

Aus der Medizinischen Klinik II (Kardiologie) der Universität zu
Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

Untersuchungen zum Einfluss von
Matrixmetalloproteinasen (MMP) auf
pathophysiologische Veränderungen am Herzen
bei Diabetes mellitus Typ 2

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

Vorgelegt von
Karoline Hanke
aus Lemgo

Lübeck 2012

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Weil

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. Wolfram Jabs

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.08.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klinischer Hintergrund: Diabetes mellitus	1
1.2 Diabetische Kardiomyopathie	4
1.3 Die extrazelluläre Matrix des Herzens	5
1.4 Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihre natürlichen Inhibitoren (TIMPs)	6
1.5 Tiermodell	12
1.6 Zielsetzung	13
 2. Material und Methoden	 14
2.1 Gewinnung von linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten	15
2.2 Färbung an linksventrikulärem Myokard	15
2.2.1 Aufarbeitung des linksventrikulären Myokards für Paraffinschnitte	15
2.2.2 Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten aus linksventrikulären Myokards	15
2.2.3 Aufarbeitung des linksventrikulären Myokards für Kryoschnitte	15
2.2.4 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten aus linksventrikulärem Myokard	15
2.2.5 Sirius Red Färbung von Kryoschnitten aus linksventrikulärem Myokard	16
2.3 Bestimmung der mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten mittels RT-PCR	16
2.3.1 Überblick über die „Real-Time PCR“	16
2.3.2 Homogenisierung linksventrikulären Myokards	19
2.3.3 RNA-Isolation aus linksventrikulärem Myokard	19
2.3.4 Agarosegelelektrophorese zur RNA – Auftrennung	20
2.3.5 Reverse Transkription der mRNA aus linksventrikulärem Myokard in cDNA	21
2.3.6 Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	22
2.3.6.1 Primer	22

2.3.6.2 Optimierung der Primerkonzentration	23
2.3.6.3 Optimierung der Hybridisierungstemperatur für MMP-9	23
2.3.6.4 Optimierung der Templatekonzentration für MMP-9	24
2.3.6.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten	24
2.3.6.6 Restriktionsanalytische Kontrolle der produzierten Sequenzen	24
2.3.6.7 Durchführung der RT-PCR	25
2.3.6.8 Auswertung der $PCR/2^{-\Delta\Delta CT}$ – Methode	26
2.4 Bestimmung der Proteinexpression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten mittels Western Blot	28
2.4.1 Homogenisierung linksventrikulären Myokards	28
2.4.2 Gesamtproteingewinnung	28
2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.4.4 Western Blot	29
2.4.4.1 Vorbereitung	29
2.4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.4.4.3 Immunoblot	29
2.5 Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Vitalparameter der Versuchstiere	31
3.2 Bestandteile des linksventrikulären Myokards	32
3.2.1 Morphologie der extrazellulären Matrix	32
3.2.2 Zellen des linksventrikulären Myokards	34
3.2.2.1 Zelltypen	34
3.2.2.2 Zellhäufigkeiten	35
3.2.3 Fibroblasten und Fibrosierung	37
3.3 Western Blot zur Bestimmung von Proteinkonzentration von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 aus linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten	39

3.3.1 Proteinexpression für MMP-2	39
3.3.2 Proteinexpression für MMP-9	40
3.3.3 Proteinexpression für TIMP-1	42
3.4 mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in-vivo in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten	43
3.4.1 Vorversuche zur RT-PCR	43
3.4.1.1 Reverse Transkription	43
3.4.1.2 Primerkonzentration	43
3.4.1.3 Hybridisierungstemperatur von MMP-9	44
3.4.1.4 Templatekonzentration von MMP-9	45
3.4.1.5 Restriktionsanalyse	46
3.4.2 RT-PCR aus linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten	47
3.4.2.1 MMP-2	47
3.4.2.2 MMP-9	48
3.4.2.3 TIMP-1	49
 4. Diskussion	 51
4.1 Die ZDF-Ratte als Tiermodell des Typ 2-Diabetes	52
4.2 Linksventrikuläre Fibrose am diabetischen Herzen	53
4.3 Die Zellen des linksventrikulären Myokards beim Typ 2-Diabetes	55
4.4 MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im linksventrikulären Myokard der Versuchstiere	56
4.4.1 Veränderungen der MMP-/TIMP-Expression mit zunehmendem Alter der Versuchstiere	59
4.4.2 Veränderungen der MMP-/TIMP-Proteinexpression bei Typ-2-diabetischen Versuchstieren	61
4.4.3 Veränderungen der MMP-/TIMP-mRNA-Expression bei Typ-2-diabetischen Versuchstieren	63

5. Zusammenfassung	65
6. Literaturverzeichnis	67
7. Anhang	77
7.1 Abkürzungen	77
7.2 Antikörper	79
7.3 Primer	79
7.4 Versuchstiere	79
7.5 Chemikalien	80
7.6 Geräte und Software	82
7.7 Puffer	84
7.8 Verbrauchsmaterialien	87
7.9 Tierversuchsanträge	88
7.9.1 Tierversuchsantrag Schleswig-Holstein	88
7.9.2 Tierversuchsantrag Oberpfalz (Regensburg)	89
7.9.3 Bestätigung der gemeinsamen Tierhaltung	95
8. Danksagung	96
9. Lebenslauf	97
10. Publikationen	98

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund: Diabetes mellitus

Mit dem Begriff Diabetes mellitus wird eine Gruppe metabolischer Erkrankungen bezeichnet, die phänotypisch mit einer Hyperglykämie einhergehen. Die unterschiedlichen Formen des Diabetes mellitus werden durch ein komplexes Zusammenspiel aus genetischer Disposition, Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten hervorgerufen.

Klassifiziert wird die Erkrankung in die beiden Hauptkategorien Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. Während der erste Typ auf einer autoimmunologischen Zerstörung der β -Zellen des Pankreas beruht, fasst der Diabetes mellitus Typ 2 eine Gruppe von Erkrankungen zusammen, die mit einer Insulinresistenz, gestörten Insulinsekretion oder einer vermehrten Glucoseproduktion zusammentreffen.

Die Prävalenz des Diabetes mellitus ist in den letzten zwei Jahrzehnten erheblich angestiegen und auch zukünftig wird die Anzahl an Erkrankten weiter ansteigen. Wegen der zunehmenden Verbreitung von Adipositas und Bewegungsmangel wird vor allem für den Diabetes mellitus Typ 2 ein schnellerer und ausgeprägterer Anstieg vorausgesagt. Die WHO gibt für das Jahr 2000 eine Diabetesprävalenz von 170 Mio. Erkrankten weltweit an. Die Hochrechnung für das Jahr 2030 geht von 370 Mio. Diabeteskranken aus. In Deutschland wird die Prävalenz der Diabetespatienten für 2000 mit 2,6 Mio. von der WHO angegeben, für 2030 belaufen sich die Schätzungen auf 3,7 Mio. Menschen. Für 5% aller Todesursachen wird zur Zeit Diabetes mellitus als ursächlich angesehen und die WHO geht davon aus, dass ohne das Ergreifen dringender Maßnahmen diese Zahl in den nächsten 10 Jahren um 50% ansteigen wird. Diabetes ist somit eine „Volkskrankheit“.

Für den Diabetes mellitus Typ 2 wird der auslösende Primäraffekt zwar noch diskutiert, allgemein geht man aber davon aus, dass zunächst eine Insulinresistenz besteht und anschließend eine Insulinsekretionsstörung auftritt. Dabei weist der Typ 2-Diabetes eine ausgeprägte genetische Komponente auf. Die genauen Genloci sind noch nicht identifiziert, es handelt sich aber um eine polygene Erkrankung. Manifestationsauslösend für die Krankheit ist häufig ein Umweltfaktor wie Ernährung oder Adipositas. Die Adipozyten sezernieren zahlreiche biologische Substanzen, wie z.B. Leptin oder freie Fettsäuren, welche an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt sind und ebenfalls zur erhöhten Insulinresistenz beitragen können.

Zu Beginn der Erkrankung hat ein Typ 2-Diabetiker eine normale Glucosetoleranz, da die β -Zellen kompensatorisch vermehrt Insulin abgeben. Mit zunehmender Insulinresistenz und kompensatorischem Hyperinsulinismus können die Inselzellen bei einigen Betroffenen diesen Zustand jedoch nicht mehr aufrechterhalten, so dass eine pathologische Glucosetoleranz und postprandiale Blutglucoseerhöhungen auftreten. Wenn die Insulinproduktion nun weiter abnimmt und die hepatische Glucoseproduktion durch fehlende negative Rückkopplung der Glykogenolyse steigt, manifestiert sich der Diabetes. Es kommt zu pathologischen Nüchternblutglucosewerten und letztendlich zum Versagen der Inselzellen. Infolge dessen ist das Pankreas „ausgebrannt“.

Die Insulinresistenz als Hauptmerkmal des Diabetes mellitus Typ 2 entspricht der verminderten Insulinwirkung an den peripheren Zielzellen, vor allem an Muskel und Leber. Da hochnormale Insulinspiegel den Blutzuckerspiegel normalisieren können spricht man auch von einer relativen Insulinresistenz. Durch diesen Zustand wird die Glucoseverwertung an den insulinempfindlichen Geweben verringert und die hepatische Glucoseausschüttung kompensatorisch erhöht, was wiederum zur Hyperglykämie beiträgt.

Zusätzlich zur Insulinresistenz kommt beim Diabetes mellitus Typ 2 nach einer bestimmten Zeit die gestörte Insulinsekretion, bis das Pankreas die Produktion letztendlich einstellt. Hierfür werden weitere Gendefekte verantwortlich gemacht, deren Identifikation aber noch nicht gelungen ist. Gesichert ist zumindest, dass eine chronische Hyperglykämie sowie vermehrt freie Fettsäuren im Blut die Funktion der β -Zellen verschlechtern.

Gleichzeitig mit einer pathologischen Glucosetoleranz und einer Insulinresistenz gehen häufig weitere metabolische Störungen einher. Unter einem metabolischen Syndrom versteht man das gleichzeitige Auftreten von Insulinresistenz, arteriellem Hypertonus, Dyslipidämie, zentraler Adipositas und beschleunigtem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung. Auch dieses Syndrom nimmt an Häufigkeit in der Bevölkerung zu. Besonders Änderungen der Lebensgewohnheiten, vor allem Ernährung und Sport betreffend, wirken hier präventiv.

Die Gefahr der Krankheit Diabetes mellitus besteht zum anderen in den akuten Komplikationen, wie z.B. der diabetischen Ketoazidose infolge eines absoluten Insulinmangels, bei Typ 2-Diabetikern jedoch mehr in den chronischen Komplikationen. Diese betreffen verschiedene Organsysteme und erhöhen die Morbidität sowie Mortalität der Erkrankung. Unterschieden werden vaskuläre und nicht-vaskuläre Komplikationen. Die vaskulären Komplikationen werden unterteilt in mikrovaskuläre (u.a. Retinopathie,

Nephropathie, Neuropathie) und makrovaskuläre (u.a. koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebrovaskuläre Durchblutungsstörungen). Zu den nicht-vaskulären Komplikationen gehören z.B. Gastroparese, Infektionen, sexuelle Dysfunktionen oder Hautveränderungen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der chronischen Komplikationen nimmt mit der Hyperglykämiedauer zu. Da dieser Zustand beim Typ 2-Diabetiker häufig lange Zeit unentdeckt bleibt, haben die Patienten oft schon beim Zeitpunkt der Diagnosestellung Spätkomplikationen.

Die chronische Hyperglykämie gilt zwar als entscheidender ätiologischer Faktor bei der Entstehung diabetogener Komplikationen, allerdings ist noch unbekannt auf welchem Weg sie zu den zellulären und organischen Fehlfunktionen führt. Dazu gibt es vier zentrale Erklärungsansätze.

1. Die erste Hypothese besagt, dass es durch die erhöhte intrazelluläre Glucosekonzentration zu nicht enzymatischen Glycosilierungsvorgängen kommt. Dadurch entstehen so genannte AGEs (Advanced Glycosylation Endproducts). Diese bewirken Kreuzvernetzungen von Proteinen (z.B. Kollagen, extrazelluläre Matrix) und verändern letztendlich die Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix (Kim et al., 2009).
2. Der zweite Erklärungsansatz gründet auf der Beobachtung, dass bei Hyperglykämie ein Teil der Glucose über die Aldose-Reduktase zu Sorbit abgebaut wird. Dieser erhöhte Sorbit Spiegel beeinflusst zellphysiologische Abläufe und soll z.B. bei der diabetischen Katarakt und der Polyneuropathie eine Rolle spielen (Alexiou et al., 2009).
3. Die dritte Hypothese handelt von der durch Hyperglykämie verursachten Bildung von Diacylglycerol. Dieses soll die Proteinkinase C aktivieren, welche die Transkription für einige Gene, u.a. Fibronectin, Kollagen Typ IV oder auch extrazelluläre Matrixproteine, verändert (Ikeda et al., 2008).
4. Die vierte Theorie geht davon aus, dass durch die Hyperglykämie verschiedene Stoffwechselwege und Enzyme aktiviert werden, wie z.B. die Glykolyse oder die NO-Synthetase, bei denen vermehrt Sauerstoffradikale erzeugt werden. Der dadurch entstehende oxidative Stress spielt eine Schlüsselrolle bei der diabetischen Nephropathie (Forbes et. al, 2008).

Obwohl die Hyperglykämie als Auslöser der diabetischen Spätkomplikationen gilt, ist bislang unklar, ob alle Komplikationen auf den gleichen pathophysiologischen Vorgängen beruhen oder ob auch organbezogene Faktoren eine Rolle spielen.

1.2 Diabetische Kardiomyopathie

Neben vielen anderen Erkrankungen und Organschäden, die durch Diabetes verursacht werden, ist die Inzidenz der Myokardinsuffizienz bei Diabetikern im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht. Diese Erkrankung ist ein klinisches Syndrom, bei dem eine veränderte kardiale Struktur oder Funktion zu einem Unvermögen des Herzens führt, sich ausreichend mit Blut zu füllen oder dieses auszuwerfen. Die Herzinsuffizienz führt aufgrund der Tatsache, dass die metabolisierenden Gewebe nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden, zu einem unterschiedlich kombinierten Symptomenkomplex aus Kreislaufstauung, Luftnot, Erschöpfung und Schwäche. Ursächlich für eine Herzinsuffizienz können primäre Herzmuskelstörungen sein, wie z.B. Kardiomyopathien oder virale Myokarditiden, oder die kardiale Kontraktion wird sekundär nach Myokardinfarkten bei Koronaratherosklerose gestört. Im Laufe der Zeit reagiert das Herz auf eine chronische Volumenbelastung mit einer exzentrischen, auf eine chronische Druckbelastung mit einer konzentrischen Hypertrophie. Im weiteren Verlauf kommt es zur Herzdilatation und zum kardialen „Remodeling“, worunter man die häufig ungünstige Anpassung des Herzens an einen eingetretenen Myokardschaden, oft im Sinne einer Dilatation, versteht, sodass eine neue pathologische Geometrie entsteht.

Früher ging man davon aus, dass die Myokardinsuffizienz bei Diabetikern vor allem als Folge der koronaren Herzkrankheit (KHK) und somit der makrovaskulären Veränderungen anzusehen ist. Aber seit Anfang der 70er Jahre konnte im Rahmen großer epidemiologischer Studien gezeigt werden, dass Patienten mit einem Diabetes mellitus, unabhängig von einer koronaren Herzkrankheit oder einem arteriellen Hypertonus, eine chronische Herzinsuffizienz entwickeln können. Dies führte zur Entstehung des Begriffs der diabetischen Kardiomyopathie (Fein 1990, Fein & Sonnenblick 1994, Spector 1998). Zurzeit ist die diabetische Kardiomyopathie noch eine Ausschlussdiagnose, definiert als kardiale Dysfunktion bei Diabeteskranken, die nicht durch Koronaratherosklerose, arteriellen Hypertonus oder andere Grunderkrankungen des Herzens erklärt werden kann (Gilbert 2006). Allerdings gelten die KHK, die arterielle Hypertonie und die diabetische

Kardiomyopathie als die drei Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Diabetikern.

Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge, die zur Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie führen, sind noch immer nicht vollständig geklärt. Es gibt sowohl Veränderungen der systolischen als auch der diastolischen Funktion, die zur Myokardinsuffizienz führen (Fein & Sonnenblick 1994). Experimentelle Studien am Tiermodell haben gezeigt, dass die Erkrankung zu Funktionseinschränkungen vor allem des linken Ventrikels führt. Hierbei sollen Veränderungen im Myokard, vor allem in den kontraktilen Proteinen und im intrazellulären Kalziumstoffwechsel eine Rolle spielen (Fein & Sonnenblick 1994). Auch wurde eine Abnahme der linksventrikulären Compliance bei gleichzeitiger Zunahme des interstitiellen Bindegewebes beobachtet (Fein 1990). Andere Ursachen könnten mikrovaskuläre Erkrankungen, metabolische Entgleisungen oder die Entstehung von Fibrose sein (Spector 1998). Biopsie-gestützte Studien haben zusätzlich zur Fibrose einen Zelluntergang an Kardiomyozyten und Endothelzellen durch Apoptose und Nekrose ergeben, sowie eine Verringerung der Kapillardichte bei gleichzeitig zunehmender Dicke der Arteriolen (Gilbert 2006). Untersuchungen am Tiermodell bei Ratten, die einen Typ 2-Diabetes entwickeln, zeigten, dass bereits im prädiabetischen Stadium einerseits der Kollagengehalt und die extrazelluläre Fibrosierung im linksventrikulären Myokard zunehmen, dass andererseits auch die LV-Funktion Veränderungen zeigt (Mizushige et al. 2000, Fredersdorf et al. 2003).

1.3 Die extrazelluläre Matrix des Herzens

Neben zellulären Bestandteilen wie Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen besteht das Herz aus kardialen Bindegewebe, der sogenannten extrazellulären Matrix. Die Aufgabe dieser Matrix, einem komplexen Netzwerk von Strukturproteinen, besteht darin, die Myozyten zu einer strukturellen und funktionellen Einheit zu verbinden. Desweiteren soll das Herz in dem stetigen Bewegungsablauf seiner Pumparbeit unterstützt werden.

Das Bindegewebe setzt sich aus verschiedenen Kollagenfasern zusammen, wobei die beiden Hauptkomponenten der Kollagensubtyp I und III sind. Kollagen I liegt in Form dicker Kollagenfasern vor, die relativ steif sind und vor allem für die Koordination der Kraftverteilung

eine Rolle spielen (Doering et al. 1988, Weber et al. 1988). Kollagen III hingegen besteht aus dünnen Fasern, die für die Elastizität des Ventrikels von Bedeutung sind. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflusst somit sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion des Myokards und spielt eine entscheidende Rolle in der Güte der Herzfunktion (MacKenna et al. 2000).

Weitere Bestandteile der extrazellulären kardialen Matrix sind Elastin, Fibronectin, Laminin, Glykosaminoglykane, verschiedene Glykoproteine und auch Fibroblasten. Diese sind, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, zusammen mit den Kollagenfasern, in einer sehr komplexen Weise im extrazellulären Raum angeordnet. Das empfindliche Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix ist wichtig für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion. Im Gegensatz zu den Myozyten unterliegt die extrazelluläre Matrix einem ständigen Wandel durch Erneuerung, welcher die Neusynthese von Kollagenen, die strukturellen Umwandlung dieser und auch den Abbau der Matrix beinhaltet. Einerseits werden diese Vorgänge durch Hormonsysteme, wie das Renin-Angiotensin-System, reguliert (Tschöpe et al. 2004), andererseits durch bestimmte Enzyme, die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Bei einem Ausfall dieser Enzyme wird das Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix empfindlich gestört (Meiners et al. 2004). Im Rahmen von Untersuchungen zu Kardiomyopathien wurde festgestellt, dass zum einen die Kollagene Typ I, III und IV, sowie Fibronectin und Laminin, zum anderen aber auch MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 eine zentrale Rolle beim linksventrikulären „Remodeling“ spielen (Herpel et al. 2006, Gunja-Smith et al. 1996, Li et al. 1998).

1.4 Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihre natürlichen Inhibitoren (TIMPs)

Matrixmetalloproteinasen bezeichnen eine Familie von substratspezifischen Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, die als gemeinsames Merkmal ein Zinkatom im aktiven Zentrum haben. Durch Spaltung von Peptidbindungen werden durch die MMPs Proteine degeneriert. Über diesen Mechanismus gelingt es dieser Enzymfamilie Faserstrukturen der extrazellulären Matrix, wie Kollagene oder Elastane abzubauen (Parsons et al. 1997). Matrixmetalloproteinasen werden 1979 in Form einer Gelatinase in menschlichen Leukozyten das erste Mal in der Literatur beschrieben (Sopata et al. 1979). Zwei Jahre später wird eine

neutrale Gelatin-spezifische Proteinase in menschlichen Fibroblasten spezifiziert (Seltzer et al. 1981), die wenig später als MMP-2 identifiziert wird.

Inzwischen sind etwa 26 Enzyme beschrieben worden, die zur Familie der MMPs gehören (Hamacher et al. 2004). Diese werden in verschiedene Unterklassen eingeteilt, wobei die Einteilung anhand der Struktur und Substrathomologie der MMPs erfolgt. Dabei unterscheidet man Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membran-Typ-MMPs (MT-MMPs). Überschneidungen zwischen den einzelnen Klassen kommen vor. So kann die Gelatinase MMP-2, genauso wie die Kollagenasen auch, fibrilläre Kollagenfasern abbauen (Aimes et al. 1995). Die ersten vier genannten Klassen der MMP-Familie sind sezernierte Enzyme und degradieren verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Kollagene, Elastine oder Gelatine. MT-MMPs dagegen sind membrangebundene Enzyme (Cao et al. 1995), die vor allem dazu dienen, andere MMPs zu aktivieren (Cowell et al. 1998). Desweiteren wurden weitere MMPs entdeckt, die keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden konnten.

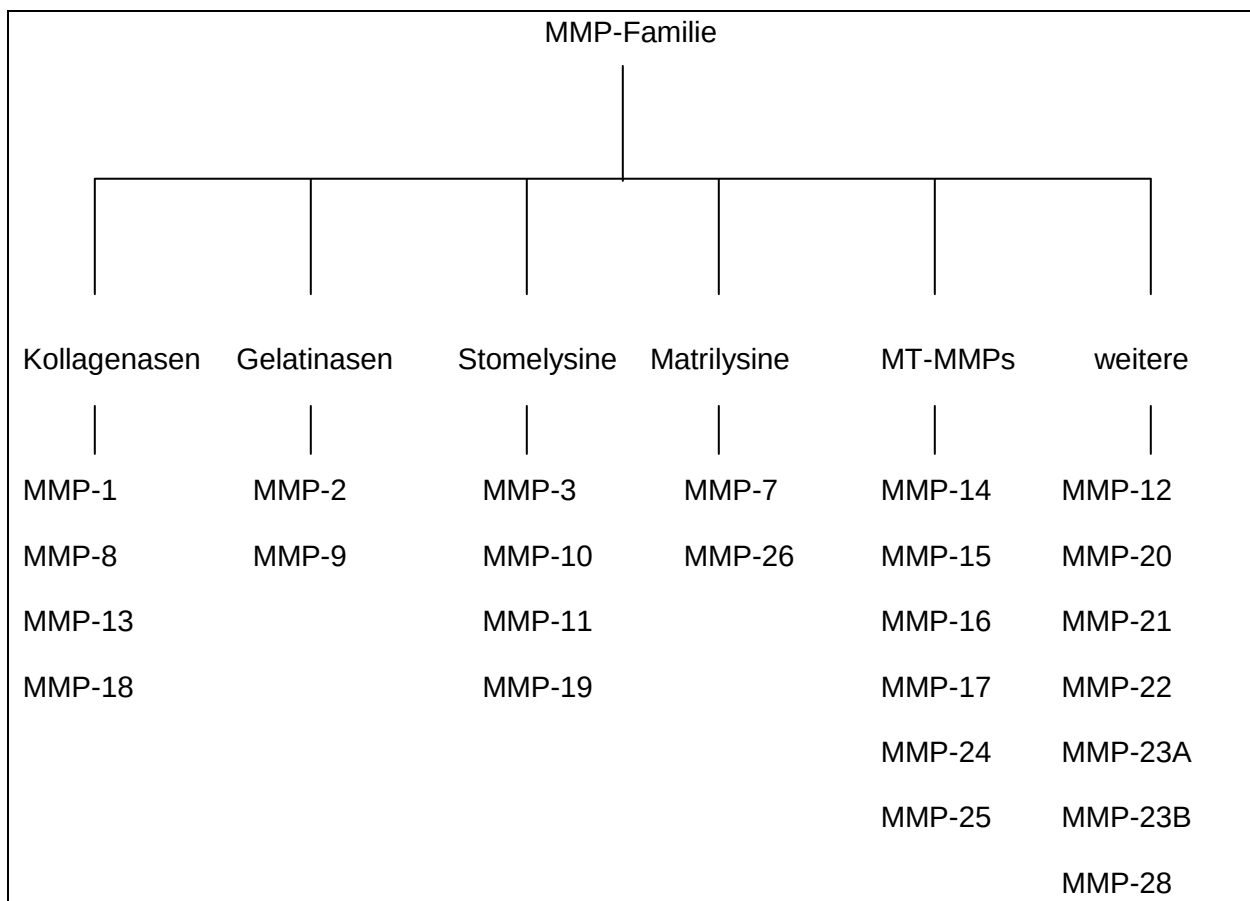


Abbildung 1.1: Einteilung der Matrixmetalloproteinasen in die verschiedenen Unterklassen anhand ihrer Struktur und Substratmorphologie.

Alle MMPs zeichnen sich durch eine ähnliche Grundstruktur aus, die aus drei Domänen besteht: einer N-terminalen Propeptidsequenz, welche bei Aktivierung gespalten oder entfernt wird, einer zentralen katalytischen Domäne, welche die Zink-Bindungsstelle beinhaltet und einer C-terminalen Domäne, welche die Bindung von TIMPs, verschiedenen Substraten und einen Teil der proteolytischen Aktivität beeinflusst. Die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) besitzen zusätzlich je drei fibronectinähnliche Domänen, die erforderlich sind, um Kollagen, Elastin und Gelatin zu binden und zu spalten. MMP-2 ist für den Abbau von Typ I-, II- und III-Kollagen zuständig. Bei Menschen scheint es außerdem eine Rolle bei der Osteogenese zu spielen (Visse und Nagase, 2003).

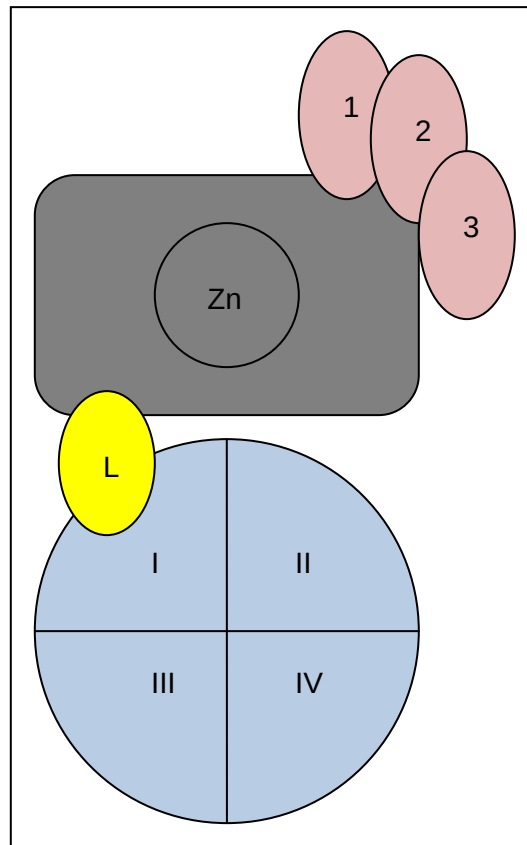


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9).

Die N-terminale Propetidsequenz wird zur Aktivierung abgespalten. Der graue Bereich ist die zentrale katalytische Domäne mit der Zink-Bindungsstelle. Über einen Linker ist diese mit der C-terminalen Domäne verbunden, die aus vier Hemopexin-Modulen besteht (I-IV). Zusätzlich zu dieser Grundstruktur besitzen die Gelatinasen drei fibronectinähnliche Domänen (1-3), die an die katalytische Einheit angegliedert sind; Zn = Zink, L = Linker.

Da die MMPs in vielen Prozessen zur Erhaltung und Stabilität der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen, ist eine effektive Kontrolle ihrer proteolytischen Aktivität wichtig für die Aufrechterhaltung der physiologischen Organfunktionen. Diese Regulation findet auf verschiedenen Ebenen statt, durch Genaktivierung, Transkription, Stabilisierung der mRNA, Translation, Sekretion des Proenzym, Bindung des Proenzym an Zellmembranen, Aktivierung des Enzyms, Hemmung durch spezifische Inhibitoren (TIMP) und durch Abbau und Beseitigung des Enzyms (Sternlicht und Werb, 2001).

Zytokine, Onkogene, Hormone und Wachstumsfaktoren nehmen Einfluss auf Genaktivität, Transkription, Translation und Sekretion (Matrisian, 1990, Meiners et al. 2004). Als Botenstoffe spielen hier Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α), *epidermal growth factor* (EGF), *basic fibroblast factor* (bFGF), *nerv growth factor* (NGF) sowie *nuclear factor κ B* (NF κ B) eine Rolle (Birkedal-Hansen, 1993, Meiners et al. 2004). Auch ein sogenannter *extracellular MMP inducer* (EMMPRIN), ein Oberflächenglycoprotein aus der Immunglobulinsuperfamilie scheint in die Syntheseregulierung einzugreifen (Schmidt et al. 2006). Des Weiteren wird eine Hemmung der Genexpression durch Interferon- γ (Inf- γ), Interleukin-4 (IL-4), *transforming growth factor- β* (TGF- β), Östrogene, Progesteron und Glukokortikoide beschrieben (Birkedal-Hansen, 1993). Eine zusätzliche Regulation der MMP-Aktivität findet extrazellulär statt. Die meisten MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert. Die Aktivierung erfolgt dann durch Abspaltung der N-terminalen Propeptidsequenz, wodurch das katalytische Zentrum des Enzyms freigelegt wird. Dieser Vorgang wird auch als „Cystein-Switch“ bezeichnet: die Bindung zwischen dem Zinkion der katalytischen Domäne und dem freien Cysteinrest der N-terminalen Propeptidsequenz wird destabilisiert, das Cystein dissoziiert vom Metallion, woraufhin das katalytische Zentrum seine Konformation ändert und aktiv ist (Springman et al 1990, Van Wart und Birkedal-Hansen 1990). Diese Aufhebung der Cystein-Zink-Bindung erfolgt auf verschiedenen Wegen. Pro-MMP-9 kann z.B. in vitro durch MMP-2 aktiviert werden (Fridman et al. 1995) und in vivo durch MMP-3, MMP-10, MMP-13 oder Trypsin (Vempati et al. 2007). Pro-MMP-2 hingegen wird über einen Wirkmechanismus an der Zelloberfläche aktiviert, der sowohl von MT1-MMP, als auch von TIMP-2 gesteuert wird. Dabei bindet TIMP-2 an die Hemopexin-Domäne von Pro-MMP-2 und an MT1-MMP, wodurch die katalytische Einheit von MMP-2 freigelegt wird (Morgunova et al 2002).

