

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz-und Gefäßchirurgie
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Lange)

Expression und Interaktion der extrazellulären Matrixproteine – Remodeling bei kongenitaler biventrikulärer Myokardhypertrophie

Christina Anna Maria Eichinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. R. F. Bauernschmitt
2. Univ.-Prof. Dr. R. Lange

Die Dissertation wurde am 10.09.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Links-Rechts-Shunt und Herzhypertrophie	4
1.2	BNP als Biomarker bei kardialer Dysfunktion	6
1.3	Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	7
1.4	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)	9
1.5	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Tiermodell	12
2.1.1	Ablauf der Operation: intrauterine Anlage des aortopulmonalen Shunts beim Lammfeten	13
2.1.2	Ablauf der Operation: Hämodynamische Messungen bei den Versuchstieren und Probenentnahme	18
2.2	Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	22
2.3	Analyse auf mRNA-Ebene	22
2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	22
2.3.2	DNase-Behandlung von RNA	23
2.3.3	Konzentrationsmessung der RNA	23
2.3.4	RNA-Checkgel	23
2.3.5	Semiquantitative real-time RT-PCR	24
2.4	Analyse auf Proteinebene	28
2.4.1	Westernblot	28
2.4.1.1	Bearbeitung von Gewebeproben	28
2.4.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	29
2.4.1.3	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-Page) für den Westernblot	29
2.4.1.4	Westernblot Analyse	30
2.4.2	Zymographie	31
2.4.2.1	Proteinisolierung	31
2.4.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.4.2.3	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-	31

	Page) für die Zymographie	
2.4.2.4	Aktivitätsnachweis der Proteine	32
2.4.3	Reverse Zymographie	32
2.4.3.1	Proteinisolierung	32
2.4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.4.3.3	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS- Page) für die Reverse Zymographie	33
2.4.3.4	Aktivitätsnachweis der Proteine	33
2.5	Radioimmunassay	33
2.6	Auswertungen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Experimentelles Modell	35
3.1.1	Makroskopische Veränderungen der Muskelmasse	35
3.1.2	Hämodynamik	36
3.2	BNP-Plasmaspiegel	40
3.3	Analyse auf mRNA-Ebene	41
3.3.1	BNP-Expression	41
3.3.2	MMP-2 Expression	43
3.3.3	TIMP Expression	45
3.4	Analyse auf Proteinebene	46
3.4.1	Westernblot	46
3.4.1.1	MMP-2 Proteinexpression	47
3.4.1.2	TIMP-1 Proteinexpression	48
3.4.1.3	TIMP-4 Proteinexpression	49
3.4.2	Zymographie und Reverse Zymographie	51
3.4.2.1	MMP Aktivität	51
3.4.2.2	TIMP Aktivität	53
4	Diskussion	56
4.1	Intrauterine Anlage eines Aortopulmonalen Shunts: Hämodynamische Auswirkungen	57
4.2	Herzhypertrophie	59
4.3	BNP als Biomarker bei kardialer Dysfunktion	61

4.4	Expression von MMPs und ihren Inhibitoren TIMPs bei biventrikulärer Hypertrophie	64
4.5	Expression von MMPs und ihren Inhibitoren TIMPs bei kongenitaler biventrikulärer Hypertrophie im Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel	69
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Abkürzungsverzeichnis	80
8	Tabellen- u. Abbildungsverzeichnis	81
9	Anhang	84
10	Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Links-Rechts-Shunt und Herzhypertrophie

