2460.

167. Zhang Z, Wang F, Wang BJ, Chu G, Cao Q, Sun BG, Dai QY. Inhibition of leptin-induced vascular extracellular matrix remodelling by adiponectin. *J Mol Endocrinol*. 2014;53(2):145-154.
168. Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, Liu DD, Torres JM, Jia W, Lechleiter JD, Liu F, Dong LQ. Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein kinase kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2009;284(33):22426-22435.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Schur, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Adiponektin vermindert matrizelluläres Remodeling nach kardialer Schädigung durch Hochregulation der Matrix-Metalloproteinase 9-Expression“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an erfolgten Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Robert Schur hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Jenke A, Schur R, Röger C, Karadeniz Z, Grüger M, Holzhauser L, Savvatis K, Poller W, Schultheiss HP, Landmesser U, and Skurk C: Adiponectin attenuates profibrotic extracellular matrix remodeling following cardiac injury by up-regulating matrix metalloproteinase 9 expression in mice. *Physiol Rep.* 2017. 5(24). pii: e13523. doi: 10.14814/phy2.13523.

Beitrag im Einzelnen:

- Planung von Experimenten
- Durchführung Telexperimente PCR/Erhebung Teildatensatz Figure 1 einschließlich Extraktion von RNA, Synthese von cDNA
- Durchführung und Auswertung Telexperimente der Zymographien/Erhebung Teildatensatz Figure 2, 3, 4, 5, 6 einschließlich Proteinextraktion
- Planung ICTP-ELISA (Figure 6D)
- Auswertung des Datensatzes Tabelle 1
- Mitverfassen einschließlich Ausformulierung des Manuskriptes
- Einreichen des Manuskriptes

Unterschrift des Doktoranden

9. Publikationsliste

9.1. Artikel

Jenke A, **Schur R**, Röger C, Karadeniz Z, Grüger M, Holzhauser L, Savvatis K, Poller W, Schultheiss HP, Landmesser U, and Skurk C: Adiponectin attenuates profibrotic extracellular matrix remodeling following cardiac injury by up-regulating matrix metalloproteinase 9 expression in mice. **Physiol Rep**. 2017. 5(24). pii: e13523. doi: 10.14814/phy2.13523.

Lenk K, Palus S, **Schur R**, Datta R, Dong J, Culler MD, Anker S, Springer J, Schuler G, Adams V. Effect of ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28135, on the expression of myostatin in a rat heart failure model. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**. 2013. 4(1): 63-69.

Palus S, **Schur R**, Akashi YJ, Bockmeyer B, Datta R, Halem H, Dong J, Culler MD, Adams V, Anker SD, Springer J. Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model. **PLoS ONE**. 2011. 6(11): e26865. doi:10.1371/journal.pone.0026865.

Lenk K, **Schur R**, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, Schuler G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. **Eur J Heart Fail**. 2009. 11(4):342-348.

9.2. Abstracts

Schur R, Jenke A, Grueger M, Holzhauser L, Savvatis K, Landmesser U, Skurk C: Adiponectin attenuates adverse cardiac remodeling following cardiac injury by up-regulating matrix metalloproteinase 9 expression. **Eur Heart J**. 2015. 36, Suppl. 1: 1120..

Holzhauser L, Jenke A, Savvatis K, Grueger M, **Schur R**, Westermann D, Lindner D, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C: FOXO3a modulates cardiac remodeling via inhibition of myofibroblast differentiation in acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**. 2015. 65, Suppl. S:A1010.

Holzhauser L, Jenke A, Savvatis K, Grueger M, **Schur R**, Lindner D, Westermann D, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C: Inhibition of myofibroblast differentiation by FOXO3a – implications for acute myocardial infarction and cardiac remodeling. **Circulation**. 2014. 130, Suppl.2:17995.

Jenke A, **Schur R**, Holzhauser L, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C: Adiponectin inhibits maladaptive remodeling in cardiac disease by increasing matrix metalloproteinase-9 activity. **Circulation**. 2014. 130, Suppl. 2: 20099.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte diese Dissertation in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bei allen bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Carsten Skurk für die Einführung in die Forschungsgruppe und für seinen Rat und Anleitung. Außerdem danken möchte ich Dr. rer. nat. Alexander Jenke für die freundschaftliche Zusammenarbeit, Tips und praktische Hilfe während der Umsetzung der Experimente. Gleiches gilt für Dr. rer. nat. Carsten Röger und PD Dr. med. Kostas Savvatis. Ebenso danken möchte ich Prof. Dr. med. Ulf Landmesser als Direktor der Klinik für Kardiologie für die Rahmenbedingungen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Des Weiteren möchte ich mich meinen Eltern Ursula Schur und Winfried Schur danken, die mich in dieser Zeit immer mit Verständnis begegneten und mich auch in schwierigen Zeiten weiter motivierten. Ebenso gilt mein Dank Patricia Sandonis für ihre liebevolle Unterstützung und Verständnis.