Die Hemmung der MMP-Aktivität erfolgt spezifisch durch die Inhibitoren der MMPs, die „Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteases“ (TIMPs). Diese gehen eine reversible, nicht-

kovalente Bindung im Verhältnis 1:1 mit den MMPs ein, entweder am aktiven Zentrum oder an anderen Stellen der MMPs (Gomez et al. 1997, Malemud 2006). Von der Familie der TIMP-Mitglieder sind bislang vier Typen (TIMP 1-4) charakterisiert worden, wobei vor allem TIMP-1 und TIMP-2 eine Schlüsselrolle für die MMP-Aktivität spielen. Sie sind als freie Moleküle ubiquitär vorhanden und sind festbindende Inhibitoren, sowohl aller aktivierter MMPs, als auch von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9. Auch werden ihnen in vitro die Eigenschaften eines Inhibitors der Angiogenese und Ähnlichkeiten mit denen eines Wachstumsfaktors zugeschrieben. Bei der Aktivierung von MMP-2 wirken sie im Zusammenspiel mit den MT-MMPs (Gomez et al. 1997, Morgunova et al. 2002). TIMP-1 bildet bevorzugt einen Hemmkomplex mit Pro-MMP-9 und aktiviertem MMP-9 (Vempati et al. 2007), TIMP-2 hemmt Pro-MMP-2 und aktiviertes MMP-2. In einigen Fällen kann es auch für dessen Aktivierung sorgen (Morgunova et al. 2002).

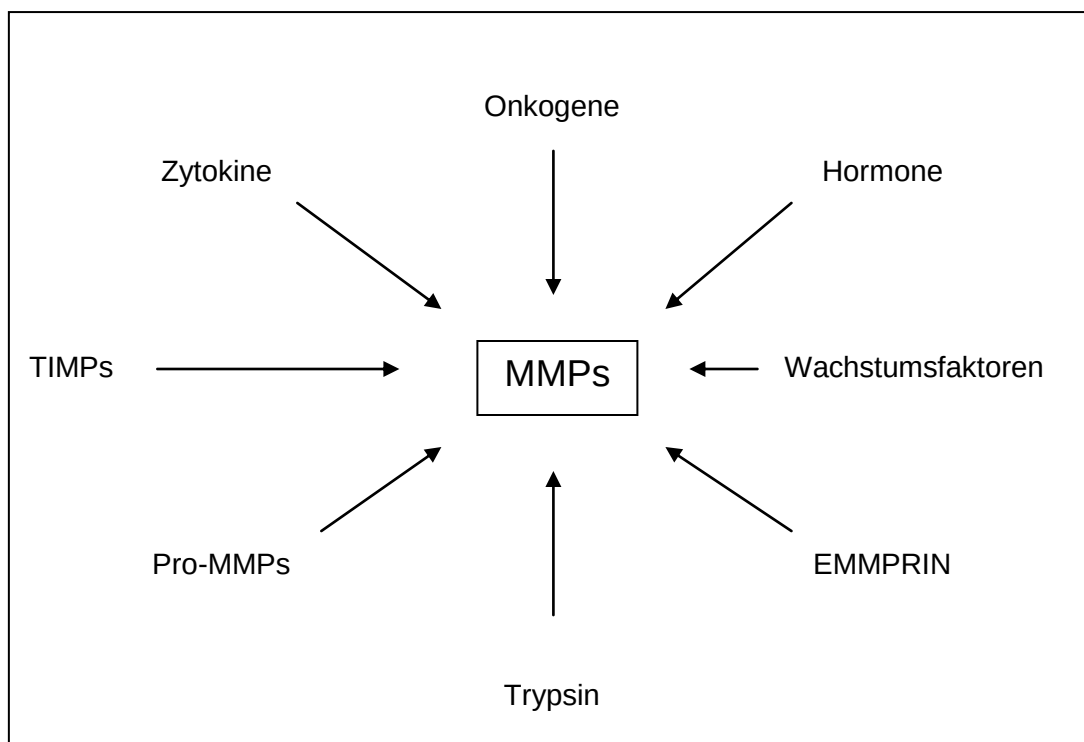


Abbildung 1.3: Regulation der MMPs durch aktivierende und hemmende Einflüsse über intra- und extrazelluläre Mechanismen. MMP = Matrixmetalloproteinasen, TIMP = „Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteases“, Pro-MMP = Vorstufen der Matrixmetalloproteinasen, EMMPRIN = „extracellular MMP-Inducer“.

Mit ihrer Fähigkeit zum Abbau extrazellulärer Faserstrukturen sind MMPs an verschiedenen Umbauprozessen des Gewebes beteiligt. Dies können physiologische Vorgänge sein, wie z.B. Embryogenese, Morphogenese, v.a. der Lunge, Reproduktionsvorgänge, Geweberesorption, „Remodeling“-Prozesse (Nagase, Woessner, 1997, Kheradmand et al. 2001) oder auch Wundheilung (Kahari, Saarialhou, 1997). MMPs sind auch für viele pathologische Reaktionen im menschlichen Körper von Bedeutung. Dies betrifft häufig Krankheiten, die mit Gewebedestruktion und Entzündungsreaktionen korrelieren. So lassen sich MMPs bei Rheumatoider Arthritis (John und Tuszynski 2001), Skelettdysplasie (Malemud 2006), Peridontitis (Birkendal-Hansen 1993) und Leberfibrose (Zhang et al. 2006) nachweisen. MMPs induzieren außerdem das Tumorwachstum in verschiedensten malignen Tumoren (Hamacher et al. 2004, John und Tuszynski 2001), während TIMPs sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasenbildung sowie die Angiogenese hemmen (Gomez et al. 1997).

Eine besondere Bedeutung haben die MMPs auch bei verschiedenen Herzerkrankungen. Im Myokard sind bis jetzt die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 nachgewiesen, sowie die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Auch MMP-3 und MT1-MMP findet man im Herzgewebe, sie dienen vermutlich als Aktivatoren für die Gelatinasen. Von den TIMPs werden alle 4 Unterformen im Myokard nachgewiesen (Spinale 2007). Auf die häufige Krankheit Koronararteriosklerose wirken sich die MMPs negativ aus, indem sie die Stabilität der Plaques herabsenken (Malemud 2006, Visse und Nagase 2003). Desweiteren induzieren sie vaskuläres und kardiales „Remodeling“, sowie linksventrikuläres „Remodeling“ nach Myokardinfarkt (Visse und Nagase 2003). Auch das linksventrikuläre „Remodeling“ bei hypertensiven Herzerkrankungen wird durch MMPs gefördert (Sakata et al. 2004), genauso wie das „Remodeling“ bei Herzinsuffizienzerkrankungen (Spinale 2002). Desweiteren kann gezeigt werden, dass das linksventrikuläre „Remodeling“ durch Inhibition von MMPs verbessert werden kann (Morita et al. 2006), allerdings muss dies in einem engen zeitlichen Rahmen zur Entstehung des „Remodeling“s geschehen (Li et al. 2002). Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 spielen MMPs in verschiedenen Organen eine wichtige Rolle. So wird im Rahmen des vaskulären „Remodeling“s ein Anstieg der MMP-Aktivität nachgewiesen, der mit der Zunahme der Hypertrophie und der Kalzifizierung der Gefäße zusammenhängt (Song und Ergul 2006). Eine herabgesetzte Aktivität der MMPs wird bei der diabetischen Nephropathie festgestellt (Mason und Wahab 2003), während andere Studien auch eine gesteigerte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in Typ 2-diabetisch veränderten Glomeruli nachweisen, wobei hier vor allem ein verstärkter Abbau von Elastinen mit einer gleichzeitigen

Zunahme an steiferen Kollagenformen zu verzeichnen ist (Rodriguez et al. 2006). Frühere Untersuchungen an Versuchstieren mit Typ 2-Diabetes (Zucker diabetic fatty rat (ZDF-Ratten)) zeigen, dass die Glomeruli der diabetischen Tiere eine deutliche Zunahme des Kollagengehaltes im Vergleich zu nicht-diabetischen Tieren aufweisen, wobei dies mit einer Abnahme der Aktivität von MMP-9 bei gleichzeitiger Zunahme der Aktivität von TIMP-1 einhergeht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beobachteten strukturellen Veränderungen der Glomeruli im Rahmen des Typ 2-Diabetes vermutlich Folge eines Ungleichgewichts zwischen Degradation und Synthese der extrazellulären Matrix sind (Schaefer et al. 1997). Auch in-vitro Experimente an isoliert-kultivierten kardialen Fibroblasten konnten zeigen, dass eine hohe Glucosekonzentration im Medium sowohl zu einer Zunahme des Kollagengehaltes wie auch zu einer Abnahme der MMP-Aktivität führt, was die Vermutung nahelegt, dass Hyperglykämie entscheidend an der Entstehung der kardialen Fibrose beteiligt ist (Asbun et al. 2006). Entsprechende Untersuchungen am Myokard diabetischer Versuchstiere liegen bislang noch nicht vor und sind daher Gegenstand der hier präsentierten Experimente.

1.5 Tiermodell

Die männliche homozygote ZDF-Ratte (Zucker diabetic fatty rat, Drt-fa, strain code 370) ist ein etabliertes Tiermodell des Typ 2-Diabetes des Menschen (Tokuyama et al. 1995). Nach der Säugeperiode (bis zur 4. Lebenswoche) schreiten die Tiere schnell von einem prädiabetischen Stadium der Hyperinsulinämie mit Euglykämie über zu einem hyperglykämischen Insulinmangelstadium mit einem offenen Diabetes. Die ZDF-Ratte wurde durch eine partielle Inzucht aus dem Stamm der Zucker (fa/fa) Ratten heraus gezüchtet. Die Mutation beruht auf einer Veränderung am Leptin-Rezeptor (fa), die autosomal rezessiv vererbt wird und bei den homozygoten Tieren zur Ausbildung einer Fettleibigkeit führt. Den ZDF-Ratten und den Zucker (fa/fa) Ratten (strain code 186) sind eine Insulinresistenz und eine daraus resultierende Hyperinsulinämie gemeinsam, die sich schon mit dem Ende der Säugezeit manifestiert. Im Gegensatz zur Zucker-Ratte, deren pankreatische β -Zellen sehr stabil sind, kommt es jedoch bei der ZDF-Ratte im weiteren Verlauf zu einem geringfügigen, aber doch signifikanten Abfall des Insulinspiegels, welcher auch die darauf folgenden Wochen anhält. Als Folge findet kein ausreichender Glukosetransport in die Zellen des peripheren Gewebes (Skelettmuskulatur) statt, da dort zu diesem Zeitpunkt schon größtenteils eine Insulinresistenz vorliegt. Ebenso bleibt die insulinbedingte Unterdrückung

der Glukoseproduktion in der Leber aus. Dadurch kommt es bei den ZDF-Ratten zu einer Hyperglykämie. Das Versagen der pankreatischen β -Zellen wird der exzessiven Anhäufung von Triglyzeriden in der Pankreas zugeschrieben (Zhou et al. 1998). Dieses Modell eröffnet daher die Möglichkeit, Untersuchungen in verschiedenen Stadien der Erkrankung durchzuführen. Nicht-diabetische Kontrolltiere, die heterozygot für die Mutation im Leptin-Rezeptor sind, können zum Vergleich herangezogen werden. ZDF-Ratten und die schlanke heterozygote Zucker Ratte sind in Deutschland kommerziell bei Charles River (Sulzfeld) erhältlich.

1.6 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zur Beurteilung des Stellenwertes der Matrixmetalloproteinasen bei der Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie beim Typ 2-Diabetes beizutragen. Im Einzelnen lassen sich folgende Fragestellungen definieren:

- Gibt es Unterschiede in der Expression der MMP und TIMP mRNAs bzw. der Proteine in linksventrikulärem Myokard im Tiermodel bei nicht-diabetischen und Typ 2-Diabetes-Tieren?
- Ist die Expression der MMPs und TIMPs bzw. der Proteine abhängig vom Lebensalter der Tiere und vom Stadium der Diabeteserkrankung?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Veränderung im Stoffwechsel der MMPs und TIMPs und der Fibrosierung des Myokards?
- Aus welchen Zellen setzt sich das Myokard in den verschiedenen Altersstufen und diabetischen Stadien zusammen?

2.2 Färbungen an linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten

2.2.1 Aufarbeitung des linksventrikulären Myokards für Paraffinschnitte

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Organe in der aufsteigenden Alkoholreihe zuerst entwässert (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol, Xylol jeweils 2 x 5 min) und dann in Paraffin gegossen. Zum Schneiden wurden die Paraffinblöcke auf den Schneidetisch aufgebracht. Die 4-6 µm dicken Schnitte, seriell auf einem Mikrotom (Reichert-Jung, Wien, Nussloch) angefertigt, wurden auf einem Objektträger aufgenommen und 2 h bei 37°C getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2 Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten aus linksventrikulärem Myokard

Zur Vorbereitung für die Färbung wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert (Xylol 2 x 5 min, 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol jeweils 2 x 2 min). Nach kurzem Schwenken in Aqua dest. wurden die Schnitte für ca. 30 min mit der Sirius Red-Färbelösung (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) gefärbt und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Die Schnitte wurden dann in der aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol jeweils kurz, Xylol 2 x 5 min) entwässert und anschließend mit Eukit® (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte als computergesteuerte Phasenanalyse mithilfe CellF-Software (Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)).

2.2.3 Aufarbeitung des linksventrikulären Myokards für Kryoschnitte

Direkt nach Entnahme des linksventrikulären Myokards wurden die Gewebstücke in TissueTek® (Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim) fixiert. Zur Herstellung der Schnitte wurden die Präparate auf den Schneidetisch des Kryotoms (Leica, Nussloch) festgefroren und es wurden serielle Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt. Je drei dieser Schnitte wurden hintereinander auf einem Objektträger aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten aus linksventrikulärem Myokard

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger mit den Kryoschnitten für 5 min in gekühltem Aceton (-20°C) fixiert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung in der Waschlösung für 15 min. Der Primärantikörper inkubierte für 1 h bei 37°C in der feuchten Kammer und nicht

gebundene Reste wurden danach 3 x 5 min mit der Waschlösung bei Raumtemperatur abgewaschen. Der Sekundärantikörper GamPo (Dianova, Hamburg) inkubierte ebenso 1h bei 37°C in der feuchten Kammer. Nach 3 weiteren Waschschritten für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 5 min mit 0,1M Na-Acetat (Natrium-Acetat) (pH 4,8) gesäuert. Die Färbelösung wurde für 7-8 min auf die Objektträger gegeben und die Reaktion danach mit EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) (10mM, pH 5,0) gestoppt. Nach 5 min Waschen in der Waschlösung wurde für 30 sec mit Hämalaun (Chroma Waldeck GmbH & Co.KG, Münster) gegengefärbt. Dieses wurde unter fließendem Wasser 3 min lang wieder abgespült und die Schnitte wurden mit Aquatex-Eindeckmedium (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt.

Als Primärantikörper fanden Verwendung:

- Maus Anti-Ratte Prolyl 4-Hydroxylase (gegen Fibroblasten), 2 mg/ml, Verdünnung 1:100 in Waschlösung (Millipore, Billerica, MA (USA))
- Smooth Muscle Ab1 (gegen glatte Muskelzellen), 200 µg/ml, Verdünnung 1:300 in Waschlösung (Dianova, Hamburg)
- Maus Anti-Ratte Pecam-1 [CD31] (gegen Endothelzellen), Verdünnung 1:100 in Waschlösung (Millipore, Billerica, MA (USA))

2.2.5 Sirius Red Färbung von Kryoschnitten aus linksventrikulärem Myokard

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger mit den Kryoschnitten für fünf min in gekühltem Aceton (-20°C) fixiert. Nach kurzem Schwenken in Aqua dest. wurden die Schnitte für ca. 30 min mit der Sirius Red-Färbelösung gefärbt und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Die Schnitte wurden dann in der aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol jeweils kurz, Xylol 2 x 5 min) entwässert und anschließend mit Eukit® eingedeckt.

2.3 Bestimmung der mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten mittels RT-PCR

2.3.1 Überblick über die „Real-Time PCR“

1984 veröffentlichte K.B. Mullis eine Methode zur *In-vitro*-Amplifizierung von Nucleinsäure-Fragmenten, die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR). Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit spezifische DNA-Abschnitte zu vervielfachen und somit kleinste Mengen an DNA zu detektieren.

Das Prinzip der PCR besteht in einer enzymatischen Vervielfachung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sogenannten Primern liegt, welche eine komplementäre Basenabfolge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes haben. Zu Beginn jedes PCR-Zyklus steht in der Regel ein Denaturierungsschritt, der zur Auftrennung des Doppelstrangs dient. Als nächstes folgt der sogenannte Hybridisierungsschritt, währenddessen die Primer an die 5'-Enden des komplementären DNA-Stranges binden. Als letztes folgt der Syntheseschritt. Hierzu werden zum einen Desoxyribonucleotide benötigt, die komplementär an den DNA-Strang angebaut werden, zusätzlich muss als Enzym eine DNA-Polymerase zugesetzt werden. Am häufigsten Verwendung findet die Taq-Polymerase.

Während jedes Zyklus sollte sich die Menge an spezifischen DNA-Abschnitten verdoppeln, da diese im nächsten Zyklus wiederum als Matritze zur Verfügung stehen. Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so wird der gewünschte DNA-Abschnitt also exponentiell vervielfältigt. Theoretisch ergibt sich mit 20 Reaktionszyklen eine 2^{20} ($=10^6$)-fache Amplifizierung des Moleküls. In der Praxis wird allerdings nur eine 10^5 -fache Amplifizierung erreicht, da sowohl zu Beginn, als auch am Ende der PCR die Bedingungen nicht optimal sind. Um genauere Aussagen über die Ausgangsmenge der DNA machen zu können, wurde die Real-Time PCR entwickelt.

Das Prinzip der Real-Time PCR besteht darin, dass dem Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff zugesetzt wird, der mit der Ziel-DNA interkaliert. Die Fluoreszenz, welche proportional mit der Menge an amplifizierter DNA steigt, wird gemessen und somit die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt. Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* (C_T -Wert). Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

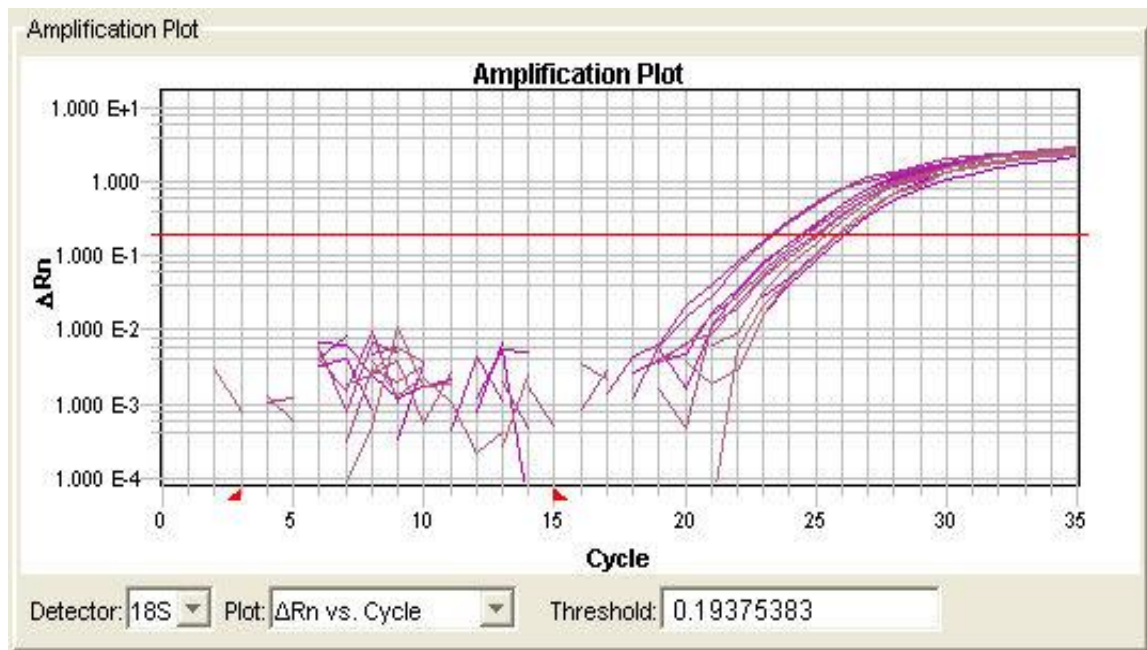


Abbildung 2.2: Exemplarische Darstellung von C_T -Werten mehrerer Proben. Der C_T -Wert ist aus der Kreuzung der Kurven mit der roten Linie abzulesen.

Am häufigsten Anwendung als interkalierender Farbstoff findet SYBR[®]-Green I. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch in die DNA ein und führt somit bei fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Ein Nachteil der unspezifischen Bindung ist, dass auch ein Fluoreszenzsignal bei Artefakten, wie zum Beispiel Primerdimeren oder Mutationen geliefert wird. Eine Differenzierung zwischen Produkt und Primerdimeren kann im Anschluss an den PCR-Zyklus durch eine Schmelzkurve gemacht werden. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Primerdimere und Mutationen schmelzen bei geringeren Temperaturen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

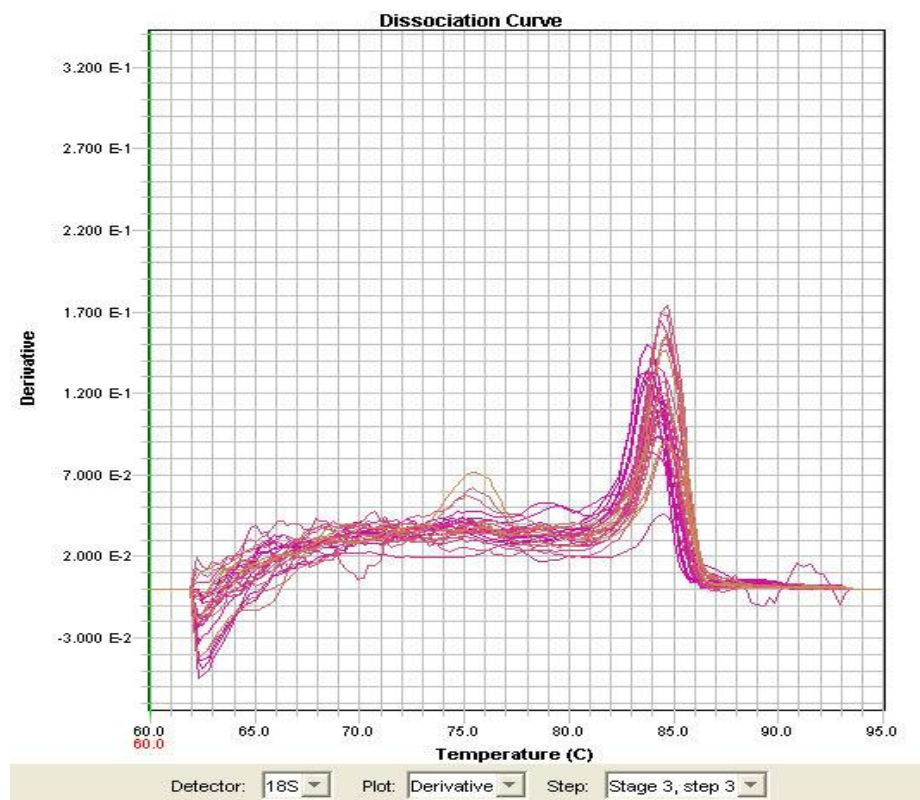


Abbildung 2.3: Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurve zur Differenzierung zwischen Produkten und Artefakten.

2.3.2 Homogenisierung linksventrikulären Myokards

Zur Isolation von RNA aus dem Myokard der Ratten musste dieses homogenisiert werden. Dies kann zum einen durch Zermörserung, zum anderen durch Zerkleinerung mit dem Ultra-Turaxx (Ika Werke GmbH & Co.KG,Staufen) erreicht werden. In diesem Fall fand die erste Methode Anwendung, da diese nach Austestung beider Methoden zu den besseren Ergebnissen geführt hat.

Von dem tiefgefrorenen linksventrikulären Myokard wurde ein 50-100 mg schweres Stück mit einem Skalpell abgetrennt, welches mit einem Mörser zerdrückt wurde, bis feines Pulver entstand. Das pulverige Gewebe wurde in Eppendorfgefäße umgefüllt, direkt weiterverarbeitet oder wiederum bei -80°C tiefgefroren.

2.3.3 RNA-Isolation aus linksventrikulärem Myokard

Das homogenisierte Gewebe wurde mit 1 ml Trizol® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl gekühltem Chloroform und starkem Vortexen inkubierte die Mischung weitere 2-3 min bei Raumtemperatur. Die Gesamt-RNA aus dem Gewebe wurde nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt. Nach Zugabe von 0,5 ml 100%igem Isopropanol und Mischen inkubierte der Ansatz 10 min bei

Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein weiterer Arbeitsschritt in der Zentrifuge (12.000 g, 10 min, 20°C) bei der die RNA als Pellet ausgefällt wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol in der Zentrifuge (7500 g, 5 min, 4°C) gewaschen. Erneut wurde der Überstand abpipettiert. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 50 µl 0,05%igem DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat) aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt, ebenso die Reinheit der RNA-Extraktion (Quotient der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm).

2.3.4 Agarosegelelektrophorese zur RNA – Auftrennung

Zur Überprüfung der RNA-Isolation wurde die RNA in einem Agarosegel (1,2%) aufgetrennt. Dabei wandert die RNA in dem Gleichspannungsfeld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgrund ihrer Säureeigenschaft zum (+)-Pol. 0,6 g Agarose wurden in 50 ml 1XMOPS-Puffer (3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure) aufgelöst. Die Mischung wurde in der Mikrowelle mehrmals aufgeköcht bis sie blasenfrei war. Während des Abkühlens wurden dem Gel 2,6 ml 37%iges Formaldehyd und 10 µl Ethidiumbromid zugefügt. In die Gelkammer wurden die Begrenzungen und ein passender Kamm mit einer für die Proben entsprechenden Anzahl an Taschen gesetzt. Sobald das Gel kalt genug war, wurde es blasenfrei in die Kammer gegossen. Nach Erstarren des Gels (Dauer ca. 30 min) und Entfernen der Begrenzungen und des Kamms wurde das Gel in die Wanne eingesetzt. Die Wanne wurde mit Laufpuffer (1XMOPS-Puffer) gefüllt. Die RNA-Proben, für die Auftrennung im Gel mit dem RNA-Probenpuffer versetzt, wurden nach 5 min Denaturierung bei 65°C eingefüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V für ca. 1 h. Die anschließende Auswertung gelang mittels UV-Transilluminator und Fotodokumentation.

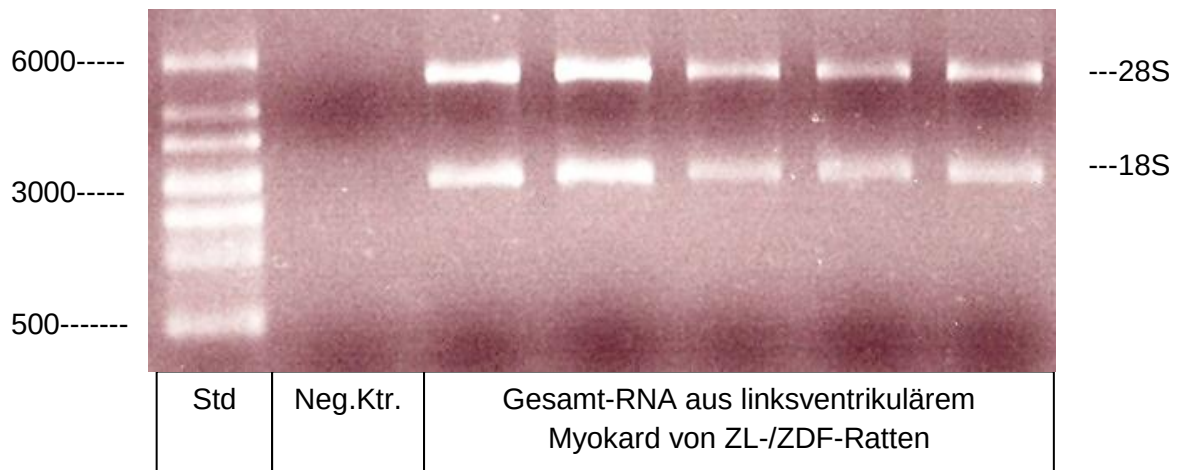


Abbildung 2.4: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1,2%) zur elektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA. Die Positionen der 28S und 18S rRNA ist am rechten Bildrand markiert. Als Negativ-Kontrolle wurde H₂O mitgeführt. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig aufgetragenen RNA-Standards in Basenpaaren an.

2.3.5 Reverse Transkription der mRNA aus linksventrikulärem Myokard in cDNA

Die RNA-Proben wurden mit Hilfe der gemessenen Konzentration auf eine Gesamtmenge von 5 µg eingestellt und in 0,5 ml Eppendorfgefäßen auf 10 µl mit destilliertem, RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Nach der Denaturierung für 5 min bei 68°C, wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert. Zu jeder Probe wurden nun 9 µl Mastermix (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben, der sich für eine einzelne Probe wie folgt zusammensetzte:

Reagenz	Volumen [µl]	Konzentration
5X Puffer	4	5X
RNA-Guard	1	8,7 Units/µl
dNTPs	1	Je 4 mM
pd(N6)-Primer	1	10 mmol/µl
DTT	2	0,1 M

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Mastermixes zur reversen Transkription der RNA-Proben (dNTPs=Desoxyribonukleosidtriphosphate, pd(N6)=*random hexamer primer*, DTT=Dithiothreitol)

Als letztes wurde zu jeder Probe 1 µl Reverse Transkriptase pipettiert.