Links-Rechts-Shunts entstehen durch unphysiologische Verbindungen zwischen Körper- und Lungenkreislauf oder durch persistierende physiologisch angelegte embryonale Verbindungen. 55% aller angeborenen Herzfehler (z.B. Ventrikelseptumdefekt, Vorhofseptumdefekt, persistierender Ductus arteriosus) gehen mit einem Links-Rechts-Shunt einher. Der Fetalkreislauf zeichnet sich durch einen niedrigen Widerstand im Körperkreislauf und hohen Druck und Widerstand im Lungenkreislauf aus. Wegen des hohen Drucks im Lungenkreislauf besteht intrauterin ein Rechts-Links-Shunt über dem Ductus arteriosus. Nach der Geburt erhöht sich durch Abnabelung von der Plazenta der periphere Widerstand, so dass der systemische Blutdruck steigt. Lungenentfaltung und Anstieg des alveolären pO_2 erniedrigen den Widerstand im Lungenkreislauf, so dass sich die Lungendurchblutung erhöht und der Druck im Pulmonalkreislauf sinkt. Am Ductus arteriosus kommt es zur physiologischen Shuntumkehr. Dadurch schließt sich normalerweise bald nach der Geburt der Shunt. Bleibt die Verbindung offen, geht der ursprüngliche fetale Rechts-Links-Shunt in einen Links-Rechts-Shunt über, weil sich die Widerstände im pulmonalen und peripheren Kreislauf gegenläufig geändert haben.

Die Querschnittsfläche der Shuntöffnung und die Druckdifferenz zwischen den kurzgeschlossenen Gefäßräumen entscheiden über den Ausmaß des Shuntvolumens. Bei großem Shuntquerschnitt steigt das Shuntvolumen. Es addiert sich zum Auswurfvolumen des rechten Ventrikels, so dass die Lungendurchblutung und der Zustrom zum linken Herzen ansteigen. Zur Kompensation erhöht sich dessen Auswurf, doch besteht jetzt eine dauernde Volumenbelastung des rechten und linken Ventrikels. Unter diesen Umständen gleicht sich der Druck in der Pulmonalarterie dem der Aorta an und es entsteht für den rechten Ventrikel zusätzlich eine Druckbelastung. Diese Belastungen führen zu einer biventrikulären Herzhypertrophie.

Die myokardiale Hypertrophie ist ein Kompensationsmechanismus auf chronische Belastungszustände.

Pathophysiologisch lassen sich zwei Formen der myokardialen Hypertrophie unterscheiden: 1. konzentrische Herzhypertrophie durch Druckbelastung
2. exzentrische Herzhypertrophie durch Volumenbelastung.

Bei der konzentrischen Herzhypertrophie entsteht eine Herzwanddickenzunahme mit relativer Verkleinerung des Ventrikelraumes. Bei der Entwicklung der Myokardhypertrophie kommt es zunächst zu einer Zunahme des linksventrikulären systolischen Drucks, der zu einer Erhöhung der systolischen Wandspannung führt. Aus diesen Veränderungen resultiert eine Zunahme an Synthese von Sarkomeren in paralleler Anordnung, die sich an die bereits existierenden Myofibrillen anlagern (Wess and Cairns 2005 751-7). Mit der Vergrößerung der einzelnen Myozyten kommt es auch zu vermehrter RNA- und Proteinexpression (Yamazaki and Yazaki 2000 1-6).

Bei der exzentrischen Myokardhypertrophie kommt es durch die erhöhte Volumenbelastung zu einer Dilatation des Ventrikels mit nur geringgradiger Zunahme der Wanddicke. Durch die stetige Zunahme des diastolischen ventrikulären Füllungsdrucks entsteht eine Erhöhung der diastolischen Wandspannung. Diese Zunahme der Wandspannung führt zur vermehrten Dehnung der Sarkomere. Wie bei der konzentrischen Hypertrophie kommt es auch hier zu einer Zunahme der Ventrikelgröße und zu einer Zunahme der Synthese von parallel angeordneten Sarkomeren (Yamazaki and Yazaki 2000 1-6). Strukturelle Veränderungen im Myokard bei Hypertrophie werden als Remodeling bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden hämodynamische und molekularbiologische Veränderungen bei kongenitaler biventrikulärer Herzhypertrophie im Tiermodell untersucht. Die Hypertrophie wurde durch einen Links-Rechts-Shunt induziert, der durch intrauterine Anlage einer aortopulmonalen Verbindung im Fetus erzeugt wurde.