Die Proben wurden gevortext und abzentrifugiert, bevor sie für 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubierten. Anschließend wurden sie dort für 5 min auf 95°C erhitzt, um die Reaktion zu inaktivieren. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und nochmals abzentrifugiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.6 Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.3.6.1 Primer

Für die gewünschten Gensequenzen (MMP-2, MMP-9, TIMP-1) wurden anhand der ermittelten mRNA-Sequenz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) spezifische Primer ausgewählt und synthetisiert (Super Array Bioscience Corporation, Frederick (USA)).

<i>Gen</i>	<i>Primersequenzen</i>	<i>Amplifizierter Bereich (Größe des Fragments in bp)</i>
MMP-2	5`- gcccttaaaagtatggagcgac- 3` 5` -ctaagagtgaaactactgct- 3`	751` – 900` (150)
MMP-9	5`-gcgagacactaaaggccattc- 3` 5`-gcgccacacctcgcgccact- 3`	287` - 437` (151)
TIMP-1	5`-tctggcatcctctgttgcta- 3` 5`-aggccaagcggatgtggggt- 3`	81` - 276` (196)

Tabelle 2.2: Sequenzen und Amplifikationsbereiche der verwendeten Primer.

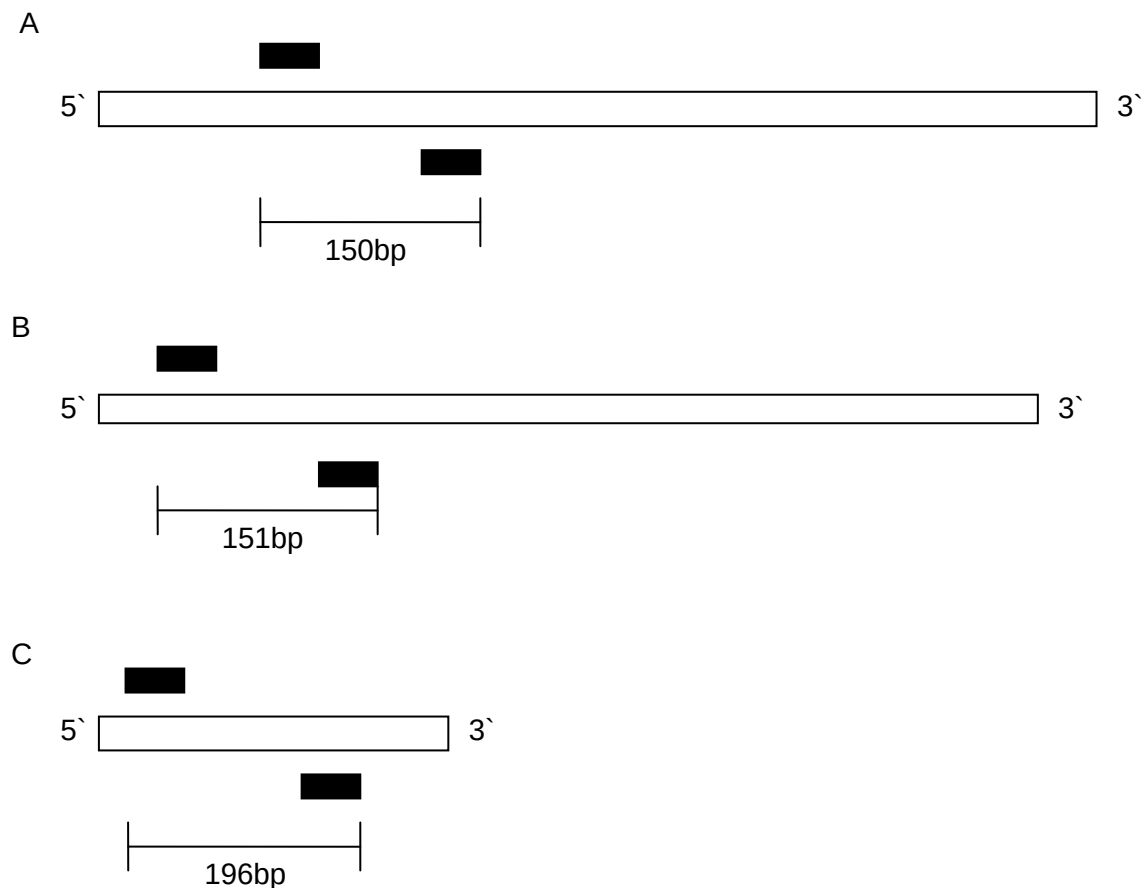


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der mRNA-Sequenzen mit den jeweils spezifischen Primern für die gewünschte Sequenz. A: mRNA-Sequenz von MMP-2 (Gesamtlänge 3281bp); B: mRNA-Sequenz von MMP-9 (Gesamtlänge 2986bp); C: mRNA von TIMP-1 (Gesamtlänge 740 bp).

2.3.6.2 Optimierung der Primerkonzentration

Zur Evaluierung der optimalen Primerkonzentration wurden im Thermocycler Probedurchläufe mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Primers gefahren. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1%igen Ethidiumbromidgel im Transilluminator visualisiert.

2.3.6.3 Optimierung der Hybridisierungstemperatur für MMP-9

Um die optimale Hybridisierungstemperatur für die PCR mit MMP-9 herauszufinden, wurden im Thermocycler Probedurchläufe mit einem Temperaturgradienten gefahren. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1%igen Ethidiumbromidgel im Transilluminator visualisiert, so dass die beste Temperatur für den Hybridisierungsschritt ermittelt werden konnte.

2.3.6.4 Optimierung der Templatekonzentration für MMP-9

Zur Bestimmung der optimalen Templatekonzentration für die PCR mit MMP-9 wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Templatekonzentrationen im Thermocycler gefahren. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Ethidiumbromidgel visualisiert.

2.3.6.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten

Um die Entstehung bestimmter DNA-Abschnitten zu überprüfen, können die entsprechenden Proben auf ein Agarosegel aufgebracht werden und elektrophoretisch getrennt werden. Die DNA trägt eine negative Ladung, weshalb sie im elektrischen Feld in Richtung des (+)-Pols wandert. Die DNA-Moleküle werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. Durch Vergleiche mit geeigneten Marker-Molekülen lässt sich eine Größenabschätzung unbekannter Moleküle durchführen. Um das Ergebnis einer Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid zugegeben, welches an die DNA-Moleküle bindet, indem es zwischen benachbarte Basenpaare interkaliert. Für ein 1%iges Gel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1XTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) aufgelöst. Die Mischung wurde in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht, bis sie blasenfrei war. Während der Abkühlung wurden dem Gel 10 µl Ethidiumbromid zugefügt. In die Gelkammer wurden die Begrenzungen und ein passender Kamm eingesetzt. Sobald das Gel kalt genug war, wurde es blasenfrei in die Kammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Begrenzungen und der Kamm entfernt und das Gel in die Wanne eingesetzt. Die Wanne wurde mit Laufpuffer, 1XTBE-Puffer, gefüllt. Anschließend konnten die Proben, mit 2 µl Orange G als Ladepuffer versetzt, einpipettiert werden. Nach einer Laufzeit von 1-1,5 h bei 70-80 V wurde das Gel im UV-Transilluminator ausgewertet. Die DNA-Banden fluoreszierten nun aufgrund der Bindung des Ethidiumbromids.

2.3.6.6 Restriktionsanalytische Kontrolle der produzierten Sequenzen

Zur Bestätigung der Spezifität der verwendeten Primer wurde ein Restriktionsverdau vorgenommen. Hierzu wurde die Sequenz der amplifizierten DNA-Abschnitte in ein Suchprogramm im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) eingegeben, dass einem eine Auswahl an Restriktionsenzymen auflistet.

Die folgenden Restriktionsendonukleasen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden für den Verdau verwendet:

<i>Primer</i>	<i>Sequenzlänge</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>1. Stück</i>	<i>2. Stück</i>
MMP-2	150 bp	Bcc I	30 bp	120 bp
MMP-9	151 bp	Bam H I	109 bp	42 bp
TIMP-1	196 bp	Eco 31 I	130 bp	66 bp

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme und ihrer Schnittstellen für die amplifizierte MMP-/TIMP-Sequenzen.

Für die Restriktionsanalyse wurden 10 µl einer beliebigen DNA-Probe, die in der PCR mit dem Primer amplifiziert worden war, verwendet. Diese wurden mit dem Restriktionsenzym versetzt. Dabei wurden nach Herstellerprotokoll 10 U eingesetzt. Desweiteren wurden je 2 µl des entsprechenden Puffers zugeführt. Für Bcc I wurden noch 0,5 µl BSA (Bovines Serumalbumin) hinzugefügt. Die Ansätze wurden auf 30 µl mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37°C und die anschließende Denaturierung für 5 min bei 72°C. Zur Visualisierung wurden die Proben auf ein 1%iges Ethidiumbromid-Gel aufgetragen.

2.3.6.7 Durchführung der RT-PCR

Für eine quantitative Real-Time PCR wurde zunächst eine Standardreihe vorbereitet, anhand derer die Genauigkeit der Messung später überprüft werden konnte. Dazu wurde eine beliebige Probe, die gemessen werden sollte, ausgewählt. Von dieser Probe wurde mit Aqua dest. eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) hergestellt. In die 384-Well-Platte wurden pro Well 0,5 µl Primer (Konzentration je 10µM) pipettiert. Anschließend wurden 9 µl Mastermix in jedes Well hinzugefügt, wobei sich der Mastermix (Eurogentec SA, Seraing (Belgien)) wie folgt zusammensetzte:

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [μl]</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Endkonzentration im Gesamtsatz (10 μl)</i>
10X Puffer	1	10X	1X
MgCl ₂	0,7	50 mM	3,5 mM
dNTPs	0,4	Je 5 mM	Je 0,2 mM
dH ₂ O	6,5		
SYBR [®] Green	0,3	1:500	1:15000
Taq Polymerase	0,05	5 Units/μl	0,25 Units

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR (dNTPs=Desoxyribonukleosidtriphosphate).

Als letztes wurde die cDNA-Probe zugefügt.

Jede Probe wurde doppelt bestimmt, sowohl beim internen Standard, als auch beim Zielgen. Die 384-Well-Platte wurde nach Zentrifugation (3000 g, 1 min) in das Fast-Real-Time-PCR-Gerät gestellt. Dort durchlief sie folgendes Programm:

<i>Schritt</i>	<i>Vorgang</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1.	Denaturierung 1	15 min	95°C
2.	Denaturierung 2	15 sec	95°C
3.	Hybridisierung	30 sec	55°C
4.	Synthese	30 sec	72°C
5.	Schmelzkurve		

Tabelle 2.5: Programm der PCR

Von den Schritten 2. – 4. wurden 40 Zyklen durchlaufen. Anschließend konnten die Schmelzkurven betrachtet und die C_T -Werte abgelesen werden. Für die Ansätze, die mit MMP-9 getestet wurden, ergaben sich folgende Besonderheiten: Es wurde die doppelte Menge cDNA eingesetzt, dafür wurden im Mastermix pro Probe lediglich 6 μl dH₂O zugeführt. Desweiteren betrug die Temperatur in Schritt 3. nicht 55°C, sondern 58°C.

2.3.6.8 Auswertung der $PCR/2^{-\Delta\Delta C_T}$ – Methode

Um eine PCR auszuwerten, können zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze gewählt werden: zum einen kann eine absolute Quantifizierung der Werte vorgenommen werden,

zum anderen eine relative Berechnung. Letztere beschreibt die Veränderung der Genexpression eines Zielgens relativ im Vergleich zu einer Referenzgruppe. Zur Berechnung dieser Werte eignet sich die $2^{-\Delta\Delta CT}$ – Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Diese Formel zur Berechnung der relativen Genexpression lässt sich aus der Gleichung, die die exponentielle Amplifikation der PCR beschreibt, ableiten:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

X_n ist die Anzahl an Molekülen des Zielgens bei n Zyklen der Reaktion, X_0 die Ausgangszahl an Zielmolekülen, E_x die Effizienz der Reaktion und n die Anzahl der Zyklen. Der C_T -Wert beschreibt nun die Anzahl an Zyklen, bei der die amplifizierte Genexpression einen bestimmten Grenzwert erreicht. In der Gleichung lässt sich das wie folgt darstellen:

$$X_T = X_0 \times (1 + E)^{C_{T,x}} = K_x$$

X_T ist hier die Menge des Zielmoleküls beim Grenzwert, $C_{T,x}$ beschreibt den C_T -Wert für die Amplifikation des Zielgens und K_x ist eine Konstante. Für den internen Standard lässt sich die Gleichung ebenso darstellen:

$$H_T = H_0 \times (1 + E_H)^{C_{T,H}} = K_H$$

Hierbei steht H_T für die Menge des internen Standards beim Grenzwert, H_0 für die Ausgangszahl an Zielmolekülen. E_H beschreibt die Effizienz der Amplifikation, $C_{T,H}$ den C_T -Wert für die Amplifikation des Referenzgens und K_H ist die Konstante. Teilt man nun X_T durch H_T , entsteht folgender Ausdruck:

$$\frac{X_T}{H_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{H_0 \times (1 + E_H)^{C_{T,H}}} = \frac{K_x}{K_H} = K$$

Unter der Voraussetzung, dass die Effizienz für die Amplifikation des Zielgens und des internen Standards gleich sind gilt:

$$E_x = E_H = E,$$

$$\frac{X_0}{H_0} \times (1 + E)^{C_{T,x} - C_{T,H}} = K$$

oder:

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

X_N entspricht hierbei der normalisierten Menge an Ausgangsprobe (X_0/R_0) und ΔC_T ist die Differenz der C_T -Werte des Ziel- und des internen Standards ($C_{T,x} - C_{T,H}$). Nach Umstellung lautet die Formel:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Der letzte Schritt besteht darin X_N für jede Probe q des Zielgens durch X_N für jede Probe der Referenzgruppe (r) zu teilen:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,r}} = \frac{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,r}}} = (1+E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

Hier gilt: $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,r})$

Bei Optimierung der Versuchsabläufe ist die Effizienz der PCR nahezu gleich 1. Das heißt, dass sich die Menge des Zielgens normalisiert gegen einen internen Standard und mit einer Referenzgruppe verglichen, durch folgenden Term darstellen lässt:

$$\text{Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode ist, dass die Effizienz der PCR bei dem internen Standard und dem Zielgen annähernd gleich ist. Als interner Standard eignet sich dabei z.B. GAPDH (Livak und Schmittgen, 2001).

Die ΔC_T -Werte zeigen, wie oben aus der Formel zu entnehmen, den Vergleich des Zielgens mit dem internen Standard. Aus der Darstellung der ΔC_T -Werte lässt sich somit auch ein Vergleich zwischen den verschiedenen Altersstufen der Tiere ziehen. Hier gilt: Je höher der ΔC_T -Wert, desto geringer ist die Genexpression, umgekehrt, je höher die Genexpression, desto niedriger der ΔC_T -Wert.

Zum Vergleich des Zielgens mit der Referenzgruppe werden die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte dargestellt. Dieser Wert wird auch als *Fold change* bezeichnet.

2.4 Bestimmung der Proteinexpression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten mittels Western Blot

2.4.1 Homogenisierung linksventrikulären Myokards

Zur Extraktion des Gesamtproteins aus dem Myokard der Ratten musste dieses homogenisiert werden. Dies geschah, wie für die RT-PCR, mittels Mörser. Die Myokardstücke wurden zuvor auf ca. 50 mg eingewogen.

2.4.2 Gesamtproteingewinnung

Zur Extraktion des Gesamtproteins wurde das pulverisierte linksventrikuläre Myokard mit 150 µl Cell-Lysis-Puffer versetzt und sofort bei -80°C tiefgefroren.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration des Gesamtproteins in der Probe zu bestimmen, musste die Probe, nach der Proteinextraktion schockgefroren, zuerst lysieren. Dies geschah durch Rotation des Gefäßes in der Zentrifuge (1 h, 4°C). Um die Probe von Zelldebris zu befreien, wurde

das Gefäß zentrifugiert (14000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde danach in ein neues Eppendorfgefäß überführt, während das entstandene Pellet (aus Zellresten bestehend) verworfen wurde. Nun wurde die Proteinbestimmung nach Lowry mittels Biorad-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung der Konzentration erfolgte am Photometer.

2.4.4 Western Blot

2.4.4.1 Vorbereitung

Als Vorbereitung für den Western Blot wurden die Proteinproben auf die gewünschte Konzentration eingestellt, z.B. 20 µg, und mit 3XSDS-Probenpuffer (SDS: Natriumdodecylsulfat) versehen. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Einfüllen in die Geltaschen kurz abzentrifugiert.

2.4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden über ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurde zunächst ein Trenngel (7,5%ig) hergestellt und nach dessen 30-minütiger Polymerisierung ein Sammelgel (5%ig) darauf gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kunststoffkamm gesteckt, der nach Verfestigung des Gels die Probentaschen formte. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Innenkammer, sowie die Außenkammer, bis zum unteren Rand, mit 1XElektrophoresepuffer gefüllt. Nach Entfernung des Kammes wurden die Proben in die Taschen pipettiert, wobei in ein Slot ein Marker eingefüllt wurde und in ein weiteres Slot eine Positivkontrolle. Leergebliebene Taschen wurden mit 1XLoadingpuffer gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V in 90-120 min.

2.4.4.3 Immunoblot

Das Blotten, vom (-)- zum (+)-Pol erfolgte unter Kühlung von außen bei 120 V für ca. 60-70 min. Durch Anlegen der Spannung wurden die negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran übertragen. Anschließend wurde der Blot für 1 h mit 5%iger Magermilch bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nach Dekantieren der Magermilch-Lösung folgte die Zugabe des Primärantikörpers, verdünnt in 5%iger Magermilch. Dieser inkubierte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen à 10 min mit 1XTBS Tween zum Entfernen nichtgebundener Antikörperrückstände, wurde der Sekundärantikörper Anti-mouse IgG, HRP-linked AK (Cell Signaling, Danvers, MA (USA)), verdünnt 1:2000 mit 5%iger Magermilch, auf den Blot gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Anschließend wurde der Blot wieder drei Mal für 10 min mit 1XTBS Tween gewaschen.

Als Primärantikörper fanden Verwendung:

- MMP-2 Mouse Monoclonal Antibody, 1µg/ml (Dianova, Hamburg)
- MMP-9 Mouse Monoclonal Antibody, 2µg/ml (Dianova, Hamburg)
- TIMP-1 Mouse Monoclonal Antibody, 1µg/ml (Dianova, Hamburg)

Die Detektion der Proteine erfolgte durch ECL Plus (*Enhanced chemiluminescence*)-Technik (GE Healthcare, Amersham (UK)). Das Substrat, nach Herstellerangaben vorbereitet, erzeugte Acridinium-Ester, welche mit der am Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase reagierten. Diese Reaktion verursachte die Illuminenszenz. Der Blot wurde im Transilluminator ausgewertet und fotodokumentiert.

2.5 Statistische Auswertung

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 für Windows (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien (USA)) verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurde ein 2-Anova-Test (für zweifaktorielle Varianzanalyse) mit nachfolgendem Posthoc-Test (Least-significant-difference-Bonferroni) benutzt, da in dieser Arbeit verschiedene Faktoren (Stammunterschiede sowie Alter der Tiere) getestet wurden. Das least-significance-Level wurde mit $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Vitalparameter der Versuchstiere

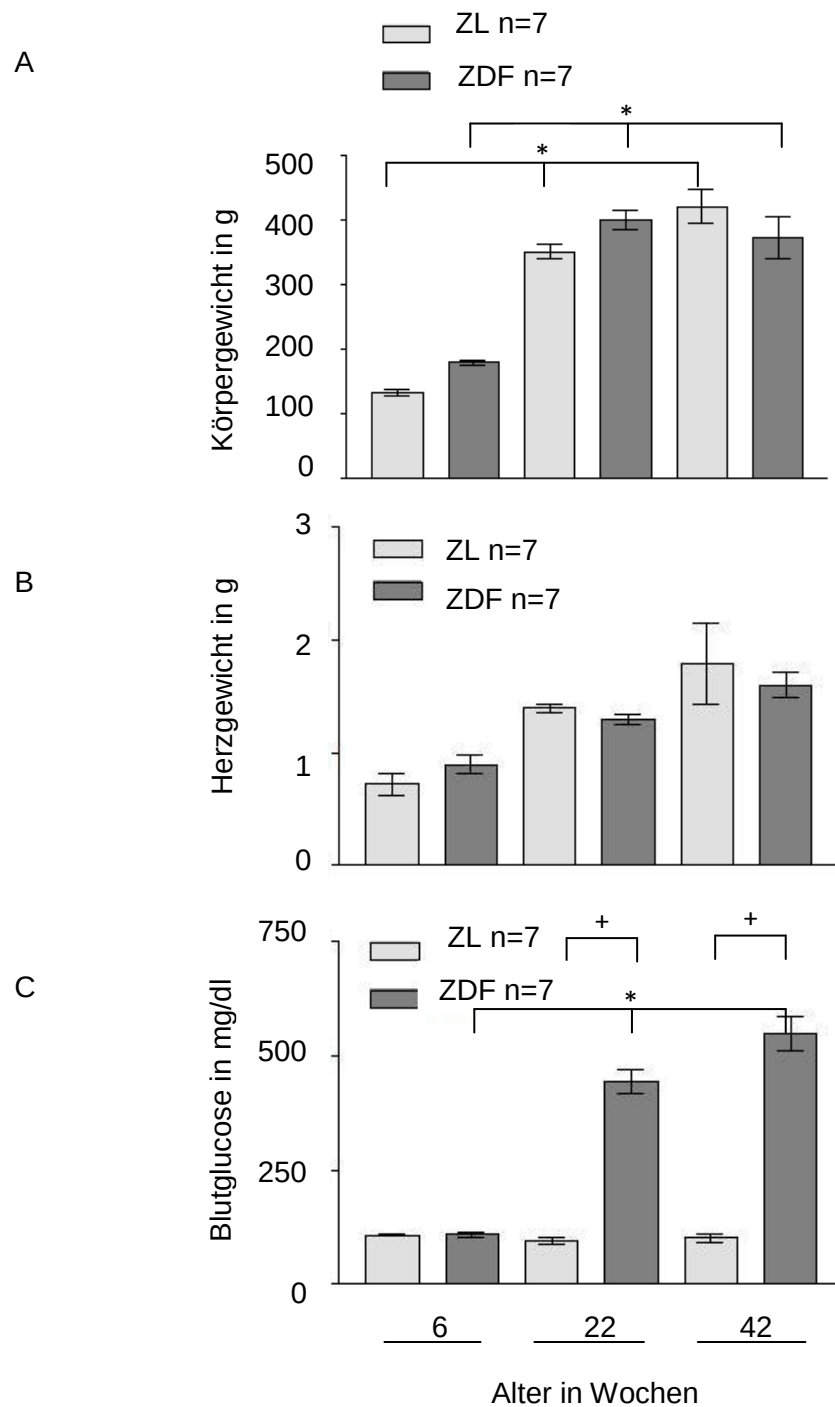


Abbildung 3.1 A-C: Darstellung der biometrischen Daten der ZL-/ZDF-Tiere verschiedener Altersstufen. A: Körpergewicht in g, * $p < 0,05$ vs. ZL; B: Herzgewicht in g; C: Blutglucose in mg/dl, * $p < 0,05$ vs. ZDF 6, + $p < 0,05$ vs. ZL 22 bzw. ZL 42. ZL=Zucker lean; ZDF=Zucker diabetic fat.

Um die biometrischen Daten der Versuchstiere zu erheben, wurden Körpergewicht, Herzgewicht und Blutglucosespiegel von ZL- und ZDF-Ratten in den drei verschiedenen Altersstufen (6, 22 und 42 Wochen) bestimmt.

Aus der Abbildung 3.1 A wird ersichtlich, wie sich das Körpergewicht bei den ZL- und den ZDF-Ratten mit ansteigendem Alter entwickelt. Bei den ZL-Ratten ist mit zunehmendem Alter ein stetiger Anstieg des Körpergewichts zu verzeichnen. Auch bei den ZDF-Ratten kommt es von der 6. auf die 22. Woche zu einer Zunahme des Körpergewichts, allerdings fällt das Körpergewicht bei den 42 Wochen alten Tieren im Vergleich zu den 22 Wochen alten Tieren wieder signifikant ab. Bei der Messung des Herzgewichts (Abbildung 3.1 B) zeigt sich bei beiden Tieren eine kontinuierliche Zunahme mit steigendem Alter. Ein signifikanter Unterschied zwischen ZL- und ZDF-Ratten ist hier nicht zu erkennen. Die Messung der Glucosekonzentration im Blut (Abbildung 3.1 C) zeigt bei den ZL-Tieren erwartungsgemäß einen nahezu konstanten euglykämischen Blutzuckerspiegel in allen drei Altersstufen. Bei den ZDF-Tieren kommt es von der 6. auf die 22. Woche zu einer massiven Zunahme des Blutglucosespiegels, die sich bis in die 42. Woche fortsetzt.

3.2 Bestandteile des linksventrikulären Myokards

3.2.1 Morphologie der extrazellulären Matrix

Um Kollagenanteile in der extrazellulären Matrix im Myokard der ZL- und ZDF-Ratten darzustellen, wurden Paraffinschnitte des linksventrikulären Myokards mit Sirius Red gefärbt. Dadurch konnten die Unterschiede im Fibrosierungsgrad des linksventrikulären Myokards zwischen ZL- und ZDF-Ratten deutlich gemacht werden.

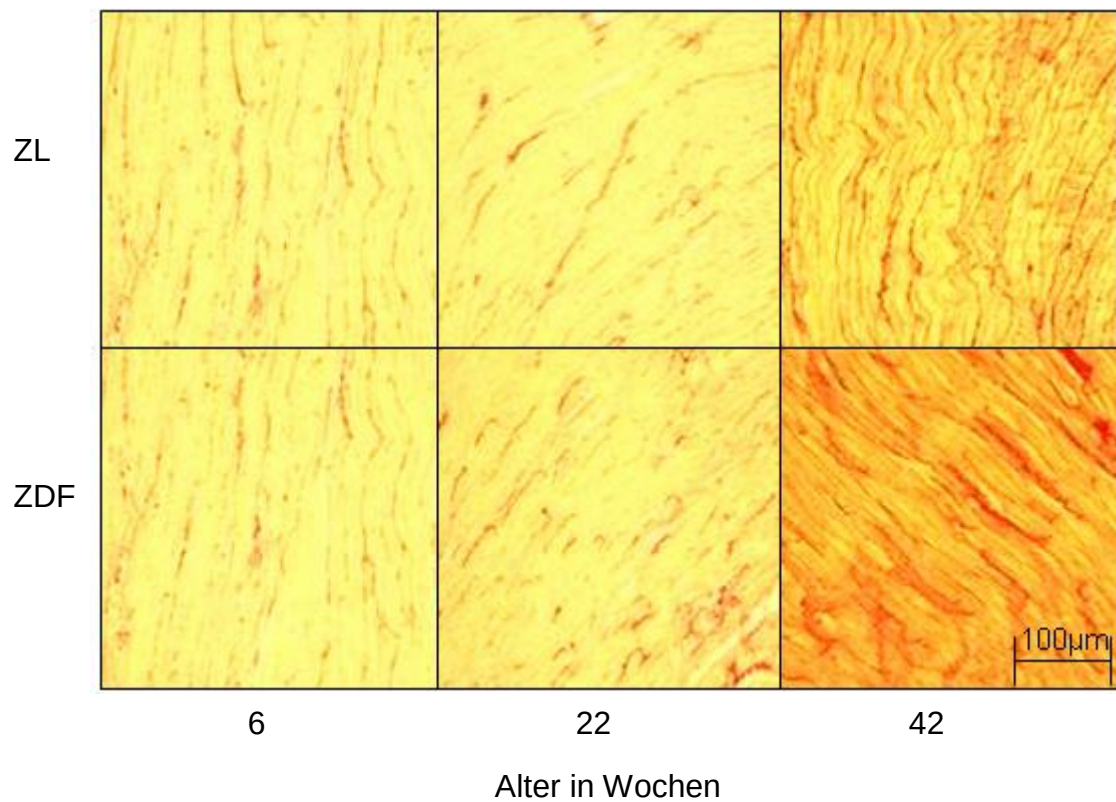


Abbildung 3.2: Sirius Red Färbung von linksventrikulärem Myokard von ZL- und ZDF-Ratten nach 6, 22 und 42 Wochen. Fibrotische Areale färben sich rot an. Man beachte die deutlich Zunahme der fibrotischen Myokardanteile bei den 42 Wochen alten, diabetischen Tieren.

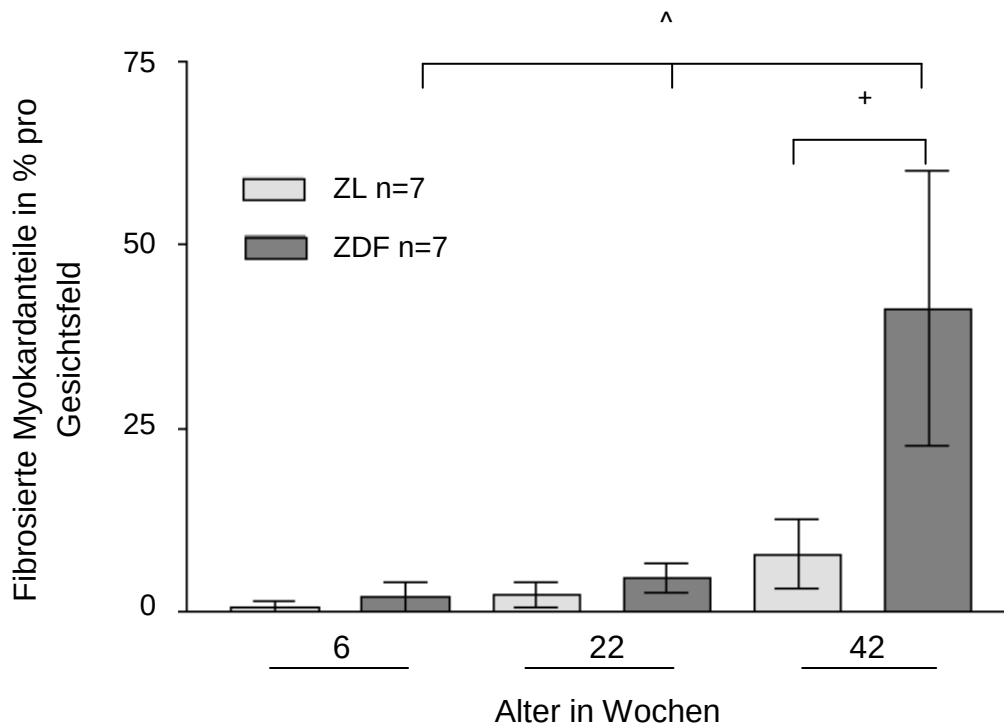


Abbildung 3.3: Fibrosierte Myokardanteile in % pro Gesichtsfeld in Paraffinschnitten aus linksventrikulärem Myokard von Kontrolltieren (ZL) und diabetischen Tieren (ZDF) verschiedener Altersstufen. Die Schnitte wurden nach Sirius Red-Färbung unter dem Mikroskop betrachtet und die rotgefärbte Fläche wurde ausgemessen. Es wurden pro Tier 10 Gesichtsfelder mikroskopisch vermessen. + $p < 0,05$ vs. ZL 42; ^ $p < 0,05$ vs. ZDF6, bzw. ZDF22; ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

Nicht-diabetische Kontrolltiere zeigen mit steigendem Alter eine geringe, nicht-signifikante Zunahme des linksventrikulären Fibrosegrades. Demgegenüber ist die Fibrosierung des Myokards bei diabetischen Tieren deutlich stärker ausgeprägt und im Alter von 42 Wochen signifikant höher als in den jüngeren Altersstufen. In der 42. Lebenswoche der Tiere ist die Fibrosierung bei den diabetischen Tieren signifikant höher als bei den nicht-diabetischen Kontrolltieren.

3.2.2 Zellen des linksventrikulären Myokards

3.2.2.1 Zelltypen

Um die verschiedenen, im Myokard enthaltenen Zellen zu identifizieren, wurden drei verschiedene Zelltypen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten mittels Immunhistochemie an Kryoschnitten aus dem linksventrikulären Myokard von ZL- und ZDF-Ratten dargestellt.

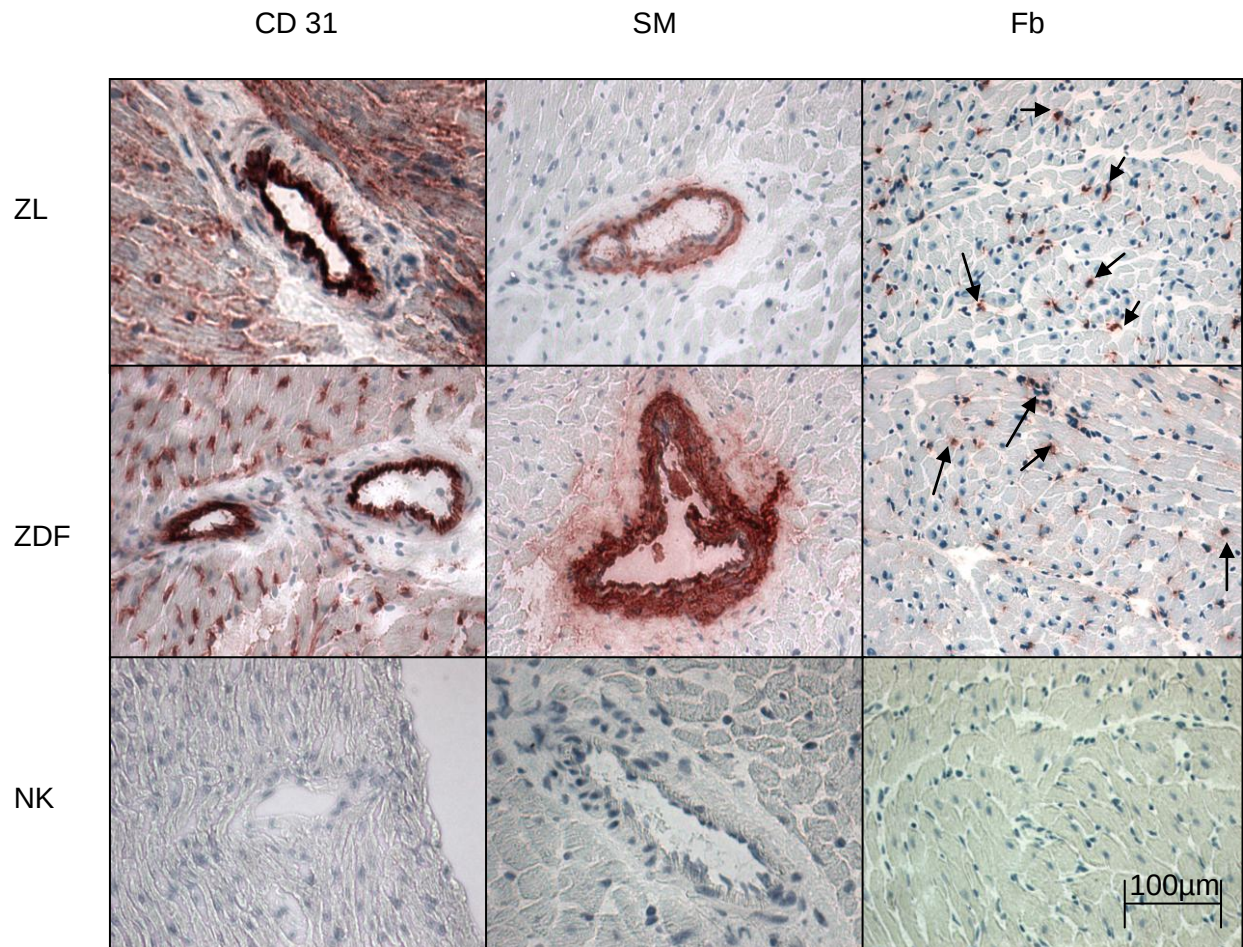


Abbildung 3.4: Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten aus linksventrikulärem Myokard von ZL- und ZDF-Ratten. Endothelzellfärbung (CD 31, 1:100), Färbung der glatten Muskelzellen (SM-Ab 1, 1:300) und Fibroblastenfärbung (Prolyl 4-Hydroxylase, 1:100), (positive Zellen sind mit einem Pfeil markiert) mit der jeweiligen Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper). Alle Bilder 20x vergrößert.

Wie in der Abbildung 3.4 zu sehen ist, konnten alle drei verschiedenen Zelltypen und ihre charakteristische Lokalisation im Gewebe, mittels der immunhistochemischen Färbung, an den Gewebeschnitten dargestellt werden.

3.2.2.2 Zellhäufigkeiten

Um die Häufigkeit der Fibroblasten in den verschiedenen Altersstufen der Versuchstiere zu bestimmen, wurden in den Fibroblastenfärbungen die Anzahl der Fibroblasten pro Gesichtsfeld ermittelt. Dazu wurden die Färbungen der 6 Wochen und der 42 Wochen alten Tiere verwendet, wobei jeweils 10 Gesichtsfelder von je 3 Tieren gezählt wurden.

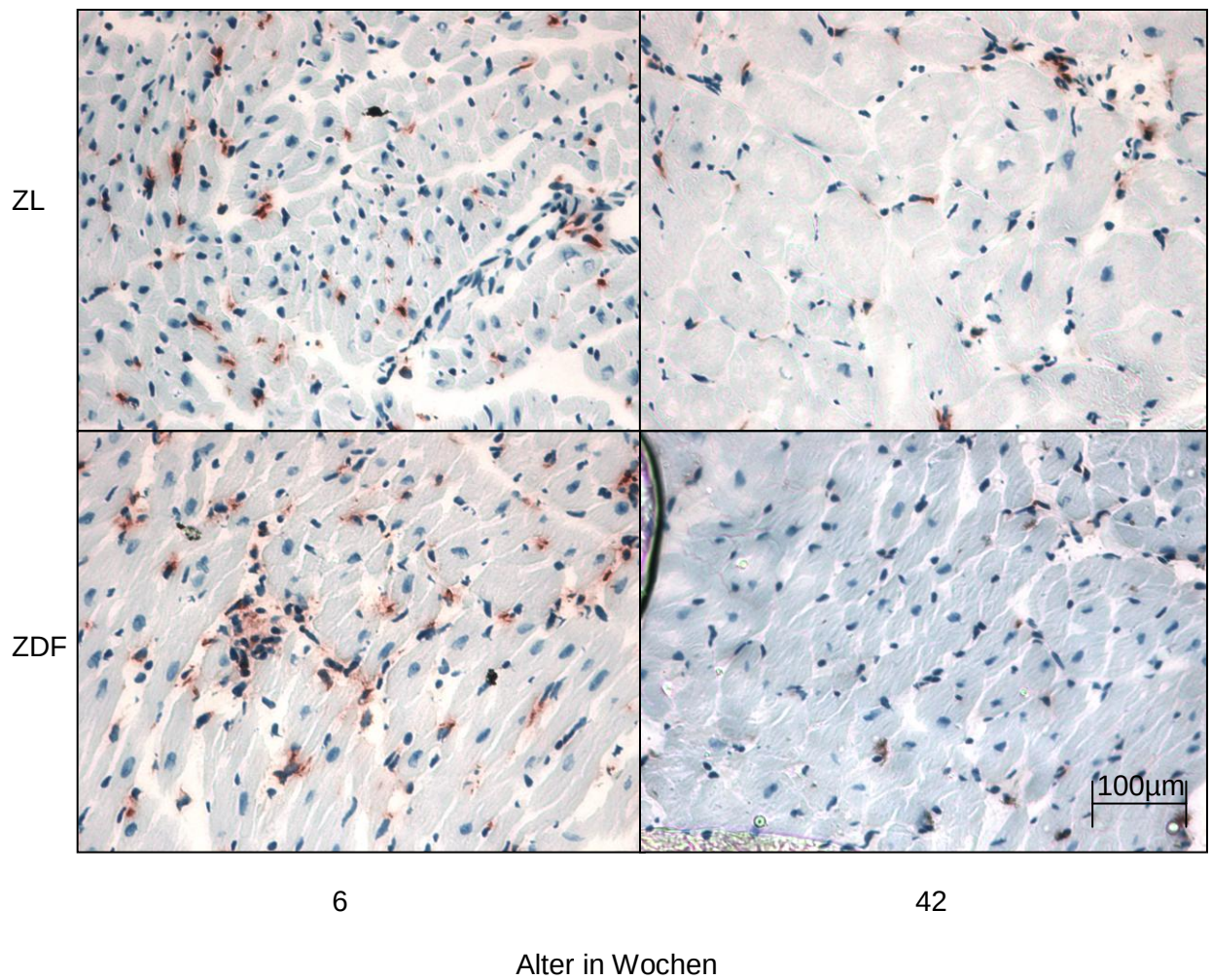


Abbildung 3.5: Mikroskopische Präparate aus der freien linksventrikulären Wand. Immunhistochemische Färbung gegen Fibroblasten (Prolyl 4-Hydroxylase, 1:100) an Kryoschnitten von ZL- und ZDF-Ratten. Alle Bilder 20x vergrößert; ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

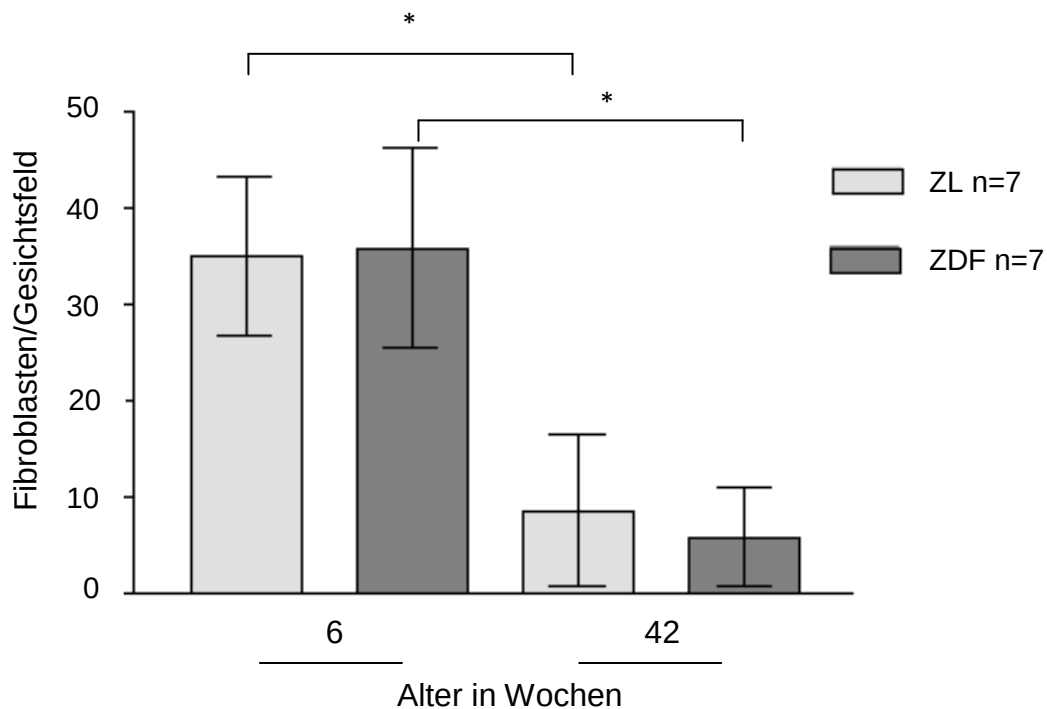


Abbildung 3.6: Fibroblasten pro Gesichtsfeld in Kryoschnitten von linksventrikulärem Myokard aus Kontrolltieren (ZL) und diabetischen Tieren (ZDF). Die Fibroblasten wurden mittels immunhistochemischer Färbung (Prolyl 4-Hydroxylase) sichtbar gemacht und unter dem Mikroskop jeweils 10 Gesichtsfelder ausgezählt. * $p < 0,05$ vs. 6 Wochen alte Tiere, ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

Zwischen den ZL- und ZDF-Tieren ergab sich in den jeweiligen Altersstufen kein signifikanter Unterschied, wohl aber nahm die Anzahl der Fibroblasten bei beiden Gruppen im Alter deutlich ab. Sowohl bei den nicht-diabetischen Tieren, als auch bei den diabetischen Tieren waren in höherem Alter signifikant ($p < 0,05$) weniger Fibroblasten im linksventrikulären Myokard vorhanden.

3.2.3 Fibroblasten und Fibrosierung

Um die Lokalisierung der Fibroblasten mit der Fibrose in Einklang zu bringen, wurden von den Kryoschnitten der ZL- und ZDF-Tiere sowohl Fibroblasten immunhistochemisch angefärbt, als auch die Fibrose in den Folgeschnitten mit der Sirius Red-Färbung dargestellt.

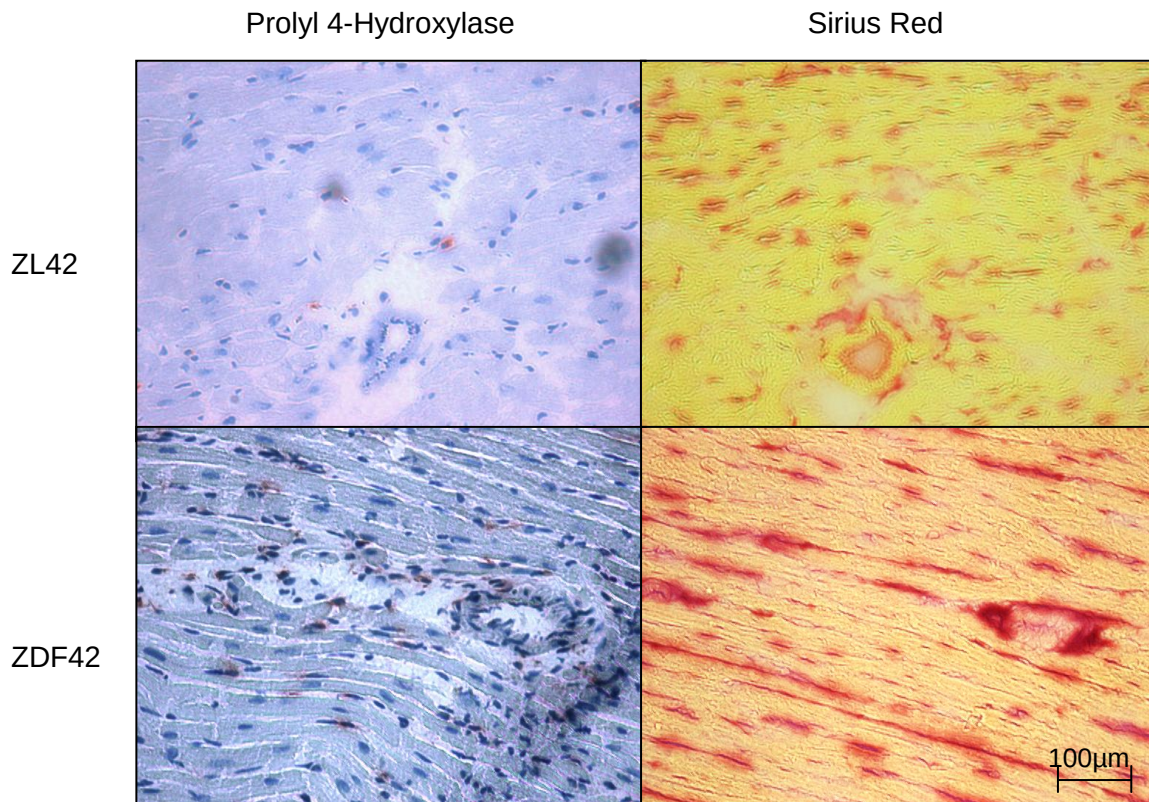


Abbildung 3.7: Links immunhistochemische Färbung der Fibroblasten (Prolyl 4-Hydroxylase, 1:100) an Kryoschnitten von ZL-/ZDF-Tieren; rechts Darstellung der Fibrose mit Sirius Red-Färbung an Kryoschnitten von ZL-/ZDF-Tieren. ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

Die Fibroblasten wurden immunhistochemisch angefärbt, bei den nicht-diabetischen Tieren lassen sich nur wenige Fibroblasten erkennen. Korrespondierend dazu wurde eine Sirius Red-Färbung durchgeführt. Es sind einige rotgefärbte Areale zu erkennen. Es liegt ein geringer Fibrosierungsgrad vor. Die immunhistochemische Färbung von Fibroblasten der diabetischen Tiere zeigt, dass sich einige Fibroblasten perivaskulär und interzellulär darstellen lassen. Auf dem korrespondierenden Bild der Sirius Red-Färbung kann ein stärkerer Fibrosierungsgrad als bei nicht-diabetischen Tieren detektiert werden, es lässt sich jedoch kein eindeutiger Zusammenhang in der Lokalisierung von Fibroblasten und Fibrosierung feststellen.

3.3 Western Blot zur Bestimmung von Proteinkonzentration von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 aus linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten

Zur Untersuchung der Expression der Proteine MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im Western Blot wurden Lysate aus Gesamtprotein aus linksventrikulärem Myokard von diabetischen Tieren (ZDF-Ratten) und nicht-diabetischen Kontrolltieren (ZL-Ratten) gewonnen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 nachgewiesen. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers und des Substrates wurden die so sichtbar gemachten Banden auf dem Blot im Transilluminator fotodokumentiert. Auf diesen Fotos wurde die Schwärzung der Banden gemessen und semiquantitativ mittels relativer Einheiten miteinander verglichen. Je intensiver die Bandenschwärzung ausgefallen ist, desto mehr Antigen wurde an dieser Stelle detektiert, das heißt die Menge an gebundenem Sekundär- und damit auch Primärantikörper war hier größer. Als Normalisierung wurde bei jedem Western Blot gleichzeitig die Intensität der Detektion von α -Tubulin gemessen. α -Tubulin ist ein Protein, das, unabhängig vom Stoffwechselgeschehen, stetig im Gewebe vorhanden ist. Gleiche Mengen α -Tubulin bedeuten somit gleiche Mengen eingesetzten Gesamtproteins

3.3.1 Proteinexpression für MMP-2

Die in Abbildung 3.8 gezeigten Ergebnisse belegen, dass es mit zunehmendem Alter der Versuchstiere zu einem signifikanten Anstieg des myokardialen Gehalts an MMP-2 kommt. Interessanterweise ist die absolute Menge an MMP-2-Protein im linksventrikulären Myokard von nicht-diabetischen Ratten höher, als diejenige diabetischer ZDF-Ratten. Der relative Anstieg über die Zeit ist jedoch vergleichbar.

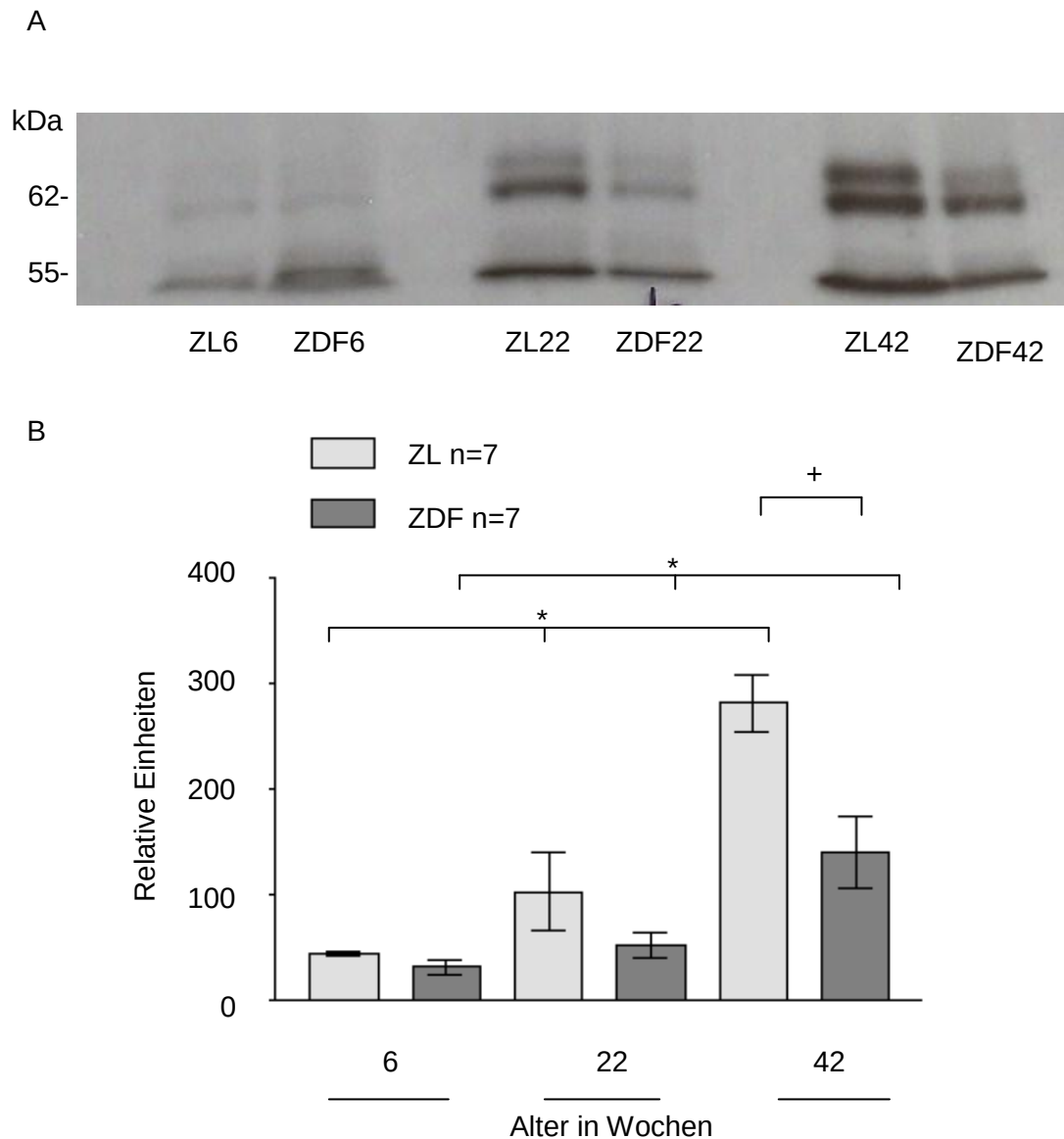


Abbildung 3.8: Proteinexpression von MMP-2 in linksventrikulärem Myokard von ZL- und ZDF-Ratten im Alter von 6, 22 und 42 Wochen. (A) Exemplarischer Western Blot von MMP-2 (62 kDa) und α -Tubulin (55kDa). Zahlen am linken Bildrand geben die Größe der Proteine in Kilodalton (kDa) an. (B) Densitometrische semiquantitative Bestimmung in relativen Einheiten. * $p < 0,05$ vs. ZL6/ZL22 bzw. ZDF6/ZDF22; + $p < 0,05$ vs. ZDF42; ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

3.3.2 Proteinexpression für MMP-9

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist, kommt es mit zunehmendem Alter der Versuchstiere zu einem signifikanten Anstieg der myokardialen Proteinexpression von MMP-9. Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier die absolute Menge an MMP-9-Protein im linksventrikulären Myokard von nicht-diabetischen ZL-Tieren höher ist, als bei den diabetischen Tieren. Der relative Anstieg über die Zeit ist jedoch vergleichbar.

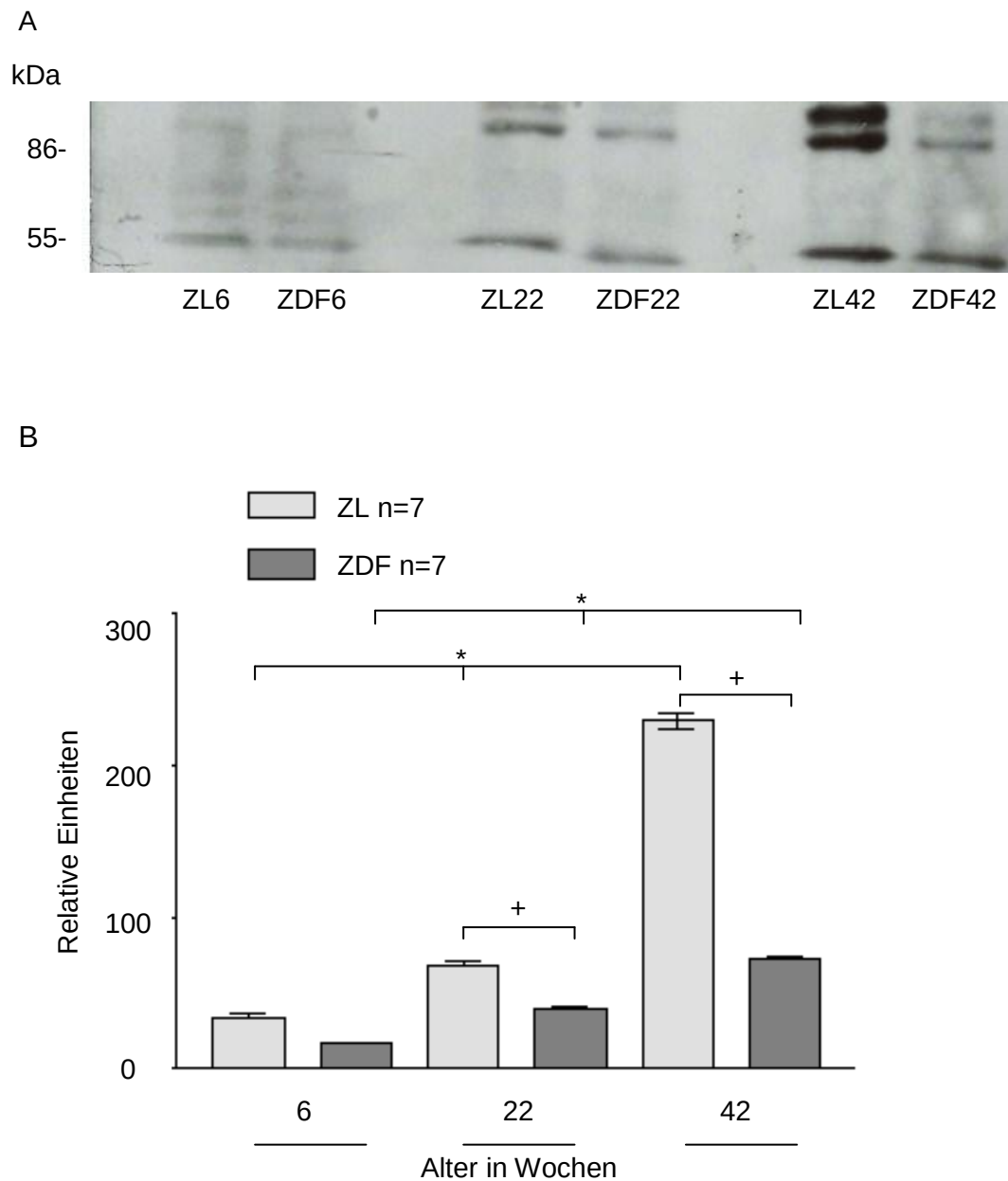


Abbildung 3.9: Proteinexpression von MMP-9 in linksventrikulärem Myokard von ZL- und ZDF-Ratten im Alter von 6, 22 und 42 Wochen. (A) Exemplarischer Western Blot von MMP-9 (86kDa) und α -Tubulin (55kDa). Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des Proteins in Kilodalton (kDa) an. (B) Densitometrische semiquantitative Bestimmung in relativen Einheiten. * $p < 0,05$ vs. ZL 6, ZL 22 bzw. ZDF6, ZDF22; + $p < 0,05$ vs. ZDF22 bzw. ZDF 42. ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

3.3.3 Proteinexpression für TIMP-1

Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.10 belegen, kommt es mit zunehmendem Alter der Versuchstiere zu einem Abfall des linksventrikulären Gehalts an TIMP-1. Die absolute Menge an TIMP-1-Protein im Myokard unterscheidet sich bei den nicht-diabetischen und diabetischen Ratten nicht signifikant.

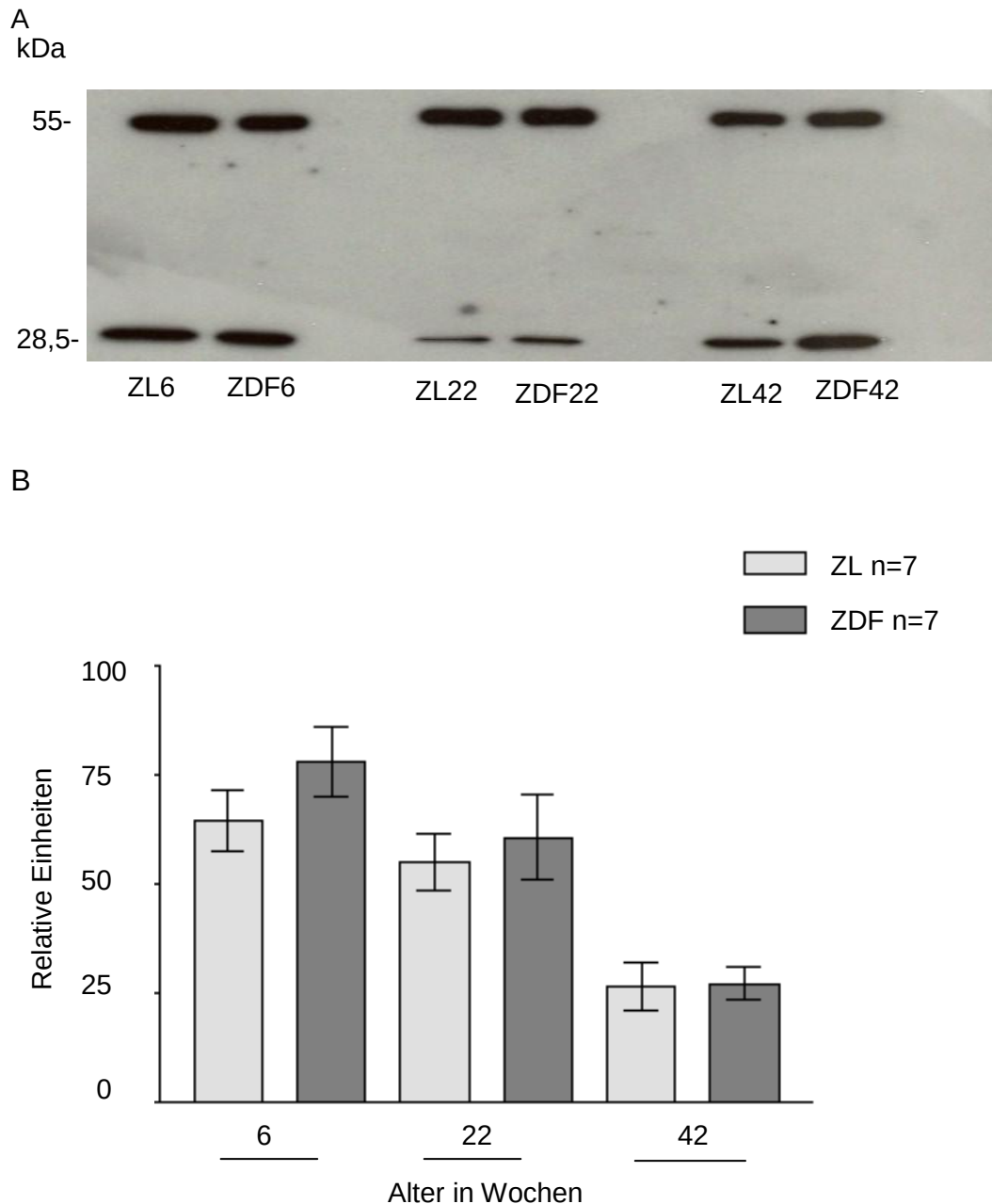


Abbildung 3.10: Proteinexpression von TIMP-1 in linksventrikulärem Myokard von ZL- und ZDF-Ratten im Alter von 6, 22 und 42 Wochen. (A) Exemplarischer Western Blot von TIMP-1 (28,5kDa) und α -Tubulin (55kDa). Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des Proteins in Kilodalton (kDa) an. Densitometrische Ausmessung in relativen Einheiten. ZL = Zucker lean, ZDF = Zucker diabetic fat.

3.4 mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in-vivo in linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten

3.4.1 Vorversuche zur RT-PCR

3.4.1.1 Reverse Transkription

Zur Überprüfung der reversen Transkription wurden die cDNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

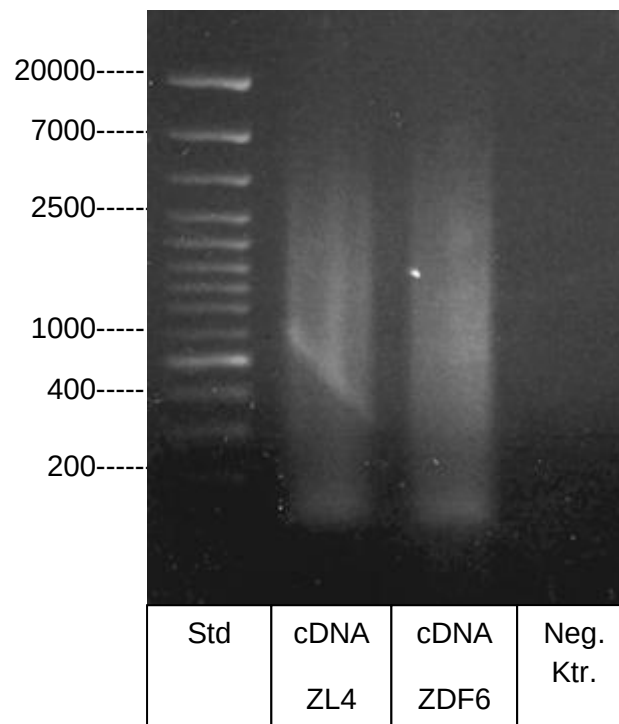


Abbildung 3.11: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1%) zur Darstellung von cDNA. Gesamt-RNA von ZL- und ZDF-Tieren wurde revers transkribiert, als Negativkontrolle wurde H₂O mitgeführt. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig mitgeführten DNA-Standards in Basenpaaren an.

Auf dem Foto des Agarosegels ist keine eindeutige Bande zu erkennen. Dies entspricht den erwarteten Ergebnissen, da bis jetzt noch kein spezifischer DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Somit zeigt sich keine Bande einer bestimmten Größe, vielmehr ist eine gleichmäßige Verteilung des gesamten Produktes über die ganze Spur zu erkennen. Es ist also davon auszugehen, dass die Produktion der cDNA erfolgreich verlaufen ist.

3.4.1.2 Primerkonzentration

Die optimale Konzentration der eingesetzten Random Primer wurde ermittelt, indem die Primer in verschiedenen Verdünnungsstufen in Vorversuchen eingesetzt wurden.

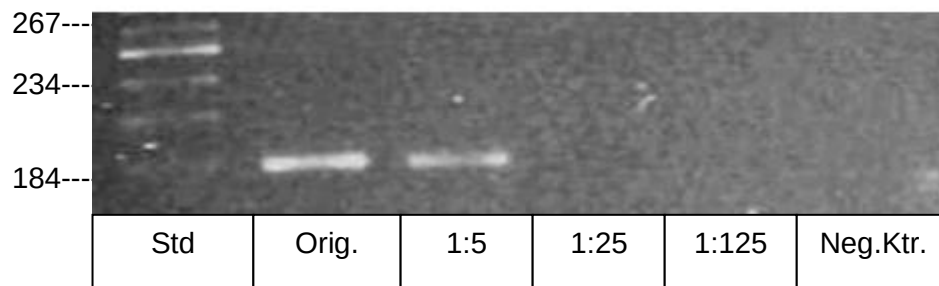


Abbildung 3.12: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1%) zur Darstellung von PCR-Produkten mit verschiedenen Konzentrationen an eingesetztem Primer von TIMP-1. Als Negativkontrolle wurde H₂O mitgeführt. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig mitgeführten DNA-Standards in Basenpaaren an. Orig.(10µM), 1:5, 1:25, 1:125=Primerverdünnungen.

Wie auf der Abbildung zu sehen ist, wurden deutlich sichtbare Banden in der Originalverdünnung (10µM) der Primer von TIMP-1 erzielt, genauso für MMP-2 und MMP-9 (nicht gezeigt). Somit wurden für die folgenden PCR-Läufe die Primer in ihrer Originalkonzentration des Herstellers eingesetzt.

3.4.1.3 Hybridisierungstemperatur von MMP-9

In Vorversuchen wurde die Hybridisierungstemperatur untersucht. Für MMP-2 und TIMP-1 zeigten sich, bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur von 55°Celsius, deutlich abgrenzbare Banden auf dem 1%igen Agarosegel. Für MMP-9 wurde durch einen PCR-Lauf mit einem Temperaturgradienten eine optimale Hybridisierungstemperatur von 58°Celsius ermittelt.

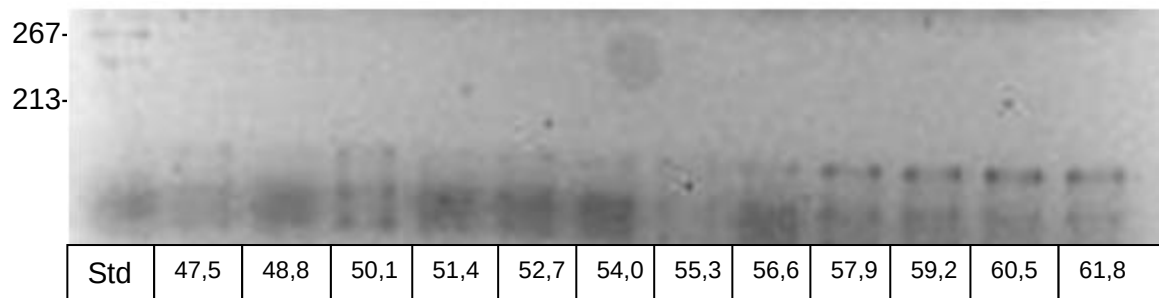


Abbildung 3.13: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1%) zur elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten. Nachweis von MMP-9-Banden bei verschiedenen Temperaturen für den Hybridisierungsschritt während der PCR. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig aufgetragenen cDNA-Standards in Basenpaaren an, die Zahlen am Unterrand des Bildes geben die Hybridisierungstemperatur in Grad Celsius an.

3.4.1.4 Templatekonzentration von MMP-9

Um den PCR-Lauf mit MMP-9 zu optimieren, wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen an Template eingesetzt und die Ergebnisse auf einem 1%igen Agarosegel visualisiert. Abbildung 3.15 zeigt, dass die hergestellte Sequenz durch Einsatz der doppelten Menge an Template (1µl) deutlich sichtbar wurde.

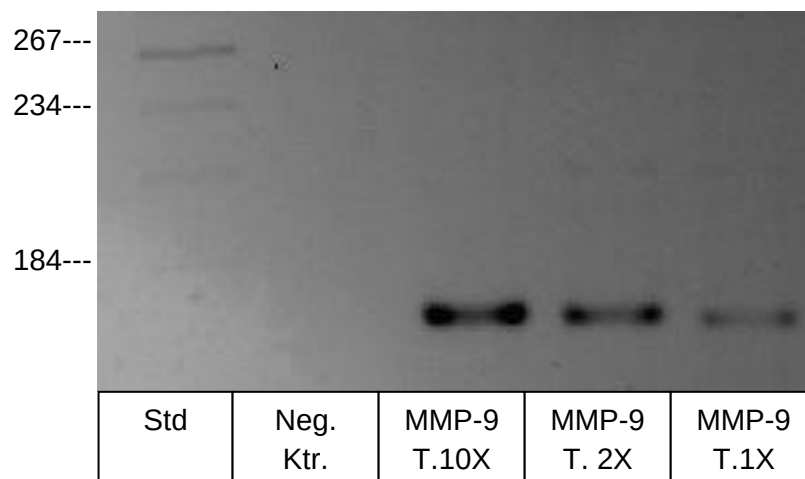


Abbildung 3.14: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1%) zur elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten. Nachweis von MMP-9-Banden bei verschiedenen, in die PCR eingesetzter Template (T.)-Mengen (1X = normale Menge, 2X = doppelte Menge, 10X = 10fache Menge). Als Negativ-Kontrolle wurde H₂O mitgeführt. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig mitgeführten cDNA-Standards in Basenpaaren an.

3.4.1.5 Restriktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob die hergestellten DNA-Produkte wirklich den gewünschten Sequenzen entsprechen, wurden die, mit den spezifischen Primern in der PCR entstandenen, DNA-Amplifikate durch Restriktionsendonukleasen verdaut. Dabei müssten bei korrekter Amplifikation durch den Verdau zwei Fragmente exakt definierter Länge entstehen, die addiert die Länge der gewünschten Gensequenz ergeben. Für MMP-2 (Länge: 150bp) wurde der Verdau mit Bcc I durchgeführt, was zu zwei Fragmenten mit den Längen 120bp und 30bp führen sollte. Für MMP-9 (Länge: 151bp) wurde das Restriktionsenzym Bam H I verwendet, was das Amplifikat in Sequenzen der Länge 109bp und 42bp schneiden sollte. TIMP-1 (Länge: 196bp) wurde mit der Endonuklease Eco 31 I verdaut, die zwei Fragmente der Längen 130bp und 66bp herstellen sollte.

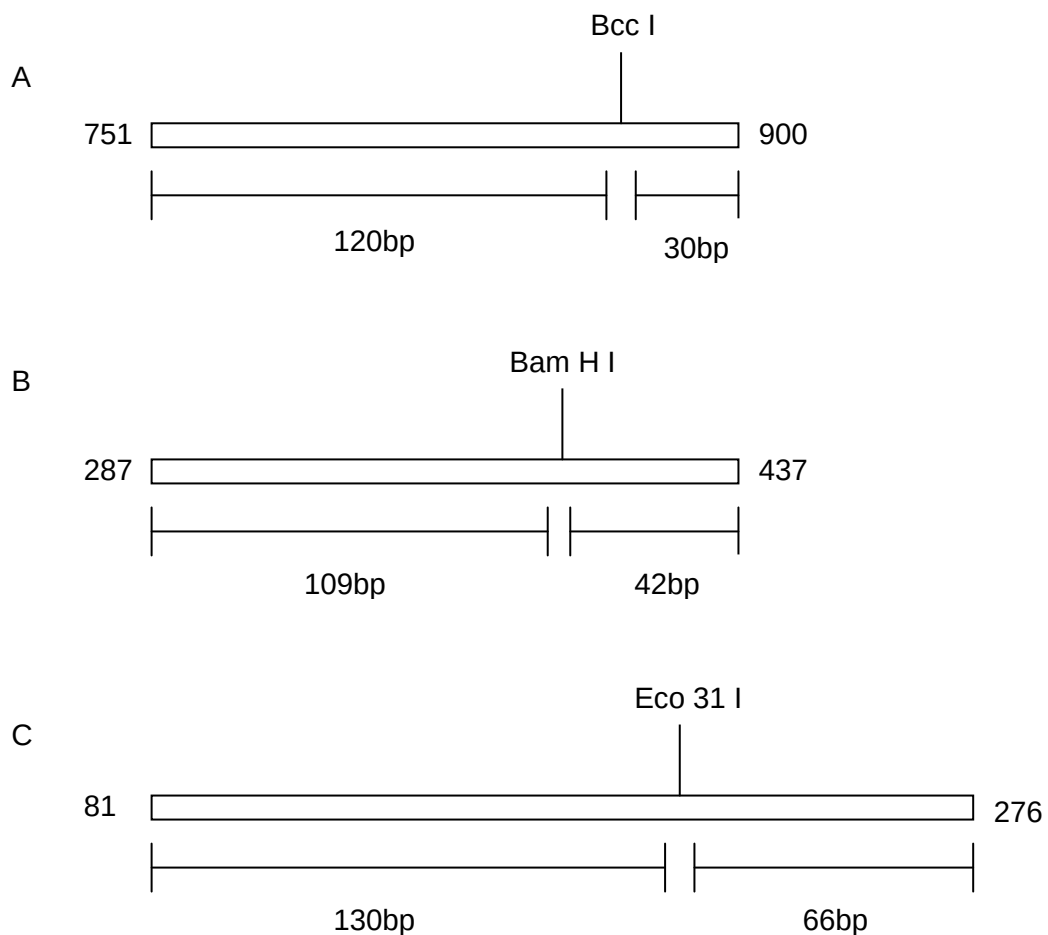


Abbildung 3.15: Darstellung der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme und der dadurch entstehenden Fragmentlängen beim Restriktionsverdau der DNA-Produkte. A: Restriktionsverdau von MMP-2 mit Bcc I; B: Restriktionsverdau von MMP-9 mit Bam H I; C: Restriktionsverdau von TIMP-1 mit Eco 31 I.

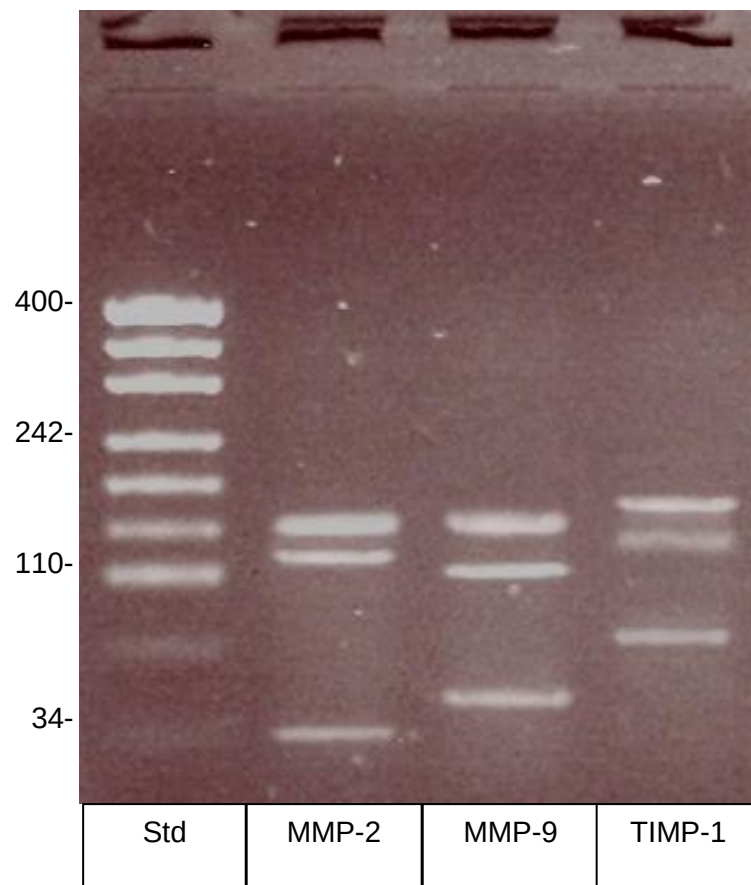


Abbildung 3.16: Restriktionsanalyse amplifizierter PCR-Fragmente von MMP-2, MMP-9, TIMP-1. Die verdauten Proben wurden auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Erwartete Fragmentgröße in bp: MMP-2 120 und 30bp; MMP-9 109 und 42bp; TIMP-1 130 und 66bp. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Größe des gleichzeitig aufgetragenen cDNA-Standards in Basenpaaren an.

3.4.2 RT-PCR aus linksventrikulärem Myokard von ZL-/ZDF-Ratten

Zur Beantwortung der Fragestellung inwiefern der Diabetes mellitus Typ 2 einen Einfluss auf die Expression der Matrixmetalloproteinasen und ihrer natürlichen Inhibitoren im Herzen hat, wurde aus dem linksventrikulären Myokard der diabetischen und der nicht-diabetischen Kontrolltiere RNA isoliert und in eine RT-PCR eingesetzt. Zur Darstellung der Ergebnisse werden die $\Delta\text{-C}_T$ -Werte gezeigt, um einen Vergleich in den verschiedenen Altersstufen zu ermöglichen (s. Material und Methoden 2.5.6.8).

3.4.2.1 MMP-2

Bei der Betrachtung der $\Delta\text{-C}_T$ -Werte der PCR für MMP-2 fällt auf, dass die $\Delta\text{-C}_T$ -Werte bei beiden Tiergruppen mit höherem Alter ansteigen. Die 42 Wochen alten Tiere zeigen sowohl bei den experimentellen Tieren, als auch bei den Kontrolltieren, signifikant höhere

$\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werte als die jeweiligen jüngeren Tiere ($p < 0,05$). Das bedeutet, dass MMP-2 mit ansteigendem Alter nicht mehr so stark exprimiert wird wie bei den jüngeren Tieren.

Bei den 6 Wochen alten Tieren haben die ZDF-Tiere im Vergleich zu den ZL-Tieren größere $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werte, sie exprimieren also weniger MMP-2. In der Gruppe der 22 Wochen alten Tiere wird bei den ZDF-Tieren mehr MMP-2 exprimiert, der $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Wert ist geringer. Die 42 Wochen alten ZDF-Tiere zeigen wiederum höhere $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werte als die ZL-Tiere gleichen Alters, was bedeutet, dass sie weniger MMP-2 exprimieren. Signifikante Unterschiede konnten in der post-hoc-Analyse nicht errechnet werden.

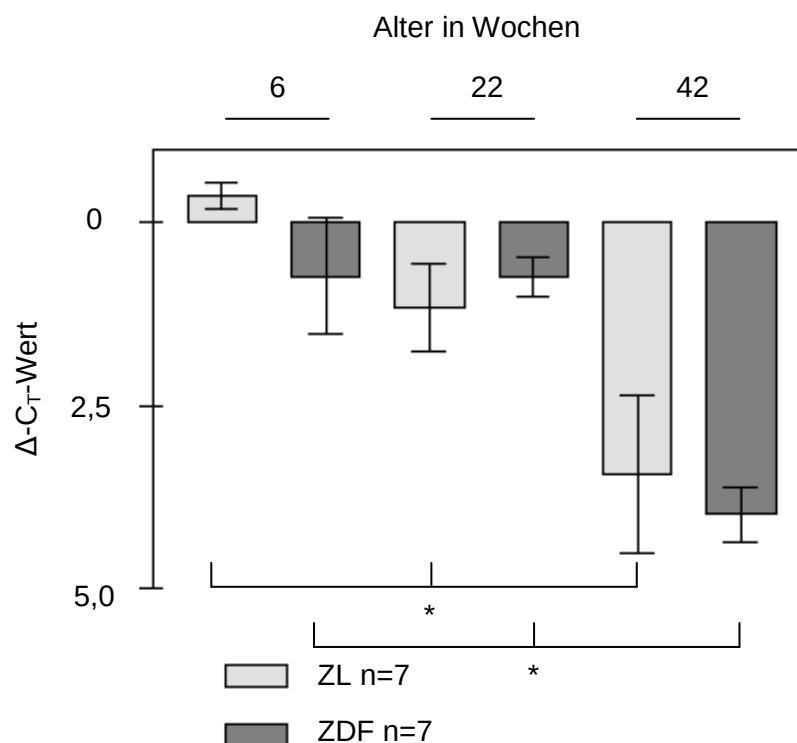


Abbildung 3.17: $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werte MMP-2 in linksventrikulärem Gewebe von Kontrolltieren (ZL) und diabetischen Tieren (ZDF) in verschiedenen Altersstufen. Gesamt-mRNA wurde revers transkribiert und in eine PCR mit spezifischen Primern für MMP-2 eingesetzt. Die C_T -Werte wurden ermittelt und gegen GAPDH normalisiert. * $p < 0,05$ vs. ZL6 und ZL22 bzw. ZDF6 und ZDF22. ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

3.4.2.2 MMP-9

Bei den $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werten von MMP-9 sind, mit ansteigendem Alter der Tiere, niedrigere $\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Werte gemessen worden. Es zeigt sich bei beiden Tiergruppen in der Altersstufe der 6 Wochen alten Tiere eine höhere Anzahl von Zyklen als bei beiden anderen Altersstufen, was auf eine geringere Menge an Genprodukt für MMP-9 in der Probe schließen lässt.

Bei den 6 Wochen alten Tieren zeigen die ZL-Tiere höhere $\Delta\text{-C}_T$ -Werte, exprimieren also weniger MMP-9. In der Altersgruppe der 22 Wochen alten Tiere verhält es sich umgekehrt: Die diabetischen Tiere zeigen höhere $\Delta\text{-C}_T$ -Werte, exprimieren also weniger MMP-9. Ähnlich zeigt sich das Verhältnis bei den 42 Wochen alten Tieren. Signifikante Unterschiede lassen sich statistisch nicht feststellen.

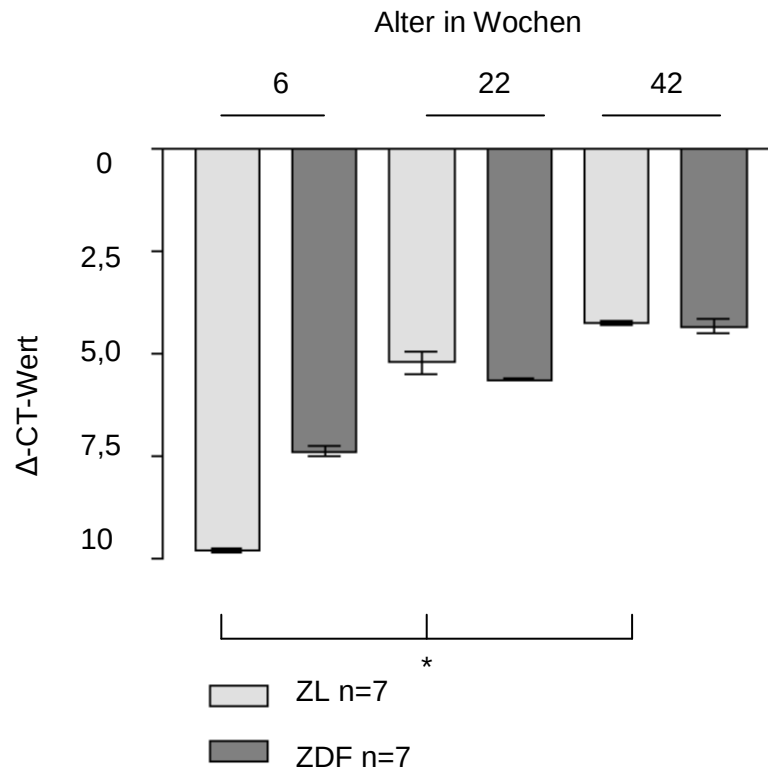


Abbildung 3.18: $\Delta\text{-C}_T$ -Werte MMP-9 in linksventrikulärem Gewebe von Kontrolltieren (ZL) und diabetischen Tieren (ZDF) in verschiedenen Altersstufen. Gesamt-mRNA wurde revers transkribiert und in eine PCR mit spezifischen Primern für MMP-9 eingesetzt. Die C_T -Werte wurden ermittelt und gegen GAPDH normalisiert. * p < 0,05 vs. ZL 22 und ZL 42. ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

3.4.2.3 TIMP-1

Bei den $\Delta\text{-C}_T$ -Werten für TIMP-1 lässt sich ebenfalls mit höherem Alter der Tiere ein leichter Anstieg der $\Delta\text{-C}_T$ -Werte und somit eine Abnahme des Genexpression verzeichnen. Die 42 Wochen alten Tiere zeigen gegenüber den 6 und 22 Wochen alten Tieren einen höheren Threshold-Cycle-Wert.

In allen drei Altersgruppen liegen die $\Delta\text{-C}_T$ -Werte der ZDF-Tiere über denen der ZL-Tiere, was bedeutet, dass die Expression von TIMP-1 bei den diabetischen Tieren geringer ist. Der Trend, dass die diabetischen Tiere weniger TIMP-1 exprimieren als die nicht-

diabetischen Kontrolltiere ist somit erkennbar, in der post-hoc-Analyse zeigt sich keine statistische Signifikanz .

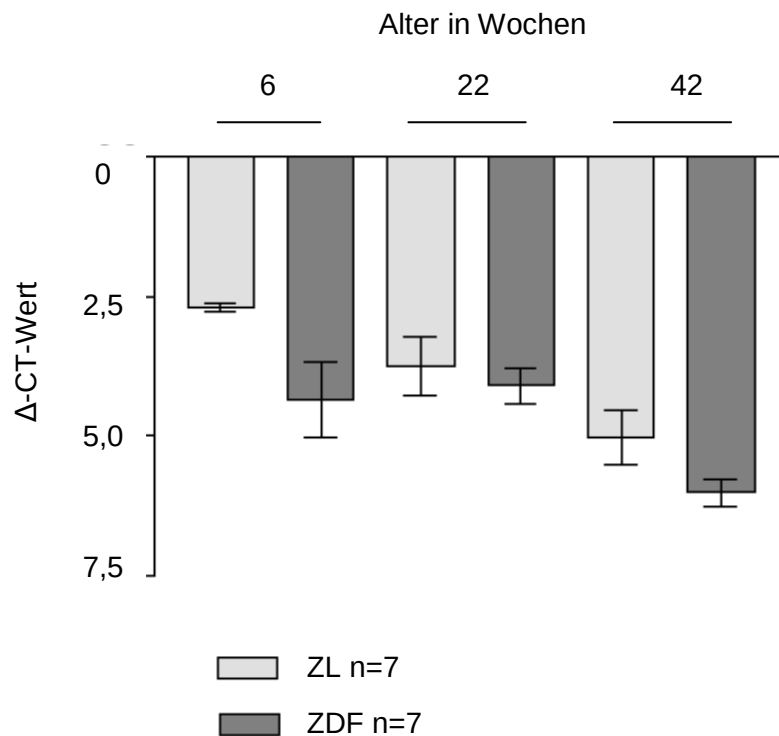


Abbildung 3.19: Δ -C_T-Werte TIMP-1 in linksventrikulärem Gewebe von Kontrolltieren (ZL) und diabetischen Tieren (ZDF) in verschiedenen Altersstufen. Gesamt-mRNA wurde revers transkribiert und in eine PCR mit spezifischen Primern für TIMP-1 eingesetzt. Die C_T-Werte wurden ermittelt und gegen GAPDH normalisiert. ZL=Zucker lean, ZDF=Zucker diabetic fat.

4. Diskussion

Matrixmetalloproteinasen spielen im Rahmen vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse eine wichtige Rolle, so auch bei verschiedenen Herzerkrankungen. Sie wirken sich nicht nur durch Plaquestabilisierung negativ auf die Koronarerkrankung aus (Malemud 2006, Visse und Nagase 2003), sondern triggern das kardiale „Remodeling“ bei der hypertensiven Herzerkrankung (Sakata et al. 2004), sowie bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz (Spina 2002).

Auch sind Matrixmetalloproteinasen entscheidend an den Gewebeveränderungen beim Typ 2-Diabetes beteiligt, z.B. beim zunehmenden Einbau steifer Kollagenformen in den Glomeruli bei der diabetischen Nephropathie. Es werden sowohl gesteigerte Aktivität von MMPs für eine zunehmende Fibrosierung von Organen (z.B. Niere, Herz, Leber, Lunge) beim Typ 2-Diabetes verantwortlich gemacht (Rodriguez et al. 2006), als auch Aktivitätsminderungen von MMPs mit zunehmendem Kollagengehalt in Verbindung gebracht (Mason und Wahab 2003, Schaefer et al. 1997).

Viele bisher durchgeführte Untersuchungen zur Rolle der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren bei Organveränderungen im Rahmen eines Typ 2-Diabetes haben sich auf das Gefäßsystem oder die Niere bezogen. Untersuchungen am Myokard von Typ 2-Diabetes erkrankten Individuen wurden bislang nicht durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Typ 2-Diabetes-assoziierten Veränderungen am Herzen genauer zu betrachten und festzustellen, ob veränderte Expressionsniveaus von MMPs und TIMPs beobachtet werden können.

Folgende, im Anschluss eingehender diskutierte, Hauptergebnisse wurden bei den Untersuchungen erzielt:

1. Die ZDF-Ratte bestätigt sich als etabliertes Tiermodell des Typ 2-Diabetes und durchläuft in verschiedenen Altersstufen unterschiedliche Stadien der Erkrankung.
2. Mit steigendem Alter fibrosiert das linksventrikuläre Myokard zunehmend. Bei diabetischen Versuchstieren findet im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren eine signifikant stärkere Fibrosierung statt.
3. Mit zunehmendem Lebensalter wird eine signifikante Abnahme der Anzahl myokardialer Fibroblasten in diabetischen und nicht-diabetischen Tieren beobachtet, wobei zwischen beiden Gruppen kein Unterschied festgestellt werden kann.

4. Die Proteinexpression von MMP-9 und MMP-2 steigt mit zunehmendem Alter der Tiere an. Bei den diabetischen Tieren fällt der relative Anstieg jedoch geringer aus als bei den nicht-diabetischen Kontrolltieren. Die Proteinexpression von TIMP-1 fällt im Alter ab. Hier gibt es keinen Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren.
5. Die mRNA-Expression von MMP-9 steigt mit zunehmendem Alter der Tiere an. Demgegenüber sinkt bei MMP-2 die mRNA-Expression mit zunehmendem Alter. Die mRNA-Expression von TIMP-1 verringert sich mit zunehmendem Alter. Zwischen diabetischen Tieren und nicht-diabetischen Kontrolltieren werden bezüglich der mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

4.1 Die ZDF-Ratte als Tiermodell des Typ 2-Diabetes

Die ZDF-Ratte als Tiermodell mit einem diabetischen Stoffwechsel wurde bereits 1976 beschrieben. Diese ist charakterisiert durch eine signifikante Hyperglykämie, Hyperinsulinämie sowie eine Insulinresistenz und Fettleibigkeit (Hunt et al. 1976). Weitere Untersuchungen zeigen, dass die Glucosetoleranz dieser Tiere erheblich gestört ist und sich der Diabetes, insulinunabhängig, im Alter von etwa sechs Monaten ausbildet (Clark et al. 1983). Die Insulinresistenz, sowie die Fettleibigkeit werden als typische Eigenschaften der ZDF-Ratte beschrieben (Peterson 1994). Diese Merkmale bestätigen die Eignung der ZDF-Ratte als Tiermodell für den Typ 2-Diabetes.

Untersuchungen, bei denen die biometrischen Daten von 12 Wochen alten ZDF-Ratten mit nicht-diabetischen Kontrolltieren verglichen wurden, zeigen, dass die ZDF-Ratten ein erhöhtes Körpergewicht haben, sowie höhere Blutglucosespiegel als die nicht-diabetischen Tiere (Fredersdorf et al. 2004, Considine et al. 1995). Eben dieser Vergleich wurde auch über mehrere Altersstufen hinweg geführt (Fredersdorf et al. 2004, Vora et al. 1996). Es zeigt sich mit zunehmendem Alter auch ein Anstieg des Körpergewichts, wobei die diabetischen Tiere bis zum Alter von 22 Wochen ein signifikant höheres Körpergewicht haben als die nicht-diabetischen Kontrolltiere. Danach jedoch gleicht sich das Körpergewicht der beiden Tiere fast an, die nicht-diabetischen Tiere wiegen im Alter von 42 Wochen sogar etwas mehr. Betrachtet man die Entwicklung der Blutglucosespiegel in jener Untersuchung, so zeigt sich bei den nicht-diabetischen Tieren über alle Altersstufen hinweg ein konstanter euglykämischer Blutzuckerspiegel. Bei den diabetischen ZDF-Ratten nimmt der Blutzuckerspiegel mit zunehmendem Alter stetig zu und ist, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant (etwa 4-5-fach) höher.

Eigene Messungen der biometrischen Daten entsprechen genau diesen, bereits beschriebenen Verhältnissen. Auch hier zeigte sich mit zunehmendem Alter der Tiere ein Anstieg des Körpergewichts, wobei zunächst die ZDF-Ratten mehr wiegen als die ZL-Tiere. Desweiteren verhält es sich so, dass im Alter von 42 Wochen die diabetischen Tiere etwas an Körpergewicht verlieren und weniger wiegen als die ZL-Ratten. Die Abnahme des Körpergewichts zu diesem Zeitpunkt erklärt sich durch die schweren Auswirkungen des diabetischen Krankheitsbildes auf den gesamten Organismus. Der Vergleich der Blutglucosespiegel zeigt ebenso eine Übereinstimmung mit den zitierten Arbeiten von Considine et al., Fredersdorf et al. und Vora et al.. Während bei den nicht-diabetischen Kontrolltieren in jeder Altersstufe ein konstanter euglykämischer Blutzuckerspiegel gemessen wird, steigt der Blutzuckerspiegel der ZDF-Ratten im Alter enorm und liegt signifikant über dem der ZL-Ratten.

Eine Messung des absoluten Herzgewichtes von ZDF-Ratten und nicht-diabetischen Vergleichstieren wurde bei Fredersdorf et al. (2004) durchgeführt, wo sich kein signifikanter Unterschied zeigte. Im histologischen Bild wurde in dieser Arbeit jedoch eine Größenzunahme der einzelnen Myozyten bei den diabetischen Versuchstieren beschrieben. Die Autoren interpretieren daher das ähnliche Herzgewicht zwischen ZL- und ZDF-Ratten so, dass es bei den diabetischen Tieren zu einer vermehrten Apoptose kommt und die einzelnen Myozyten hypertrophieren. Allerdings wurden die Tiere nur im Alter von 19 Wochen verglichen. In den eigenen Messungen wird eine Zunahme des absoluten Herzgewichtes mit ansteigendem Alter beobachtet, was sich durch die Gesamtzunahme des Körpergewichts erklären lässt. Ein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen und Kontrolltieren besteht jedoch nicht. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass der Typ 2-Diabetes keine Auswirkungen auf das absolute Herzgewicht hat, obgleich eine Hypertrophie auf Zellebene konstant beobachtet werden kann.

Die Veränderungen des Blutglucosespiegels im Rahmen eines Typ 2-Diabetes werden in dieser Arbeit durch die biometrischen Daten der Tiere bestätigt. Es zeigt sich sehr eindrucksvoll die Entwicklung einer Fettleibigkeit im zeitlichen Zusammenhang mit der Entstehung eines Typ 2-Diabetes vom euglykämischen über einen hochnormalen Blutzuckerspiegel bis zum Vollbild des Diabetes.

4.2 Linksventrikuläre Fibrose am diabetischen Herzen

Für verschiedene Organe sind fibrotische Veränderungen beim Diabetes beschrieben worden. Am menschlichen Herzen wurden diese Fibrosierungen erstmals im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie beschrieben (Fein 1990, Fein & Sonnenblick 1994, Spector

1998).

Verschiedene Studien zeigen, dass diabetische Tiere im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren signifikant stärker fibrosiertes Herzgewebe haben. So findet sich im Herzgewebe von ZDF-Ratten zwei Monate nach Manifestation des Diabetes eine perivaskuläre Fibrose (Fredersdorf et al. 2004). Bei Streptozotocin-Ratten (ein Tiermodell des Typ-1-Diabetes) ist der Gesamtkollagengehalt am Herzen, gemessen mit Sirius Red Färbung, signifikant höher als bei nicht-diabetischen Kontrolltieren (Bollano et al. 2006, Tschöpe et al. 2004). Die genauere Darstellung der Kollagentypen zeigt, dass im Herzen vor allem Kollagen Typ I und Kollagen Typ III vorkommen. Auch bei Typ 2-diabetischen ZDF-Ratten zeigt sich eine perivaskuläre Akkumulation von Kollagen Typ I (Fredersdorf et al. 2004), ebenso wie von Kollagen Typ III (Huang et al. 2005).

Die eigenen Färbungen mit Sirius Red bestätigen die Aussagen der anderen Studien. Darüber hinaus zeigt sich eine interstitielle Fibrose. Der Gesamtkollagengehalt am diabetischen Herzen ist sehr viel stärker, als bei nicht-diabetischen Kontrollen. Es zeigt sich, dass der prozentuale Anteil der Kollagene am diabetischen Herzgewebe größer ist, was den Rückschluss erlaubt, dass der Fibrosierungsgrad des Herzgewebes steigt. Zudem lassen die eigenen Untersuchungen zwei weitere Ergebnisse erkennen: Es wird deutlich, dass mit zunehmendem Alter sowohl bei diabetischen als auch bei nicht-diabetischen Tieren der Grad an myokardialer Fibrose steigt. Dieser Zustand lässt sich durch normale altersbedingte Veränderungen des Gewebes erklären, die durch eine zunehmende Fibrose gekennzeichnet sind (Eghbali et al. 1989). Desweiteren zeigt sich aber auch, dass sich die stärkere Fibrosierung erst mit der diabetischen Stoffwechsellage entwickelt, mehr noch, sich sogar im Laufe dieser verstärkt. Im prädiabetischen Stadium ist noch kein signifikanter Unterschied in dem Grad der Fibrose zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren festzustellen. Kurz nach der Manifestation der Erkrankung ist die Fibrosierung bereits schwach erhöht, im Spätstadium der Erkrankung sogar stark signifikant. Das bedeutet, dass während des fortschreitenden Typ 2-Diabetes bestimmte Mechanismen ausgelöst werden, welche im Myokard eine gesteigerte Fibrose verursachen. Diese Fibrose, im Zusammenhang mit anderen Veränderungen im Myokard und der extrazellulären Matrix, führt zum Krankheitsbild der diabetischen Kardiomyopathie. Welche Mechanismen im Rahmen des Typ 2-Diabetes diese fibrotischen Veränderungen bewirken, wird zum Teil in weiteren Abschnitten dieser Diskussion bearbeitet. Eine Hypothese besagt, dass es im Typ-2-diabetischen Myokard über eine vermehrte Apoptose der Myozyten zum gesteigerten Zelluntergang kommt, welcher die Fibrose triggert (Fredersdorf et al. 2004).

4.3 Die Zellen des linksventrikulären Myokards beim Typ 2-Diabetes

Abgesehen von den Kardiomyozyten besteht das linksventrikuläre Myokard aus Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen, den sogenannten Nicht-Kardiomyozyten. Diese drei Zelltypen konnten alle im Rahmen dieser Arbeit im linksventrikulären Myokard von diabetischen ZDF-Ratten und nicht-diabetischen ZL-Ratten nachgewiesen werden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass sich die jeweiligen Zellen an der, für sie funktionell bedeutsamen, Lokalisation befinden.

Die Endothelzellen lassen sich in den Gefäßen des Myokards darstellen. Die glatten Muskelzellen finden sich hauptsächlich perivaskulär. Dort bilden sie einen Bestandteil der Muskelschicht der Gefäßwand. Die Fibroblasten machen den größten Anteil der Nicht-Kardiomyozyten aus. Sie lassen sich ubiquitär zwischen den Kardiomyozyten darstellen und sind für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich (MacKenna et al. 2000).

Da die Fibroblasten den Großteil der Nicht-Kardiomyozyten ausmachen und für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, ist anzunehmen, dass sie eine wichtige Rolle im Fibrosierungsprozess spielen (MacKenna et al. 2000, Eghbali et al. 1990). Deshalb wurden die Fibroblasten in Kryoschnitten des linksventrikulären Myokards der ZDF- und ZL-Ratten in verschiedenen Altersstufen immunhistologisch dargestellt und ihre Anzahl durch Auszählung unter dem Mikroskop bestimmt. Überraschenderweise zeigt sich hier zwischen den diabetischen und den nicht-diabetischen Kontrolltieren in den beiden untersuchten Stadien der Erkrankung kein Unterschied in der Anzahl der Fibroblasten. Interessanterweise nimmt die Anzahl der Fibroblasten sowohl bei den ZDF- als auch bei den ZL-Tieren mit dem Alter signifikant ab. Obwohl das Herzgewebe mit zunehmendem Alter stärker fibrosiert, sind signifikant weniger Fibroblasten im Herzgewebe nachzuweisen. Da die Abnahme der Fibroblastenzahl sowohl bei den diabetischen, als auch bei den nicht-diabetischen Tieren nachweisbar ist, ist davon auszugehen, dass es sich um einen normalen Alterungsprozess des Gewebes handelt, in dessen Rahmen die Proliferationsfähigkeit der Zellen abnimmt. Für andere Organe ist dieser Sachverhalt in natürlich alterndem Gewebe noch nie beschrieben worden. In Lebergewebe von Mäusen, bei dem eine Alterung und Fibrose künstlich durch Carbontetrachlorid induziert wurde, zeigen die alternden Myofibroblasten eine herabgesenkte Proliferationsrate und werden vermutlich vermehrt durch natürliche Killerzellen abgebaut (Jun et al. 2010). Embryonale Mausfibroblasten proliferieren unter in-vitro-Bedingungen nur über einen limitierten Zeitraum, d.h. dass sie mit zunehmendem Alter nur noch vermindert teilungsfähig sind (Di Micco et al. 2008). Bei

Schweinefibroblasten kommt es im höheren Alter zu einer geringeren Ausprägung an bestimmten Oberflächenrezeptoren, wie beispielsweise dem „fibroblast growth factor“ (FGF), welche für die Teilungs- und Proliferationsfähigkeit der Zellen zuständig sind (Vavken et al. 2010). Warum es trotz gesenkter Anzahl an Fibroblasten zur stärkeren Fibrose im Alter kommt, bleibt zu klären. Zum einen könnten die verbleibenden Fibroblasten vermehrt Kollagene produzieren, zum anderen kann ein eingeschränkter Abbau der Kollagene zur Fibrosierung führen. Erklärungen in der Literatur, welche Fibroblastenanzahl und Fibrose in einen Zusammenhang bringen, finden sich nicht und sind daher Gegenstand weiterer Forschungsprojekte.

4.4 MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im linksventrikulären Myokard der Versuchstiere

Matrixmetalloproteinasen, eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, sind in der Lage, über die Degradation der Matrixbestandteile die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu steuern. Im gesunden Gewebe ist die proteolytische Aktivität der MMPs zum Erhalt der Homöostase innerhalb der extrazellulären Matrix unter anderem durch endogene MMP-Inhibitoren (TIMPs) und spezifischen Aktivatoren (MT1-MMP) reguliert. Ein Schema der Aktivierung und Inhibition der MMPs ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Störung dieser Balance wird häufig in Zusammenhang mit schweren Erkrankungen wie einer Fibrose, einer schweren Arthritis oder malignen Tumoren gesehen.

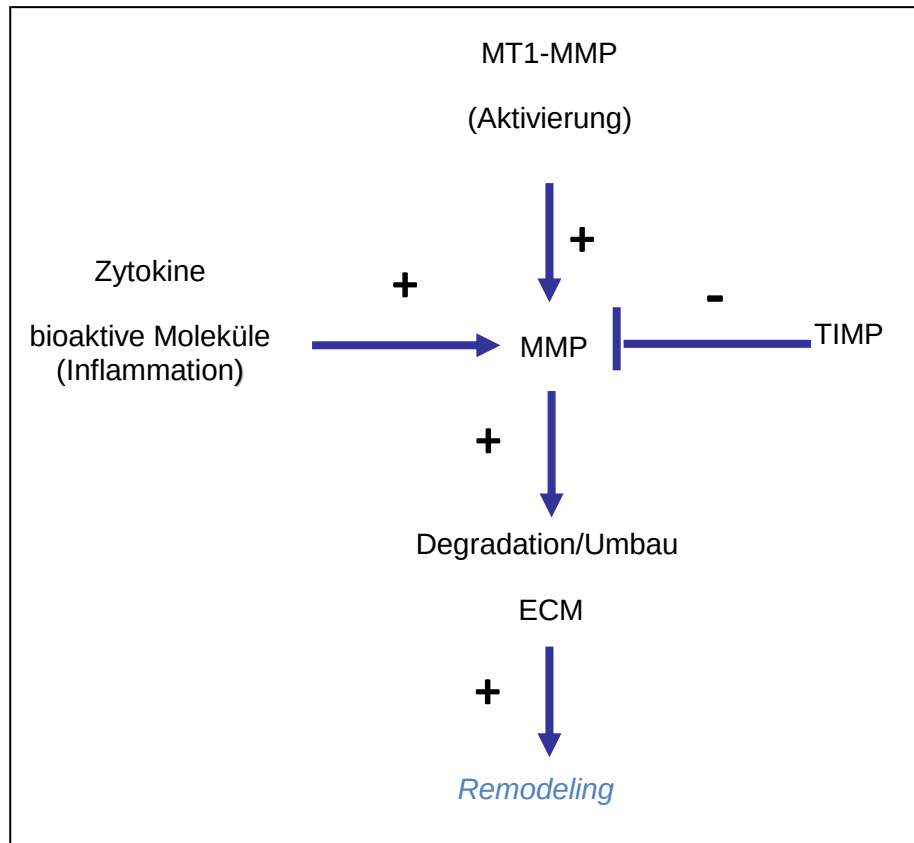


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aktivierung und Inhibition von Matrixmetalloproteinasen. Die Matrixmetalloproteinasen werden durch endogene und exogene Aktivatoren stimuliert, die gewebständigen Inhibitoren könne ihre Aktivität einschränken; MT1-MMP = Membran-Typ-1 Matrixmetalloproteinase; MMP = Matrixmetalloproteinase; TIMP = „Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteases“; ECM = Extrazelluläre Matrix; + = Aktivierung; - = Inhibition.

Verschiedene MMPs sind für den Abbau unterschiedlicher Bestandteile der extrazellulären Matrix verantwortlich. MMP-2 und MMP-9 zeigen eine Substratspezifität für Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin (Spinale 2007). Der durch die MMPs verursachte Abbau dieser Substrate spielt eine entscheidende Rolle bei myokardialen „Remodeling“-Vorgängen z.B. nach Myokardinfarkt oder einer chronischen hämodynamischen Belastung des Herzens (Brown et al. 2005). Durch eine erhöhte MMP-Proteinexpression bzw. ungleiche Expressionsniveaus von MMPs und TIMPs kommt es zu einer Steigerung des Umsatzes der extrazellulären Matrix mit einer daraus resultierenden Umstrukturierung des Gewebes, dem kardialen „Remodeling“ (Spinale 2002). Dieser Vorgang beinhaltet durch einen erhöhten Abbau an Kollagenen mit anschließendem Ersatz durch andere Kollagentypen auch einen Verlust der geordneten Struktur der extrazellulären Matrix, was wiederum eine Funktionseinschränkung der Kontraktilität des Myokards bewirkt (Garcia et al. 2005). In verschiedenen Arbeiten, durchgeführt mit Herzgewebe von Ratten und Hunden, wurde inzwischen beschrieben,

dass eine Steigerung der MMP-Proteinexpression, vor allem von MMP-2 und MMP-9, zu diesem kardialen „Remodeling“, einhergehend mit Fibrosierung, führt (Morita et al. 2006, Meiners et al. 2004, Sakata et al. 2004). In fibrosierten Herzen findet sich neben einer erhöhten MMP-Proteinexpression auch ein vermehrter Gesamtgehalt an Kollagenen, wobei aber vor allem Kollagen Typ I und Kollagen Typ III stärker nachgewiesen werden können (Herpel et al. 2006).

Kardiales „Remodeling“ findet auch im Rahmen von Kardiomyopathien statt. Bei verschiedenen Typen der Kardiomyopathie (dilatative Kardiomyopathie, ischämische Kardiomyopathie, valvuläre Kardiomyopathie) wurde gezeigt, dass immunhistochemisch detektiertes MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im kardiomyopathischen humanen Herzen signifikant häufiger vorkommt als bei gesunden humanen Herzen (Herpel et al. 2006). Auch die funktionelle Aktivität der MMPs, mittels Zymographie an menschlichem Myokard gemessen, nimmt bei Kardiomyopathien zu (Spinale 2002). Ebenso werden bei Mäusen mit genetisch (durch Überexpression von TNF α) induzierter Hypertrophie und Dilatation des Herzens erhöhte MMP-9- und stark erhöhte MMP-2-Aktivitäten gemessen (Li et al. 2002).

Interessant für diese Arbeit sind aber vor allem auch Studien, welche mit diabetischen Versuchstieren durchgeführt wurden und sich mit der Expression der MMPs beschäftigen. So wurde herausgefunden, dass die mRNA-Expression im Myokard von MMP-2, sowie auch dessen Aktivität bei Typ-1-diabetischen Versuchstieren (Streptozotocin-Ratten und – Mäusen) im Vergleich zu gesunden Tieren vermindert ist (Ban und Twigg 2008, van Linthout et al. 2008, Li et al. 2007, Westermann et al. 2007). Die Untersuchungen zur Proteinexpression von MMP-2 im Myokard zeigen bei Ratten und Mäusen mit induziertem Typ-1 Diabetes ebenfalls eine Verminderung im Vergleich zur nichtdiabetischen Kontrolle (Westermann et al. 2007, Bollano et al. 2006). Betrachtet man die Proteinexpression von MMP-9 bei Typ-1-diabetischen Mäusen im Vergleich zu gesunden Tieren, so fällt in zwei Studien eine gesteigerte Proteinexpression auf (Ban und Twigg 2008, Westermann et al. 2007). Eine andere Studie beschreibt für die Proteinexpression von MMP-9 am Herzen zwischen Versuchstieren mit Typ-1 Diabetes und gesunden Kontrolltieren keinen Unterschied, ebenso wenig verändert sich die Proteinexpression von TIMP-1 (Bollano et al. 2006).

Nicht nur an Versuchstieren, auch an kardialen Fibroblasten adulter Ratten wurde die globale Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemessen. Hier zeigt sich, dass mit Glucose stimulierte Fibroblasten eine signifikant geringere MMP-2- und MMP-9-Aktivität aufweisen im Vergleich zu nicht stimulierten Fibroblasten (Asbun et al. 2005).

4.4.1 Veränderungen der MMP-/TIMP-Expression mit zunehmendem Alter der Versuchstiere

In dieser Arbeit wurde die Expression der MMPs über einen Zeitverlauf und somit sowohl während des normalen Alterungsprozesses, als auch während der verschiedenen Stadien des Diabetes beobachtet.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Proteinexpression von MMP-2 und MMP-9 im linksventrikulären Myokard sowohl bei den nichtdiabetischen Kontrolltieren, als auch bei den ZDF-Ratten mit zunehmendem Alter der Versuchstiere ansteigt, während die Proteinexpression von TIMP-1 abnimmt. In höherem Lebensalter werden also generell vermehrt MMPs exprimiert, bzw. kommt es zu einer Imbalance zwischen MMP- und TIMP-Proteinexpression, die zu einer Fibrose im Alter führt. Bildet man den Quotienten aus MMP-2 und TIMP-1 bzw. MMP-9 und TIMP-1, so zeigt sich, dass dieser mit zunehmendem Alter größer wird. Die Proteinexpressionsniveaus von MMP-2 bzw. MMP-9 und TIMP-1 divergieren also mit steigendem Alter immer stärker. Eine alleinige Betrachtung der MMP-/TIMP-Proteinexpression im Altersverlauf findet sich in keiner anderen Arbeit. Auffällig ist jedoch bei den eigenen Untersuchungen, dass mit zunehmendem Alter bei diabetischen und nicht-diabetischen Tieren auch eine stärkere Fibrosierung festgestellt wurde. Dieser Sachverhalt spiegelt die Verhältnisse bei anderen Formen der Kardiomyopathie (z.B. dilatativer oder valvulärer Kardiomyopathie) wieder. Auch hier wird eine vermehrte Fibrose im Herzgewebe und gleichzeitig eine Erhöhung der MMPs beschrieben (Herpel et al. 2006, Li et al. 2002). Außerdem zeigen Studien, dass mit einer zunehmend stärker ausgeprägten Kardiomyopathie eine stetige Zunahme an MMP-Expression zu verzeichnen ist (Spinale et al. 1998, Coker et al. 1998). Die Entwicklung einer Fibrose steht also offensichtlich im direkten Zusammenhang mit einer Veränderung der MMP-/TIMP-Proteinexpression.

Die genannten Studien beschäftigen sich ausschließlich mit Fibrosierungs- und „Remodeling“-Vorgehen am vorgeschädigten Herzen. In dieser Arbeit wird deutlich, dass es auch im normalen Alterungsprozess gesunder Versuchstiere zu einem Anstieg der MMP-2- und MMP-9-Proteinexpression sowie einer konsekutiven Fibrosierung des Myokards kommt. In wie weit auch die veränderte TIMP-1-Proteinexpression eine Rolle bei diesen Vorgängen spielt, kann Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen sein. Bis jetzt wurde die TIMP-1-Proteinexpression in wenigen Arbeiten untersucht, und in diesen Arbeiten finden sich keine einheitlichen Aussagen bezüglich des Expressionsverhaltens. So wird z.B. eine Verminderung der TIMP-1-Proteinexpression bei dilatativer Kardiomyopathie beschrieben (Gunja-Smith et al. 1996, Li et al. 1998), in anderen

Arbeiten aber auch eine Erhöhung (Thomas et al. 1998), sowie ein Fehlen der Veränderung in der Expression (Spinale et al. 2000). In den eigenen Untersuchungen ist die TIMP-1-Proteinexpression mit zunehmendem Alter der Versuchstiere vermindert, jedoch nicht signifikant.

In den meisten Untersuchungen zu MMPs und TIMPs werden entweder die Proteinexpressionen betrachtet oder die Aktivität der MMPs durch Zymographien dargestellt. Interessant ist aber auch die Frage, ob die Veränderungen in der MMP-Expression erst auf Proteinebene zu verzeichnen sind, oder ob auch die mRNA-Expression von MMPs und TIMPs verändert ist. Dazu wurden in dieser Arbeit RT-PCRs für MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 durchgeführt. Betrachtet man die mRNA-Expression von MMP-2, so fällt auf, dass mit zunehmendem Alter eine Abnahme der mRNA-Expression zu verzeichnen ist. Auf mRNA-Ebene spiegeln sich die Ergebnisse der Proteinebene nicht 1:1 wider. Dies könnte für eine längere Halbwertszeit der Proteine oder auch für eine sehr kurze Halbwertszeit der mRNA sprechen. Möglicherweise wird auch der Abbau der Proteine, der üblicherweise durch Autolyse stattfindet, verhindert. Bei den Untersuchungen für MMP-9 und TIMP-1 zeigen die mRNA-Expressionen übereinstimmende Ergebnisse mit der Proteinuntersuchung. Für MMP-9 ist mit ansteigendem Alter eine Zunahme der mRNA-Expression zu verzeichnen, für TIMP-1 zeigt sich ein leichter Rückgang der mRNA-Expression. Betrachtet man nur die Ergebnisse der mRNA-Expression von MMP-9 und TIMP-1, so könnte man davon ausgehen, dass die Steigerung der MMPs auf transkriptionell reguliert wird. Diese Ergebnisse lassen sich nicht auf die Ergebnisse von MMP-2 übertragen. Vermutlich spielt also hier ein posttranslationaler Umbau bei der Regulation der MMPs eine Rolle. In wenigen Untersuchungen zur MMP-/TIMP-mRNA-Expression wurden auch Veränderungen auf dieser Ebene beschrieben. So zeigt sich einerseits eine gesteigerte mRNA-Expression für MMP-2 und MMP-9 bei Hunden mit, durch wiederholte intrakoronare Mikroembolisation herbeigeführter, chronischer Herzinsuffizienz. (Rastogi et al. 2008, Morita et al. 2006). Andererseits wurde auch gezeigt, dass die mRNA-Expression von MMP-9 bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie vermindert ist, während der relative Proteinanteil höher ist (Batlle et al. 2007). Die Autoren interpretieren dies als posttranslationale Veränderung. Dies entspricht genau den eigenen Ergebnissen für die Untersuchungen zur mRNA- und Proteinexpression bei MMP-2. Für MMP-2 wird auch eine Aktivitätssteigerung in der Zymographie bei gleichbleibender mRNA-Expression in dilatativen Herzen beschrieben (Reinhardt et al. 2002).

Es zeigen sich unterschiedliche Veränderungen auf mRNA-Ebene, so dass weiterhin unklar bleibt, auf welcher Stufe die Proteinexpression der MMPs reguliert wird. Es gibt

verschiedene biologische und mechanische Stimuli, die sich sowohl transkriptionell, als auch translational und posttranslational auf die Proteinexpression und Aktivität der MMPs auswirken. Welche dieser Stimuli in diesen Untersuchungen für eine gesteigerte MMP-Proteinexpression bzw. erhöhte Aktivitätszustände im Alter verantwortlich ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht festlegen. Es werden z.B. Aktivitätssteigerungen von MMPs unter myokardialer Ischämie beschrieben (Deschamps et al. 2005), sowie auch bei oxidativem Stress (Siwik et al. 2001). Stabilere Formen von MMPs, welche in komplexeren Vorgängen abgebaut werden entstehen unter vermehrter O-Glykolisierung (Remacle et al. 2005). Unter Vitamin-D-Mangel sind erhöhte Spiegel an zirkulierendem MMP-9 bei gesunden menschlichen Probanden festgestellt worden (Timms et al. 2002). Es ist möglich, dass die Proteinform der MMPs langlebiger ist als die mRNA-Form, und deshalb vermehrt nachgewiesen werden kann. Die Messung der mRNA spiegelt die Vorgänge in einer Zelle nur zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt wieder, da mRNA sehr labil ist und eine kurze Lebensdauer hat. Bestimmungen der Proteinkonzentration hingegen sind oft sehr viel aussagekräftiger, da die Proteine als „Gedächtnis“ der Stoffwechselvorgänge angesehen werden können.

4.4.2 Veränderungen der MMP-/TIMP-Proteinexpression bei Typ-2-diabetischen Versuchstieren

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, inwiefern der Typ 2-Diabetes eine Rolle für die transkriptionellen und translationalen Veränderungen der MMPs und TIMPs im Herzen, und somit für die Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie spielt. Erstmals wurden in der hier vorgestellten Arbeit Untersuchungen zur Expression der MMPs im Myokard von Tieren mit Typ-2 Diabetes durchgeführt. Alle bisherigen Studien beschäftigten sich mit anderen Formen von Kardiomyopathien oder mit Veränderungen am Myokard von Tieren mit Typ-1 Diabetes, wobei es sich um ein artifizielles Modell handelte, bei dem die diabetische Erkrankung durch medikamentöse Zerstörung der β -Zellen des Pankreas herbeigeführt wurde (z. B. Streptozotocin-induziert, Sung et al. 2009).

Betrachtet man zunächst Arbeiten, die sich mit dem MMP- und TIMP-Verteilungsmuster am Typ 1-diabetischen Herzen beschäftigen, so zeigt sich für MMP-2 eine verminderte Proteinexpression sowie auch eine zymographisch gemessene Aktivitätsabnahme bei Streptozotocin-Ratten (Li et al. 2007, Bollano et al. 2006). Für MMP-9 und TIMP-1 lassen sich auf translationaler Ebene keine signifikanten Expressionsunterschiede zu nicht-diabetischen Kontrolltieren nachweisen. Auch in dieser Arbeit wird eine Zunahme an Gesamtkollagen beschrieben (Bollano et al. 2006). Eine Verminderung der MMP-Aktivität

unter dem Einfluss von Glucose wird auch in-vitro gezeigt. Hier lässt sich an kardialen Rattenfibroblasten nach hochdosierter Glucosestimulation eine Abnahme der globalen MMP-Aktivität nachweisen bei gleichzeitiger Zunahme an Typ-I Kollagen (Asbun et al. 2005).

Arbeiten zu MMP-/TIMP-Veränderungen bei Typ 2-Diabetes finden sich lediglich für andere Organe, welche bei Diabeteserkrankungen pathologischen Veränderungen unterliegen. Ein Organ, das im Blickpunkt der MMP-/TIMP-Forschung beim Diabetes mellitus steht, ist die Niere. Die diabetische Nephropathie ist ein Krankheitsbild, das durch Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose geprägt wird (Mason und Wahab 2003). Sowohl für Diabetes mellitus Typ 1 als auch für Typ 2 werden bei Versuchstieren (ZDF-Ratten) verminderte Proteinexpressionen sowie Aktivitäten von MMP-9 im Nierengewebe beschrieben (Mason und Wahab 2003, Schaefer et al. 1997). Für MMP-2 zeigt sich hier keine Veränderung, die TIMP-1-Aktivität ist gesteigert, auch Typ IV-Kollagen lässt sich vermehrt nachweisen (Schaefer et al. 1997). Auch in-vitro wird unter dem Einfluss von hochdosierter Glucose bei menschlichen Mesangiumzellen eine verminderte MMP-Aktivität und gleichzeitig erhöhte TIMP-Aktivität beobachtet (McLennan et al. 2004). Hingegen beschreibt Rodriguez eine vermehrte MMP-Aktivität in Glomeruli bei Typ 2-Diabetes (Rodriguez et al. 2006).

In den eigenen Untersuchungen zeigt sich auf Proteinebene für MMP-2 im Spätstadium der Erkrankung (42 Wochen alte Tiere) eine verminderte Expression bei den diabetischen Tieren im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrolle. Zu den anderen Zeitpunkten, also im prädiabetischen Stadium und zu Beginn der Zuckerkrankheit, lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Für MMP-9 findet sich auf Proteinebene bei den 22 und bei den 42 Wochen alten Tieren eine signifikant geringere Expression bei den an Typ 2-Diabetes erkrankten Tieren als bei den gesunden Tieren. Die gemessenen Proteinexpressionen von TIMP-1 unterscheiden sich hingegen während aller drei Altersstufen zwischen den diabetischen und den Kontrolltieren nicht signifikant, was den Ergebnissen von Bollano et al. (2006) entspricht. Parallel zur Expression der MMPs und TIMPs auf translationaler Ebene lässt sich auch hier wieder die Fibrosierung des Gewebes betrachten, die letztendlich das Krankheitsbild der diabetischen Kardiomyopathie prägt. Hier lassen die eigenen Ergebnisse erkennen, dass die Fibrosierung bei den diabetischen Tieren sehr viel stärker ausgeprägt ist, als bei den Kontrolltieren. Während im prädiabetischen Stadium kein Unterschied auszumachen ist, ist die Fibrosierung bei den 22 Wochen alten Tieren schwach signifikant und bei den 42 Wochen alten Tieren, im Vollbild des Diabetes Typ 2, stark signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrolle. Betrachtet man diesen Teil der Untersuchungen, kommt es bei diabetischen Tieren zu einem stärkeren Anstieg der Fibrose bei gleichzeitig geringerer Proteinexpression von MMPs im

Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren.

Vergleicht man die eigenen Ergebnisse vom Typ 2-diabetischen Herzgewebe mit den o.g. Arbeiten so liegt die Vermutung nahe, dass eine Diabeteserkrankung zu einer verminderten Proteinexpression an MMPs führt und eventuell auch zu einer gesteigerten Proteinexpression an TIMPs. Dieses Ungleichgewicht an MMPs und TIMPs sorgt so über einen verminderten Abbau von Kollagen und über eine Kumulation dieser im Gewebe zur Fibrose (Bollano et al. 2006). Diese Fibrose spiegelt sich am Herzen als diabetische Kardiomyopathie wieder (Li et al. 2007). An anderen Organen, z.B. an der Niere, zeigt sie sich als pathologische Veränderung im Rahmen der diabetischen Nephropathie (Mason und Wahab 2003).

Mit dieser Arbeit ist es nun gelungen, zu zeigen, dass es auch im Myokard bei an Typ 2-Diabetes erkrankten Tieren zu diesen Veränderungen kommt. Die in-vitro Versuche von Asbun haben gezeigt, dass ein hoher Glucosespiegel diese Veränderungen herbeiführen kann. Fraglich ist aber, ob neben den erhöhten Blutzuckerspiegeln auch der abnormale Insulinmetabolismus im Rahmen des Typ 2-Diabetes zu veränderten Proteinexpressionen von MMPs und TIMPs führen kann. Auffällig in der eigenen Arbeit ist, dass am Myokard vor allem die MMP-9-Proteinexpression bei den ZDF-Tieren im Vergleich zu den gesunden ZL-Tieren vermindert ist. Dieses Resultat findet sich auch in den Untersuchungen am Nierengewebe von Typ 2-diabetischen Tieren (Schaefer et al. 1997). Es könnte also durchaus sein, dass sich die veränderte Insulinproduktion beim Diabetes Typ 2 auf die Proteinexpression dieser Matrixmetalloproteinase auswirkt. Dafür müssen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen in-vitro kardiale Fibroblasten nicht nur mit Glucose, sondern auch mit verschiedenen Dosen an Insulin stimuliert werden, und anschließend die MMP-Proteinexpression gemessen wird.

4.4.3 Veränderungen der MMP-/TIMP-mRNA-Expression bei Typ-2-diabetischen Versuchstieren

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit besteht darin, die gemessenen Daten auf Proteinebene auch auf transkriptioneller Ebene, durch Messung der mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 am Typ 2-diabetischen Myokard, zu bestätigen.

Unterschiede in der Genexpression sind in anderen Arbeiten am Typ 1- diabetischen Herzen beschrieben. So korreliert ein Anstieg an Kollagengehalt negativ mit der mRNA-Expression von MMP-2 und positiv mit derjenigen von TIMP-1 am Herzgewebe bei Streptozotocin-Ratten (Li et al. 2007). Auch van Linthout zeigt an Streptozotocin-Ratten eine verringerte MMP-2-mRNA-Expression und erhöhte TIMP-2-Expression bei gleichzeitigem Anstieg des Gesamtkollagengehalts im linken Ventrikel (van Linthout et al.

2008). Für Veränderungen im Rahmen des Typ 2-Diabetes stehen auch hier Vergleiche mit Nierengewebe zur Verfügung. Im Glomerulum von ZDF-Ratten ist die MMP-9-mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren vermindert (Schaefer et al. 1997). Im Rahmen diabetischer Nephropathien wird im menschlichen Gewebe eine verminderte mRNA-Expression von MMP-2 beschrieben, ebenso in Gewebe von Ratten eine verminderte MMP-9- und gesteigerte TIMP-1-mRNA-Expression (Mason und Wahab 2003). Bei Messungen der mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 in Aortengewebe bei Typ 2-diabetischen Tieren wurde eine gesteigerte Expression festgestellt (Song und Ergul 2006).

In den eigenen Untersuchungen mittels RT-PCR zeigen sich für MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Insgesamt zeigen sich nur geringfügige Veränderungen auf mRNA-Ebene, so dass aufgrund dieser Ergebnisse vermutet werden kann, dass ein posttranslati onaler Stimulus die Veränderungen auf Proteinebene beeinflusst. Allerdings zeigen sich auch auf mRNA-Ebene geringe Unterschiede zu den gesunden Tieren, so dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein Einfluss auf die mRNA-Expression besteht.

Da es keine Vorarbeiten zu Veränderungen am Myokard beim Diabetes Typ 2 gibt, kann kein direkter Vergleich zu anderen Untersuchungen gezogen werden. Die Arbeiten zu Veränderungen am Myokard bei Typ 1-Diabetes und die Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie im Rahmen des Typ 2-Diabetes lassen vermuten, dass eine Regulation der MMP-Expression bereits auf mRNA-Ebene stattfindet. Jedoch werden in diesen Arbeiten die Tiere nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet, so dass die Entwicklung der Expressionsveränderungen bis jetzt noch nicht experimentell beobachtet wurde. In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Tiere erstmalig über einen längeren Zeitraum (bis zum Alter von 42 Wochen) beobachtet. Insulinspiegel wurden über diesen Beobachtungszeitraum nicht bestimmt. Die Frage, welchen Einfluss die unterschiedlichen Insulinspiegel während der Entwicklung des Typ 2-Diabetes auf die Matrixmetalloproteinasen haben, kann durch weitere in-vivo und in-vitro-Versuche geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihre natürlichen Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMPs), sind für den Auf- und Abbau verschiedener Kollagenformen zuständig und somit für viele physiologische und pathophysiologische Abläufe in der extrazellulären Matrix eminent wichtig. Dabei spielt gerade ihr Gleichgewicht eine entscheidende Rolle für deren Funktion in verschiedenen Körpergeweben, so auch im Herzgewebe. Durch eine veränderte Zusammensetzung der MMPs und TIMPs kommt es zu einer Umstrukturierung des Myokards, welche mit einem Funktionsverlust einhergeht. Für viele Formen von Kardiomyopathien wurde bereits gezeigt, dass bei den Erkrankungen veränderte Konzentrationen an MMPs und TIMPs gemessen werden, die einen erhöhten Umsatz der extrazellulären Matrix mit sich bringen. Auch im Rahmen einer Diabeteserkrankung kann sich eine sogenannte diabetische Kardiomyopathie entwickeln. Dass MMPs und TIMPs hierbei eine Rolle in der Pathophysiologie spielen, wurde für den Diabetes mellitus Typ 1 bereits gezeigt. Es fehlen jedoch bislang Untersuchungen zu diesem Krankheitsbild am Typ 2-diabetischen Myokard. Um die Rolle der MMPs und TIMPs sowie ihre Auswirkungen auf genau dieses Gewebe zu erforschen, wurde in dieser Arbeit das Myokard von an Typ 2-Diabetes erkrankten Ratten untersucht und mit demjenigen gesunder Ratten verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich zum einen mit zunehmendem Alter eine Fibrosierung des Myokards entwickelt, sowohl bei gesunden als auch bei diabetischen Tieren. Zum anderen kommt es aber mit fortschreitender Erkrankung am Typ 2-diabetischen Herzen zu einer sehr viel stärkeren Fibrosierung des Myokards als im gleichen Zeitraum an gesunden Rattenherzen. Untersucht man parallel zur Gewebezusammensetzung auch die Proteinkonzentrationen an MMP-2 und -9 sowie TIMP-1 so zeigt sich mit zunehmendem Alter beider Tiere eine Zunahme der MMPs bei gleichzeitig abnehmender TIMP-Konzentration. Dadurch wird deutlich, dass es durch die geänderte Zusammensetzung an MMPs und TIMPs zum Umbau des Myokards mit daraus folgender Fibrosierung kommt. Bei den diabetischen Tieren werden im Vergleich zur nichtdiabetischen Kontrolle geringere Proteinkonzentrationen an MMPs mit Fortschritt des Krankheitsbildes gemessen. Diese Verminderung führt dazu, dass nur noch bestimmte Kollagene abgebaut werden können und andere Kollagenformen im Myokard akkumulieren, so dass die starke Gewebsfibrose entsteht. Die Untersuchungen zeigen also, dass MMPs und TIMPs für die Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie im Rahmen des Typ 2-Diabetes mitverantwortlich sind.

Um zusätzlich herauszufinden auf welcher Expressionsebene die MMPs und TIMPs reguliert werden, wurde auch die mRNA-Konzentration eben dieser im Myokard der Tiere

gemessen. Hierbei zeigen sich nicht absolut signifikante Ergebnisse, so dass davon auszugehen ist, dass sowohl transkriptionelle als auch translationale Stimuli die Expression der MMPs und TIMPs beeinflussen.

Welche Mechanismen genau die Expressionsveränderung an MMPs und TIMPs im Myokard der Typ 2-diabetischen Tiere bewirken, ist noch unklar. Vermutlich spielen die geänderten Glucose- und Insulinspiegel im Rahmen der Diabeteserkrankung dabei eine wesentliche Rolle. Dieser Sachverhalt muss zunächst genauer untersucht werden, um daraus mögliche Therapieoptionen für die Behandlung der diabetischen Kardiomyopathie abzuleiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Aimes RT, Quigley JP: *Matrix Metalloproteinase-2 Is an Interstitial Collagenase*. J Biol Chem. 270: 5872-5876 (1995)
2. Alexiou P, Pegklidou.K., Chatzopoulou M, Nicolaou I, Demopoulos VJ.: *Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21(st) century*. Curr Med Chem. 16: 734-752 (2009)
3. Asbun J, Manso AM, Villarreal FJ: *Profibrotic influence on high glucose concentration on cardiac fibroblast functions: effects of losartan and vitamin E*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 288: 227-234 (2005)
4. Asbun J, Villarreal FJ: *The Pathogenesis of Myocardial Fibrosis in the Setting of Diabetic Cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol. 47: 693-700 (2006)
5. Ban CR, Twigg SM: *Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers*. Vascular Health and Risk Management. 4: 575-596 (2008)
6. Battle M, Pérez-Villa F, García-Pras E, Lázaro A, Orús J, Roqué M, Roig E: *Down-regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in the myocardium of congestive heart failure patients*. Transplant Proc. 39: 2344-2346 (2007)
7. Birkedal-Hansen, H: *Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases*. J Periodontol. 64: 474-484 (1993)
8. Boden G, Song W, Kresge K, Mozzoli M, Cheung P: *Effects of hyperinsulinemia on hepatic metalloproteinases and their tissue inhibitors*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295: E293-E297 (2008)
9. Bollano E, Omerovic E, Svensson H, Waagstein F, Fu M: *Cardiac remodeling rather than disturbed myocardial energy metabolism is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats*. Int J Cardiol. 114(2): 195-201 (2007)
10. Brown RD, Ambler S, Mitchell MD, Long CS, *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 45: 657-687 (2005)
11. Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M: *The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation*. J Biol Chem. 270: 801-805 (1995)
12. Clark JB, Palmer C, Shaw WN: *The diabetic Zucker fatty rat*. Proc Soc Exp Biol Med. 173: 68-75 (1983)
13. Coker ML, Thomas CV, Clair MJ, Hendrick JW, Krombach RS, Galis ZS, Spinale FG: *Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive*

- heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 274: 1516-1523 (1998)
14. Considine RV., Nyce MR, Allen LE, Morales LM, Triester S, Serrano J, Colberg J, Lanza-Jacoby S, Caro JF: *Protein Kinase C Is Increased in the Liver of Humans and Rats with Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus: An Alteration Not due to Hyperglycemia*. J. Clin. Invest. 35: 2938-2944 (1995)
 15. Cowell S, Knäuper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, López-Otín C, Reynolds JJ, Murphy G: *Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3*. Biochem J. 331: 453-458 (1998)
 16. Deschamps AM, Yarbrough W, Squires CE, Allen RA, McClister DM, Dowdy KB, McLean JE, Mingoia JT, Sample JA, Mukherjee R and Spinale FG: *Trafficking of the Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase in Ischemia and Reperfusion: Relation to Interstitial Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Activity*. Circulation. 111: 1166-1174 (2005)
 17. Di Micco R, Cicalese A, Fumagalli M, Dobрева M, Verrecchia A, Pelicci PG, di Fagagna F: *DNA damage response activation in mouse embryonic fibroblasts undergoing replicative senescence and following spontaneous immortalization*. Cell Cycle. 15: 3601-3606 (2008)
 18. Doering CW, Jalil J., Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, Weber KT: *Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy*. Cardiovasc Res. 22: 686-695 (1988)
 19. Eghbali M., Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO: *Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging*. Cardiovasc Res. 23: 723-729 (1989)
 20. Eghbali M, Weber K: *Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression*. Mol Cell Biochem. 96: 1-14 (1990)
 21. Fein FS: *Diabetic cardiomyopathy*. Diabetes Care. 13: 1169-1179 (1990)
 22. Fein FS, Sonnenblick E: *Diabetic cardiomyopathy*. Cardiovasc Drugs Ther. 8: 65-73 (1994)
 23. Forbes JM, Coughlan M, Cooper ME: *Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes*. Diabetes. 57: 1446-1454 (2008)
 24. Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griesse DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J: *Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats*. Cardiovasc Pathol. 13: 11-19 (2004)
 25. Fredersdorf S, Endemann DH, Luchner A, Heitzmann D, Ulucan C, Birner C,

- Schmid P, Stoelcker B, Resch M, Muders F, Riegger GA, Weil J: *Increased aldosterone levels in a model of type 2 diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 117(1): 15-20 (2009)
26. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S: *Activation of Progelatinase B (MMP-9) by Gelatinase A (MMP-2)*. Cancer Research. 55: 2548-2555 (1995)
27. García RA, Brown K, Pavelec RS, Go KV, Covell JW, Villarreal FJ: *Abnormal cardiac wall motion and early matrix metalloproteinase activity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 288: H1080-H1087 (2005)
28. Gealekmann O, Brodsky SV, Zhang F, Chander PN, Friedli C, Nasjletti A, Goligorsky MS: *Endothelial dysfunction as modifier of angionetic response in Zucker diabetic fat rat: amelioration with Ebselen*. Kidney int. 66: 2337-2347 (2004)
29. Gilbert RE, Connelly K, Kelly DJ, Pollock CA, Krum H: *Heart Failure and Nephropathy: Catastrophic and Interrelated Complications of Diabetes*. Clin J Am Soc Nephrol. 1: 193-208 (2006)
30. Gomez DE, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol. 74: 111-122 (1997)
31. Greten H, Rinninger F: Stoffwechsel, Glucosestoffwechsel. In: Greten H: *Innere Medizin: Verstehen - Lernen - Anwenden*. 10. Aufl., 604, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
32. Gunja-Smith Z, Morales A, Romanelli R, Woessner JF: *Remodeling of Human Myocardial Collagen in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy Role of Metalloproteinases and Pyridinoline Cross-Links*. Am J Pathol. 148: 1639-1648 (1996)
33. Hamacher S, Matern S, Roeb E: *Extracellular matrix - from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases*. Dtsch Med Wochenschr. 126: 1976-1980 (2004)
34. Herold, G: Endokrinologie, Diabetes mellitus. In: Herold, G: *Innere Medizin.*, 665, Herold 2008, Köln, 2008
35. Herpel E, Pritsch M, Koch A, Dengler TJ, Schirmacher P, Schnabel Ph A: *Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy*. Histopathology. 48: 736-747 (2006)
36. Howarth FC, Al Kitbi MK, Hameed RS, Adeghate E: *Pancreatic peptides in young and elderly Zucker type 2 diabetic fatty rats*. JOP. 12: 567-573 (2011)
37. Huang TH, Yang Q, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y:

- Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways.* J Cardiovasc Pharmacol. 46: 856-862 (2005)
38. Hunt CE, Lindsey J., Walkley SU: *Animal models of diabetes and obesity, including the PBB/Ld mouse.* Fed Proc. 35: 12061217 (1976)
39. Ikeda Y, Suehiro T, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K: *High glucose induces transactivation of the human paraoxonase 1 gene in hepatocytes.* Metabolism. 12: 1725-1732 (2008)
40. John A, Tuszynski G: *The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis.* Pathol Oncol Res. 7: 14-23 (2001)
41. Jun, Joon-Il, Lau F.Lester: *Cellular senescences controls fibrosis in woundhealing.* Aging 2: 627-631 (2010)
42. Kähäri VM, Saarialho-Kere U: *Matrix metalloproteinases in skin.* Exp Dermatol. 6: 199-213 (1997)
43. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ: *Kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzinsuffizienz und Cor pulmonale.* In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin, Band 1.* 16. Aufl., 1466, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005
44. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ, Powers AC: *Kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzinsuffizienz und Corpulmonale.* In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin, Band 2.,* 16. Aufl. 1466, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005
45. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ, Powers AC: *Endokrinologie, Diabetes mellitus.* In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin, Band 2.,* 16. Aufl. 2315, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2005
46. Khan ZA, Chakrabarti S: *Cellular Signaling and Potential New Treatment Targets in Diabetic Retinopathy.* Experimental Diabetes Research. 2007: 1-12, 2007
47. Kheradmand F, Rishi K, Werb Z: *Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2.* Journal of Cell Science. 115: 839-848 (2002)
48. Kim YS, Kim J, Kim CS, Sohn EJ, Lee YM, Jeong IH, Kim H, Jang DS, Kim JS: *KIOM-79, an Inhibitor of AGEs-Protein Cross-linking, Prevents Progression of Nephropathy in Zucker Diabetic Fatty Rats.* Evid Based Complement Alternat Med., 2009.
49. Koya D, King GL: *Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complications.* Diabetes. 47: 859-866 (1998)
50. Li Q, Sun SZ, Wang Y, Tian YJ, Liu MH: *The roles of MMP-2/TIMP-2 in*

- extracellular matrix remodelling in the hearts of STZ-induced diabetic rats. Acta Cardiol.* 62: 485-491 (2007)
51. Li YY, Feldmann AM, Sun Y, McTiernan CF: *Differential Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Failing Human Heart. Circulation.* 98: 1728-1734 (1998)
 52. Li YY, Kodakami T, Wang P, McTiernan CF, Feldman AM: *MMP inhibition modulates TNF- α transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282: 983-989 (2002)
 53. Livak KJ, Schmittgen TD: *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. Methods.* 25: 402-408 (2001)
 54. Löffler G, Montenarh M: Replikation und Gentechnik. In: Löffler G, Petrides PE: *Biochemie & Pathobiochemie.* 7. Aufl., 210, Springer-Verlag, Berlin, 2003
 55. MacKenna D, Summeraour S, Villarreal FJ: *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. Cardiovasc Res.* 46: 257-263 (2000)
 56. Malemud CJ: *Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosci.* 11: 1696-1701 (2006)
 57. Mason RM, Wahab NA: *Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol.* 14: 1358-1373 (2003)
 58. Matrisian LM: *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet.* 4: 121-125 (1990)
 59. McLennan SV, Wang XY, Moreno V, Yue DK, Twigg SM: *Connective Tissue Growth Factor Mediates High Glucose Effects on Matrix Degradation through Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Type 1: Implications for Diabetic Nephropathy. Endocrinology.* 145: 5646–5655 (2004)
 60. Meiners S, Hoher B, Weller A, Laule M, Stangl V, Guenther C, Godes M, Mrozikiewicz A, Baumann G, Stang K: *Downregulation of Matrix Metalloproteinases and Collagens and Suppression of Cardiac Fibrosis by Inhibition of the Proteasome. Hypertension* 44: 471-477 (2004)
 61. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, Ohmori K, Matsuo H: *Alteration in Left Ventricular Diastolic Filling and Accumulation of Myocardial Collagen at Insulin-Resistant Prediabetic Stage of a Type II Diabetic Rat Model. Circulation* 101: 899-907 (2000)
 62. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K: *Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7414-7419 (2002)
 63. Morita H, Khanal S, Rastogi S, Suzuki G, Imai M, Todor A, Sharov VG, Goldstein

- S, O'Neill TP, Sabbah HN: *Selective Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates the Progression of Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Dogs with Chronic Heart Failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006.
64. Mullis KB, Faloona FA: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol 155: 335-350 (1987)
65. Murphy G, Docherty AJ: *The matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Am J Respir Cell Mol Biol 7: 120-125 (1992)
66. Nagase H, Woessner F Jr: *Matrix Metalloproteinases*. The Journal of biological chemistry 274: 21491-21494 (1999)
67. Nam SM, Kim YN, Yoo DY, Yi SS, Kim W, Hwang IK, Seong JK, Yoon YS: *Hypothyroid states mitigate the diabetes-induced reduction of calbindin D-28k, calretinin, and parvalbumin immunoreactivity in type 2 diabetic rats*. Neurochem. Res. 37: 253-260 (2012)
68. Nam SM, Yi SS, Yoo KY, Park OK, Yan B, Song W, Won MH, Yoon YS, Seong JK: *Differential effects of treadmill exercise on cyclooxygenase-2 in the rat hippocampus at early and chronic stages of diabetes*. Lab Anim Res. 27: 189-195 (2011)
69. Nam SM, Hwang IK, Yi SS, Yoo KY, Park OK, Yan B, Song W, Won MH, Yoon YS, Seong JK.: *Differential effects of treadmill exercise on calretinin immunoreactivity in type 2 diabetic rats in early and chronic diabetic stages*. J Vet Med Sci. 73: 1037-1042 (2011)
70. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ: *Matrix metalloproteinases*. Br J Surg 84: 160-166 (1997)
71. Peterson RG: *Alpha-Glucosidase inhibitors in diabetes: lessons from animal studies*. Eur J Clin Invest 24: 11-18 (1994)
72. Rastogi S, Mishra S, Zacà V, Mika Y, Rousso B, Sabbah HN: *Effects of chronic therapy with cardiac contractility modulation electrical signals on cytoskeletal proteins and matrix metalloproteinases in dogs with heart failure*. Cardiology 110: 230-237 (2008)
73. Reaven P: *Metabolic syndrome*. J Insur Med 36 (2): 132-142 (2004)
74. Reinhardt D, Sigusch HH, Henbe J, Tyagi SC, Körfer R, Figulla HR: *Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP*. Heart 88: 525-530 (2002)
75. Remacle AG, Chekanov AV, Golubkov VS, Savinov AY, Rozanov DV, Strongin AY: *O-Glycosylation Regulates Autolysis of Cellular Membrane Type-1 Matrix*

- Metalloproteinase (MT1-MMP)*. The Journal Of Biological Chemistry 281: 16897–16905 (2006)
76. Renz-Polster H: Stoffwechsel, Diabetes mellitus. In: Braun J, Renz-Polster H: *Basislehrbuch Innere Medizin*. 2. Aufl., 768, Urban & Fischer Verlag, München, 2001
77. Resch M, Schmid P, Amann K, Fredersdorf S, Weil J, Schach C, Birner C, Griesse DP, Kreuzer P, Brunner S, Luchner A, Riegger GA, Endemann DH: *Eplerenone prevents salt-induced vascular stiffness in Zucker diabetic fatty rats: a preliminary report*. Cardiovasc Diabetol. 15: 9-25 (2011)
78. Resch M, Bergler T, Fredersdorf S, Griesse DP, Weil J, Kreuzer P, Brunner S, Riegger GA, Luchner A, Endemann DH: *Hyperaldosteronism and altered expression of an SGK1-dependent sodium transporter in ZDF rats leads to salt dependence of blood pressure*. Hypertens Res. 33: 1082-1088 (2010)
79. Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Nguyen VT, Swynghedauw B, Delcayre C: *Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart*. Lab Invest 76: 729-738 (1997)
80. Rodriguez WE, Tyagi N, Joshua IG, Passmore JC, Fleming JT, Falcone JC, Tyagi SC: *Pioglitazone Mitigates Renal Glomerular Vascular Changes in High-Fat High-Calorie Induced Type 2 Diabetes Mellitus*. Am J Physiol Renal Physiol (2006)
81. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T: *Activation of Matrix Metalloproteinases Precedes Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Heart Failure Rats: Its Inhibition as a Primary Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor*. Circulation 109: 2143-2149 (2004)
82. Saltiel AR, Kahn CR: *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature 414: 799-806 (2001)
83. Schaefer L, Han X, August C, Matzkies F, Lorenz T, Schaefer RM: *Differential regulation of glomerular gelatinase B (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in obese Zucker rats*. Diabetologia 40: 1035-1043 (1997)
84. Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bülbül Ö, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schömig A, May AE: *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells*. Circulation 113: 834-841 (2006)
85. Seltzer JL, Adams SA, Grant GA, Eisen AZ: *Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin*. J Biol Chem 256: 4662-4668 (1981)
86. Sensi M, Pricci F, Andreani D, Di Mario U: *Advanced nonenzymatic glycation*

- endproducts (AGE): their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications.* Diabetes Res 16: 1-9 (1991)
87. Simpson P: *Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response.* J Clin Invest 72: 732-738 (1983)
88. Siwik DA, Chang DL-F, Colucci WS: *Interleukin-1b and Tumor Necrosis Factor-a Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro.* Circ Res 86: 1259-1265 (2000)
89. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS: *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts.* Am J Physiol Cell Physiol 280: C53-C60 (2001)
90. Song WW, Ergul A: *Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression: Relation to vessel size.* Cardiovascular Diabetology (2006)
91. Sopata I, Wize J: *A latent gelatin specific proteinase of human leucocytes and its activation.* Biochim Biophys Acta 571: 305-312 (1979)
92. Spector KS: *Diabetic cardiomyopathy.* Clin Cardiol 21: 885-887 (1998)
93. Spinale FG: *Matrix Metalloproteinases: Regulation and Dysregulation in the Failing Heart.* Circ. Res 90: 520-530 (2002)
94. Spinale FG: *Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function.* Physiol Rev 87: 1285-1342 (2007)
95. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L: *Time-Dependent Changes in Matrix Metalloproteinase Activity and Expression During the Progression of Congestive Heart Failure: Relation to Ventricular and Myocyte Function.* Circ Res 82: 482-495 (1998)
96. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ: *A Matrix Metalloproteinase Induction/Activation System Exists in the Human Left Ventricular Myocardium and Is Upregulated in Heart Failure.* Circulation 102: 1944-1949 (2000)
97. Springman EB, Engleton EL, Birkedale-Hansen H, Van Wart HE: *Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 364-368 (1990)
98. Srinivasan V, Sandhya N, Sampathkumar R, Farooq S, Mohan V, Balasubramanyam M: *Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) gene expression and activity in patients with type 2 diabetes: inter-relationships with hyperglycaemia and oxidative stress.* Clin Biochem 40: 952-957 (2007)
99. Sternlicht MD, Werb Z: *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.*

- Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516 (2001)
100. Sugimoto K, Kojima K, Baba M, Yasujima M: *Olmесartan ameliorates peripheral nerve dysfunction in Zucker diabetic fatty rats*. J Hypertens. 29: 1337-1346 (2011)
 101. Sung PH, Sun C, Ko SF, Chang LT, Sheu JJ, Lee FY, Wu CJ, Chua S, Yip HK: *Impact of hyperglycemic control on left ventricular myocardium. A molecular and cellular basic study in a diabetic rat model*. Int Heart J 50: 191-206 (2009)
 102. Takami H, Burbelo PD, Fukuda K, Chang HS, Phillips SL, Yamada Y: *Molecular organization and gene regulation of type IV collagen*. Contrib Nephrol 107: 36-46 (1994)
 103. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, Spinale FG: *Increased Matrix Metalloproteinase Activity and Selective Upregulation in LV Myocardium From Patients With End-Stage Dilated Cardiomyopathy*. Circulation 97: 1708-1815 (1998)
 104. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ: *Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders?* Q J Med 95: 787-796 (2002)
 105. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Muñoz MC, Angerosa M, Dominici FP: *Long-term treatment with nebivolol attenuates renal damage in Zucker diabetic fatty rats*. J Hypertens. 29: 1613-1623 (2011)
 106. Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM, Takeda J, Stoffel M, Tang J, Sun X, Polonsky KS, Bell GI: *Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat*. Diabetes 44: 1447-1457 (1995)
 107. Tschoepe C, Walther T, Koeninger J, Spillmann F, Westermann D, Escher F, Pauschinger M, Pesquero JB, Bader M, Schultheiss HP, Noutsias M: *Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene*. Faseb J 18: 828-835 (2004)
 108. van den Brom CE, Bosmans JW, Vlasblom R, Handoko LM, Huisman MC, Lubberink M, Molthoff CF, Lammertsma AA, Ouwens MD, Diamant M, Boer C: *Diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats: the forgotten right ventricle*. Cardiovasc Diabetol. 15: 9-25 (2010)
 109. Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, Richter U, Fischer JW, Böhm M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C: *Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy*. Basic Res Cardiol 103: 319-327 (2008)

110. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H: *The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5578-5582 (1990)
111. Vavken P, Saad F, Murray MM: *Age dependence of expression of growth factor receptors in porcine ACL fibroblasts*. J Orthop Res. 28: 1107-1112 (2010)
112. Vempati P, Karagiannis ED, Popel AS: *A biochemical model of the matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition*. J Biol Chem (2007)
113. Visse R, Nagase H: *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry*. Circ. Res 92: 827-839 (2003)
114. Vora JP, Ziemsen SM, Houghton DC, Anderson S: *Evolution of Metabolic and Renal Changes in the ZDF/Drt-fa Rat Model of Type II Diabetes*. J. Am. Soc. Nephrol 7: 113-117 (1996)
115. Weber KT, Pick R, Janicki JS, Gadodia G, Lakier JB: *Inadequate collagen tethers in dilated cardiomyopathy*. Am Heart J 116: 1641-1646 (1988)
116. Westermann D, Rutschow S, Jaeger S, Linderer A, Anker S, Riad A, Unger T, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschoepe C: *Contributions of Inflammation and Cardiac Matrix Metalloproteinase Activity to Cardiac Failure in Diabetic Cardiomyopathy - The Role of Angiotensin Type 1 Receptor Antagonism*. Diabetes 56: 641-646 (2007)
117. Wilfingseder D, Stoiber H: *Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren*. Antibiotikamonitor 18 (2002)
118. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST: *Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart*. Cardiovasc Res 57: 388-394 (2003)
119. Zhang Y, Chen X, Wu D, Zhang X, Lü Y, Shi S, Yin Z.: *Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in aging of transgenic mouse liver*. Chin Med J 119: 504-509 (2006)
120. Zhou YT, Shimabukuro M, Lee Y, Koyama K, Higa M, Ferguson T, Unger RH: *Enhanced de novo lipogenesis in the leptin-unresponsive pancreatic islets of prediabetic Zucker diabetic fatty rats: role in the pathogenesis of lipotoxic diabetes*. Diabetes 47: 1904-1908 (1998)

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	DNA-Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphste
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemi Luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
Kb	Kilobase
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Ktr.	Kontrolle
L	Liter

LV	linker Ventrikel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mm	Milimeter
ml	Mililiter
µM	Mikromol/Liter
mM	Milimol/Liter
M	Mol/Liter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Na-Acetat	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Neg.	negativ
Neg.Ktr.	Negativ-Kontrolle
Orig.	Original
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der [H ₃ O ⁺]
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Standard
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit

UV	Ultraviolett
V	Volt
ZDF	Zucker diabetic fat
ZL	Zucker lean

7.2 Antikörper

Anti-Maus IgG, HRP-linked AK	Cell Signaling (USA)
GamPo,	Dianova GmbH (Hamburg)
Peroxidase-conjugated Affine Pure Goat	
Anti-mouse IgG	
MMP-2, Monoklonaler Maus-AK	Dianova GmbH (Hamburg)
MMP-9, Monoklonaler Maus-AK	Dianova GmbH (Hamburg)
Pecam-1 [CD31],	Millipore (Billerica, USA)
Monoklonaler Maus-AK	
Prolyl 4-Hydroxylase,	Millipore (Billerica, USA)
Monoklonaler Maus-AK	
Smooth Muscle Ab-1,	Dianova GmbH (Hamburg)
Monoklonaler Maus-AK	
TIMP-1, Monoklonaler Maus-AK	Dianova GmbH (Hamburg)

7.3 Primer

GAPDH F/R	Biotez Berlin-Buch GmbH (Berlin)
MMP2 Primer Set	Super Array Bioscience Corporation (Frederick, USA)
MMP9 Primer Set	Super Array Bioscience Corporation (Frederick, USA)
TIMP1 Primer Set	Super Array Bioscience Corporation (Frederick, USA)

7.4 Versuchstiere

Zucker-diabetic-fat Rat (ZDF-Ratte)	Charles River Laboratories (Sulzfeld, europäische Brutkolonie)
Zucker-lean Rat (ZL-Ratte)	Charles River Laboratories (Sulzfeld, europäische Brutkolonie)

7.5 Chemikalien

Aceton	Mallinkrodt Baker B.V. (Deventer, Holland)
Acrylamid/Bis-Lösung	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
AEC	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Agarose	Cambrex Bioscience (Rockland, USA)
APS	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Aqua ad iniectabile	Delta Select GmbH (Pfullingen)
Aquatex (Eindeckmedium)	Merck KGaA (Darmstadt)
Bam H I (Restriktionsendonuklease)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Bcc I (Restriktionsendonuklease)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
BSA	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Bio-Rad Dc Protein Assay	BioRad Laboratories (München)
Boric Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Cell Lysis Buffer 10X	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt)
Complete, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
DNA-Marker (pUC19 DNA/MspI)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
DNA-Ladder (Zip Ruler™ Express	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
DNA-Ladder 2)	
DNase II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
dNTP	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
DTT	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
ECL Plus	GE Healthcare (Amersham, UK)
(Western Blotting Detection System)	
Eco 31 I (Restriktionsendonuklease)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ethanol 100%	Apotheke UK S-H, Campus Lübeck
Ethidiumbromid	Amresco (USA)
Eukit (Eindeckmedium)	Merck KGaA (Darmstadt)

Formaldehyd	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Glycerin	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Glycin	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Haemalaun sauer nach Mayer	Chroma Waldeck GmbH & Co.KG (Münster)
HCL	Merck KGaA (Darmstadt)
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Hot Gold Star Taq Polymerase	Eurogentec® (Seraing, Belgien)
Isopropanol 100%	Apotheke UK S-H, Campus Lübeck
Insulin solution human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Na-Acetat	Merck KGaA (Darmstadt)
NaCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Orange G	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Paraffin	Merck KGaA (Darmstadt)
pd(N6)-Primer	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Protein-Standard (Precision Plus)	BioRad Laboratories (München)
5XPuffer (Reverse Transkription)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
qPCR™ Core Kit for Sybr Green I	Eurogentec SA (Seraing, Belgien)
RNA-Guard	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
RNA-Marker (Ribo Ruler RNA-Ladder, High Range)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RNA-Marker (0,24-9,5Kb RNA Ladder)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
SDS	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)

3x SDS Sample Buffer (Probenpuffer für Western Blot)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
Sirius Red F3B (Färbelösung)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
TEMED	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Tissue Tek (Gefriermedium für Kryoschnitte)	Sakura Finetek Germany GmbH (Heppenheim)
Tris HCL	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Trizma-Base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trizol® Reagent	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Tween 20	Serva GmbH (Heidelberg)
Weigert Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Xylol	Mallinkrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande)

7.6 Geräte und Software

Arbeitsbank (Hera Safe)	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Autoklav (KI.1.6)	Sterilisatoren GmbH (Bottrop)
CellF (Imaging Software for Life Science Microscopy)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)
Digitalwaage (Scout Pro)	Ohaus Waagen Vertriebs GmbH (Giessen)
Elektrophorese-/Blotkammer (Tank Transfer System, PufferTank mit Deckel, Gelhalterkassette, Elektrophoreseblotting-Modul)	Biorad (USA)
Gel-/Blotdokumentationsgerät	Biorad (USA)
Gelständer (für Western Blot)	Biorad (USA)
Gelwanne, Gelkammer (für Agarosegelelektrophorese)	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
Kryostat (Leica CM 3050S)	Leica (Nussloch)
Kühl- (6°C)/Gefrierschrank (-20°C)	Bosch (Stuttgart)
Magnetrührer (MR 3001)	Heidolph (Schwabach)

Mikrotom (Reichert-Jung HN40)	Reichert (Wien) Jung (Nussloch)
Mikrowelle	Siemens AG (München)
Mikroskop (IX70)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)
Mikroskop (Wilovert A)	Helmut Hund GmbH (Wetzlar)
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Karl Hecht KG (Sondheim)
PCR-Gerät (7900HT-Fast Real-Time PCR System)	Applied Biosystems (USA)
PCR-Platte (384 Multiply PCR-Platte)	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR-Folie (Chrystal QPCR-Folie)	Sarstedt (Nümbrecht)
pH –Meter (Microprocessor pH 3000)	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG (Eberstadt)
Quantity One Vers: 4.6.2 (1-D-Analysis Software)	Biorad (USA)
Rotator (SB2)	Stuart (USA)
Schaukel (Duomax 1030)	Heidolph (Schwabach)
Schweißgerät	Clatronic International GmbH (Kempen)
SDS Vers.: 2.2.2 (Sequence Detection System, Software)	Applied Biosystems (USA)
Thermomixer (5463)	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler (T Gradient)	Biometra (Göttingen)
Tiefkühlschrank, -80°C (HeraFreeze)	Thermo Electron Corporation (Langenselbold)
Transformator (Power Pac Basic)	Biorad (USA)
Ultra Turaxx	Ika Werke GmbH & Co.KG (Staufen)
Vortexer (MS1 Minishaker)	Ika Werke GmbH&Co.KG (Staufen)
Wärmeschrank	Haereus Holding GmbH (Hanau)
Zentrifuge (MC6 Centrifuge)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge (Micro Centrifuge SD 220VAC)	Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe)
Zentrifuge (Rotanta 460R9)	Andreas Hettich GmbH &Co KG (Tuttlingen)

Zentrifuge (Sigma 2K15)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Zentrifuge (Varifuge 3012)

Heraeus Holding GmbH (Hanau)

7.7 Puffer

Blot/Transferpuffer

25mM Tris Base (3,3g)

192mM Glycin (14,4g)

20% Methanol (200ml)

auf 1L mit bidest auffüllen

1 X Cell Lysis Puffer

100µl Cell Lysis Buffer 10 X

100µl complete, EDTA-free 10 X

10µl PMSF 100mM

auf 1ml mit bidest auffüllen

5 X Elektrophoresepuffer

125mM Tris Base (15g)

96mM Glycine (72,2g)

17,5mM SDS (5,0g)

alles in 1L bidest lösen (pH 8,3)

1 X Elektrophoresepuffer

200ml 5 X E-Puffer + 800ml bidest

Färbelösung für GamPo-Färbung

10ml 0,1M Na-Acetate pH 4,8

500µl AEC-Stammlösung

2µl H₂O₂

5% Magermilch

5g Magermilchpulver auf 100ml bidest

10 X MOPS-Puffer

0,2M MOPS (41,8g)

50mM Na-Acetate (4,10g)

10mM EDTA (3,72g)

alles in 1L bidest lösen

1 X MOPS-Puffer

100ml 10 X MOPS-Puffer + 900ml bidest

10 X PBS-T Puffer (Waschpuffer)

bei Peroxidase-Konjugation

80g NaCl

	11,5g Na_2HPO_4
	2g KCL
	2g KH_2PO_4
<i>Probenpuffer für RNA-Gel</i>	62,5% Formamid
	1,14M Formaldehyd
	1,25 X MOPS-Puffer
	200µg/ml Bromphenolblau
	200µg/ml Xylencyanol
	20% Glycerol
<i>Sammelgel, 5%ig</i>	1250µl Sammelgelpuffer
<i>(für 1Gel, 1mm dick)</i>	500µl Acrylamid/Bis-Lösung
	1750µl dH ₂ O
	5µl TEMED
	30µl APS10%ig
<i>Sammelgelpuffer</i>	0,5M Tris pH 6,8
	0,4% SDS
<i>5 X SDS Probenpuffer</i>	2,5ml 1M Tris/HCL pH 6,5
	4,0ml 10% SDS
	2,0ml Glycerin
	1,0ml 14M β-Mercaptoethanol
	200µl 10% Bromphenolblau
<i>10 X TBE-Puffer</i>	121,1g Tris
	51,3g Boric Acid
	3,7g EDTA
	alles in 1L bidest lösen
<i>10 X TBS-T Puffer (Waschpuffer)</i>	bei alkalisch-Phosphatase-Konjugaten
	80g NaCl

	12,1g Tris Base
	ad 900ml mit bidest auffüllen
	pH auf 7,3 mit HCL einstellen
1 X TBS-T (Waschpuffer)	100ml 10 X TBS-T + 500µl Tween 20
	auf 1L mit bidest auffüllen
<i>Trenngel, 7,5%ig</i>	1250µl Trenngelpuffer
<i>(für 1 Gel, 1mm dick)</i>	1250µl Acrylamid/Bis-Lösung
	2500µl dH2O
	5µl TEMED
	30µl APS10%ig
<i>Trenngelpuffer</i>	1,5M Tris pH 8,8
	0,4% SDS
<i>1 X Tris-/Glycin/SDS-Laufpuffer</i>	25mM Tris
	250mM Glycin
	pH 8,3
	0,1% SDS
<i>1,5M Tris HCL pH 8,8</i>	18,3g Tris Base in ca. 50ml bidest lösen
	pH 8,8 mit 1M HCL einstellen (ca. 3ml 25% HCL)
	auf 100ml mit bidest auffüllen
<i>0,5M Tris HCL pH 6,8</i>	6,0g Tris Base in ca. 50ml bidest lösen
	pH 6,8 mit 1M HCL einstellen (ca. 6ml 25% HCL)
	auf 100ml mit bidest auffüllen
<i>Waschlösung für GamPo-Färbung</i>	PBS
	0,5% Tween 20
	0,02% Gelatine

7.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Paul Mariefeld GmbH & Co.KG (Lauda-Königshofen)
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co (Japan)
Eppendorf-Gefäße (0,2ml; 0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen)
Glasgefäß (1l; 0,5l; 0,25l; 0,1l)	Schott Duran GmbH (Mainz)
Immobilion-P Transfer Membran (Blotmembran)	Millipore (USA)
Kryotubes	Nunc (Wiesbaden)
Objekträger (Super Frost Plus)	Menzel GmbH & Co.KG (Braunschweig)
Objekträgerkasten (nach Hellendahl)	Assistent, Karl Hecht KG (Sondheim)
Pasteurpipetten (Glas)	Assistent, Karl Hecht KG (Sondheim)
Pipetten (10µl; 100µl; 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (10µl; 100µl; 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Schale (feuchte Kammer)	O.Kohl (Ritterhude)
Tube (15ml; 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

7.9 Tierversuchsanträge

7.9.1 Tierversuchsantrag Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn
Tobias Graf
Medizinische Klinik II
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Ihre Anzeige vom: 17.10.2005

Mein Zeichen: V 362 – 72241.122-4

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7157

nachrichtlich:
Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

29. November 2005

Anzeige von Organentnahmen zu wissenschaftlichen Zwecken

Sehr geehrter Herr Graf,

gegen die Durchführung des geplanten Vorhabens „Bedeutung von Metalloproteinasen und deren gewebeständigen Inhibitoren bei Umbauprozessen der kardialen, extrazellulären Matrix im Rahmen des Diabetes mellitus Typ II in Zucker-Ratten“ unter Verwendung von bis zu 20 Ratten zur Organentnahme erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

Dr. Irmer

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 24106 Kiel | Leitungsbereich, Abteilungen: z. T. 1 - 4, 5, 6 | Telefax 0431 988-7239
Dienstgebäude Düsterbrookweg 104, 24105 Kiel | Abteilungen: z. T. 1, z. T. 2 und 4 | Telefax 0431 988-5172
Dienstgebäude Adolf-Westphal-Straße 4, 24143 Kiel | Abteilung: z. T. 3 | Telefax 0431 988-5246
Telefon 0431 988-0 | poststelle@mlur.landsh.de
www.landesregierung.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte Dokumente

7.9.2 Tierversuchsantrag Oberpfalz (Regensburg)

REGIERUNG DER OBERPFALZ	ABDRUCK	
Regierung der Oberpfalz · 93039 Regensburg		
 Universität Regensburg Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II Klinikum der Universität Herrn Univ.-Prof. Dr.med. E.P. Kromer Franz-Josef-Strauß-Allee 11 93042 Regensburg		
Direkt-E-Mail-Adresse: -		
Ihr Zeichen Ihre Nachricht vom 10.07.99	Bitte bei Antwort angeben Unser Aktenzeichen 621-2531.1-25-99	Telefon/Fax, Name (09 41) 56 80 - 642/699 Herr Friedl
	Zimmer-Nr. 255	Regensburg 13.10.1999
 Vollzug des Tierschutzgesetzes -TierSchG-; Genehmigung von Tierversuchen		
<u>Anlagen</u> 2 Abdrucke dieses Bescheids		
Die Regierung der Oberpfalz erläßt auf Antrag der Universität Regensburg, folgenden		
<u>Bescheid:</u>		
 1. Das nachfolgend beschriebene wissenschaftliche Versuchsvorhaben an lebenden Tieren wird genehmigt:		
Briefanschrift 93039 Regensburg	Hauptgebäude Emmeramsplatz 8	Telefon: (09 41) 56 80 - 0 Telefax: 56 80 - 1 99
Frachtschrift Emmeramsplatz 8 93047 Regensburg	weitere Dienstgebäude Ä1 = Ägidienplatz 1 Ä2 = Ägidienplatz 2 Äg = Ägidienang 2	Besuchszeiten Mo - Do: 8.30 - 12.00 Uhr 13.30 - 15.30 Uhr Freitag: 8.30 - 12.00 Uhr Nächste Bushaltestellen Ernst-Reuter-Platz Albertstraße Bismarckplatz
		Konten Zahlungen nur an die mitgeteilten Konten der Staatsoberkasse Regensburg

- 2 -

a) **Bezeichnung des Versuchsvorhabens:**

Einfluß der Insulinsubstitution beim experimentellen Diabetes mellitus auf die Expression extrazellulärer Matrixproteine bei druckinduzierter Hypertrophie des Myokards am Modell der experimentellen Aortenstenose der Ratte

Kurzbezeichnung: DM + AS + Insulin

b) **Leiter des Versuchsvorhabens:**

Herr Univ.-Prof. Dr.med. Eckhard Peter Kromer
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Klinikum der Universität

Stellvertreter:

Frau Sabine Fredersdorf
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Klinikum der Universität

c) **Tierart und Tierzahl:**

Ratten, insgesamt 180 Tiere

d) **Herkunft der Tiere:**

Charles River Wiga GmbH
Sanhofer Weg 7
97320 Sulzfeld 1

- 3 -

e) Ort der Versuchsdurchführung:

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität
Regensburg, Bau für Medizinische Forschung

f) Dauer des Versuchs:

2 Jahre

g) Verbleib der Tiere nach Versuchsende:

Tötung vor Erwachen aus der Narkose am Versuchsende

2. Die Genehmigung wird unter folgenden Auflagen erteilt:

a) Bei Komplikationen ist eine schmerzfreie Tötung oder eine Schmerzbehandlung durchzuführen.

b) Folgende Umstände oder Änderungen sind unverzüglich der Genehmigungsbehörde zu melden:

ba) der Wechsel des wissenschaftlichen Leiters oder seines Stellvertreters;

bb) die Verlegung des Tierversuchs an einen anderen Ort oder in andere Räume;

bc) alle sonstigen wesentlichen Änderungen der im Antrag dargestellten Sachverhalte

c) Die in diesem Bescheid genehmigte Tierzahl darf nicht ausgeschöpft werden, wenn bereits vorher verwertbare Ergebnisse vorliegen.

- 4 -

3. Die Regierung behält sich den Widerruf dieser Genehmigung vor, falls
 - a) der in § 1 TierSchG enthaltene Grundsatz verletzt wird,
 - b) fachlich nicht geschultes Personal mit der Durchführung des Versuchs betraut wird,
 - c) sonstige Vorschriften, insbesondere die §§ 9 und 9 a des Tierschutzgesetzes nicht eingehalten werden,
 - d) gegen eine der obengenannten Auflagen verstoßen wird.
4. Die Genehmigung gilt bis 31.10.2001.
5. Die Kosten des Genehmigungsverfahrens hat die Antragstellerin zu tragen. Für diesen Bescheid wird eine Gebühr in Höhe von 150,-- DM festgesetzt.
6. Die Auslagen betragen 93,22 DM.
7. Die Antragstellerin ist von der Zahlung der Kosten befreit.

Gründe:

Die Universität Regensburg hat am 10.07.1999 (eingegangen 22.07.1999) die Genehmigung eines Tierversuches mit Wirbeltieren gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG beantragt.

Die Regierung der Oberpfalz ist gemäß § 1 Abs. 2 der Verordnung zum Vollzug tierschutzrechtlicher Vorschriften für die Entscheidung über den Antrag zuständig.

- 5 -

Die Überprüfung des Antrags hat zu dem Ergebnis geführt, daß die Voraussetzungen für die Vornahme des Tierversuches nach § 7 Abs. 2 TierSchG vorliegen.

Die Genehmigung war gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz zu erteilen. Die Auflagen sind notwendig, um die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes zu gewährleisten.

Die Befristung der Genehmigung beruht auf § 8 Abs. 5 TierSchG. Sie kann auf formlosen, mit Gründen versehenen Antrag, um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

Für die Überwachung der Tierversuche nach § 16 Abs. 1 Nr. 3a TierSchG ist gemäß § 1 Abs. 1 der Verordnung zum Vollzug tierschutzrechtlicher Vorschriften die Stadt Regensburg zuständige Behörde.

Die Kostenfestsetzung beruht auf Art. 1 Abs. 1, 2 Abs. 1, 6, 8 und 13 KG.

Die Genehmigung ergeht gebührenfrei aufgrund Art. 4 Abs. 1 KG. Die Erstattung der Auslagen unterbleibt gemäß Nr. 2.2 der Verwaltungsvorschriften (VV-BayHO) i.V.m. Art. 61 der Bayerischen Haushaltsordnung (BayHO).

Hinweis:

Es wird darauf hingewiesen, daß nach § 11 Abs. 1 Satz 1a Tierschutzgesetz für das Halten von Wirbeltieren zu Versuchszwecken eine Erlaubnis erforderlich ist. Zuständige Behörde für die Erteilung der Erlaubnis ist die jeweilige Kreisverwaltungsbehörde.

- 6 -

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach seiner Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich oder zur Niederschrift bei der Regierung der Oberpfalz in Regensburg, Emmeramsplatz 8, einzulegen.

Sollte über den Widerspruch ohne zureichenden Grund in angemessener Frist sachlich nicht entschieden werden, so kann Klage beim Bayer. Verwaltungsgericht in Regensburg, Haidplatz 1, schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle dieses Gerichts erhoben werden. Die Klage kann nicht vor Ablauf von drei Monaten seit der Einlegung des Widerspruchs erhoben werden, außer wenn wegen besonderer Umstände des Falles eine kürzere Frist geboten ist.

Die Klage muß den Kläger, den Beklagten (Freistaat Bayern) und den Streitgegenstand bezeichnen und soll einen bestimmten Antrag enthalten. Die zur Begründung dienenden Tatsachen und Beweismittel sollen angegeben, der angefochtene Bescheid soll in Urschrift oder in Abschrift beigelegt werden. Der Klage und allen Schriftsätzen sollen Abschriften für die übrigen Beteiligten beigelegt werden.

I.A.

Dr. Regner-Hutter
Veterinärdirektorin

7.9.3 Bestätigung der gemeinsamen Tierhaltung



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Gemeinsame Tierhaltung Leiter: Dr. med. vet. R. Noël

Gemeinsame Tierhaltung der Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Tobias Graf
Medizinische Klinik II
Universitätsklinikum S-H Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Aktenzeichen (bei Schriftwechsel bitte angeben)

Bearbeiter(in)

Telefon / Fax: 0451-5002876/4193

Datum

Giesfeldt

07.12.2005

Anzeige vom 17.10.2005
Antrag vom

Sehr geehrter Herr Graf,

der genehmigte TV - Antrag:

"Bedeutung von Metalloproteinasen und deren gewebeständigen Inhibitoren bei
Umbauprozessen der kardialen, extrazellulären Matrix im Rahmen des Diabetes
Mellitus Typ II in Zucker-Ratten"

ist unter der Vers. Nr. 1/A31 /05 in der Gemeinsamen Tierhaltung registriert.
Es dürfen bis zu 20 Tiere bestellt werden.

Benutzen Sie bitte diese Vers.- Nr. bei den Tierbestellungen (Tel. 2876). Die Tierbestellungen
für die folgende Woche sind bis spätestens Freitag 11 Uhr an das Sekretariat (K. Giesfeldt)
durchzugeben. Bitte teilen Sie uns auch die Kostenstelle und den Fin. Schlüssel bei der Bestellung mit.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. R. Noël
Tierschutzbeauftragter
der Universität zu Lübeck

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Weil danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung und für die wertvollen Hinweise bei der Durchführung sowie der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert, Direktor der Medizinischen Klinik II (Kardiologie) der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei dem Betreuer meiner Arbeit, Dr. med. T. Graf, für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten und dem Verfassen dieser Arbeit. Die stets freundschaftlichen, motivierenden und immer konstruktiven Ratschläge haben maßgeblich Anteil am erfolgreichen Ausgang dieser Arbeit.

Besonderer Dank für die wertvolle Unterstützung bei der Arbeit im Labor gilt vor allem Karen Rieck und Maren Behrensen, sowie auch den anderen Mitarbeitern der molekularbiologischen sowie molekulargenetischen Forschungsgruppen der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck.

Meinen Eltern, meinen Schwestern und meiner Oma danke ich ganz besonders für die moralische, emotionale und auch finanzielle Unterstützung, durch welche diese Arbeit wie auch mein gesamtes Studium überhaupt erst möglich geworden sind.

Ein besonderer Dank gilt natürlich meinem Freund Florian, der immer für mich da war und mich in den schwierigen Stunden nicht nur begleitet hat, sondern auch immer gute Ratschläge und Lösungsvorschläge hatte. Ebenso ein Dankeschön an seine Mutter Elke für das Lesen und die konstruktive Kritik an meiner Arbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Karoline Hanke
Geb. am: 03.01.1984 in Lemgo
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Sprachen: Englisch, Französisch, Latein
Adresse: Lokstedter Weg 102
D-20251 Hamburg, Deutschland
Tel.: +49 40 34859868
E-Mail: karo.hanke@freenet.de

Schulbildung:

1990 –1994: Grundschule in Lemgo
1994-2003: Engelbert-Kaempfer-Gymnasium in Lemgo, Abschluss Abitur

Hochschulausbildung:

2003-2009: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2005: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2009: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.11.2009: Erteilen der Approbation als Ärztin

Dissertation:

2006 – jetzt: „Untersuchungen zum Einfluss von Matrixmetalloproteinasen (MMP) auf pathophysiologische Veränderungen am Herzen bei Diabetes mellitus Typ 2“ an der Medizinischen Klinik II (Kardiologie) der Universität zu Lübeck, Direktor Prof. Dr. med. H. Schunkert
2007: Posterpreis beim 1.Lübecker Doktorandentag

Berufliche Tätigkeit:

Seit 01.12.2009: Assistenzärztin an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Itzehoe, Chefarzt Dr.med. U. Heilenkötter

10. Publikationen

Abstract und Vortrag:

- Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2006:
Role of MMP-9/MMP-2/TIMP-1 in the development of cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats

T. Graf; K. Hanke; H. Sager; J. Weil.

Abstracts:

- AHA (American Heart Association) Scientific Sessions 2008:
Inhomogenous Regulation Of Matrix Metalloproteinases And Their Endogenous Inhibitors Intensifies Cardiac Fibrosis In Zucker Diabetic Fatty Rats

T. Graf; K. Hanke; H. Sager; S. Fredersdorf; C. Burgdorf; H. Schunkert; J. Weil.

- ISHR (International Society for Heart Research) World Congress 2010:
MMP-2/TIMP-1 expression correlates with the development of diabetic cardiomyopathy in Zucker Diabetic Fatty Rats

T. Graf; K. Hanke; S. Fredersdorf; H. Schunkert; J. Weil.

Posterpreis des Doktorandentages Lübeck 2007

- Untersuchungen zum Einfluss von Matrixmetalloproteinasen (MMP) auf pathophysiologische Veränderungen am Herzen bei Diabetes mellitus Typ 2 am Tiermodell (ZDF-Ratten)

K. Hanke, T. Graf, K. Witting, J. Weil