Unter der Hypothese, dass eine im Uterus geschaffene Verbindung zwischen Aorta und Pulmonalarterie in einem verzögerten Abfall des Lungenwiderstands nach der Geburt resultiert, konnten wir einen kongenitalen Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt realitätsgetreu simulieren. Das Herz wurde dadurch postpartum 21 Tage einer Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt, wobei der linke Ventrikel einer Volumenbelastung und der rechte Ventrikel einer Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt wurde. Die hämodynamischen und molekularbiologischen Veränderungen wurden mit einer Kontrollgruppe gleichaltriger gesunder Tiere verglichen, außerdem wurden die Unterschiede zwischen linkem und rechtem Ventrikel untersucht.

1.2 BNP als Biomarker bei kardialer Dysfunktion

Die vom Herzen gebildeten natriuretischen Peptide ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain natriuretic peptide) und CNP (c-type natriuretic peptide) sind aufgrund ihrer natriuretischen, diuretischen und vasodilatatorischen Effekte maßgeblich an der kardiopulmonalen und hämodynamischen Homöostase beteiligt (Orlowska-Baranowska 2008 598-605).

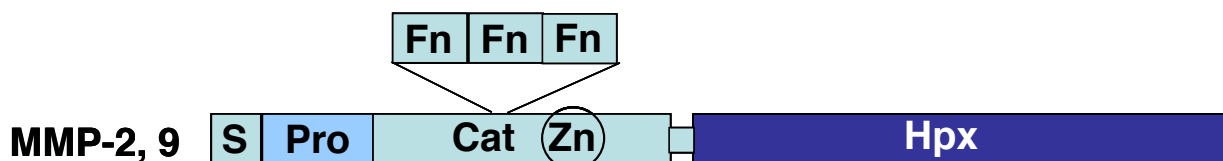
Alle drei natriuretischen Peptide bestehen aus einem Aminosäurering von 17 Aminosäuren. Davon sind 11 dieser 17 Aminosäuren bei allen drei Peptiden homolog. Der Hauptbildungsort von BNP ist das ventrikuläre Myokard (Cameron and Ellmers 2003 2191-4). Eine Erhöhung der BNP-Konzentration erfolgt entweder durch eine gesteigerte Syntheserate oder durch eine vermehrte Freisetzung aus den Speicherpools. Hauptsächlich mechanische Faktoren tragen zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion des natriuretischen Peptids bei.

Dabei spielt vor allem die Dehnung des Myokards eine entscheidende Rolle. Eine erhöhte Wandspannung bei Druck- oder Volumenbelastung des Ventrikels führt zu einer erhöhten Plasmakonzentration von BNP. Aus diesem Grund hat eine ventrikuläre Überbelastung und Hypertrophie vor allem einen Anstieg der BNP-Konzentration zur Folge. Studien konnten zeigen, dass der Hormonspiegel im Blut die klinischen und prognostischen Informationen der traditionellen Labormarker für Herzerkrankungen wertvoll ergänzt (Palazzuoli 2007 491-6).

Weiterhin konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass der BNP-Spiegel im fetalen Ventrikel stärker als im adulten Ventrikel ausgebildet ist (Scott and Jennes 1987 479-81; Wei 1987 1325-9). Der gesteigerte BNP-Spiegel bei Myokardhypertrophie ließe sich dann im Sinne einer Reaktivierung von fetaler Genexpression erklären (Day 1987 485-91).

1.3 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die kardiale extrazelluläre Matrix ist ein dynamisches Gebilde, dessen einzelne Komponenten einer schnellen Umwandlung durch veränderte Synthese von Matrixmolekülen sowie deren Degradation unterliegt. Die wahrscheinlich entscheidenden Prozesse, die zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix führen, werden durch die Matrixmetalloproteinasen vermittelt (Nagase 2006 562-73). Aufgrund ihrer gemeinsamen funktionellen und strukturellen Eigenschaften werden sie einer Subfamilie der Zinkmetalloproteinasen, auch Matrixine genannt, zugeordnet. Basierend auf ihrem strukturellen Aufbau und ihrer Substratspezifität werden sie in Gruppen eingeteilt: die Kollagenasen, die Gelatinasen, die Stromalysine, die Membrantyp-MMPs und andere. Die verschiedenen Synonyme sowie die Funktion und Größe der einzelnen MMPs werden in einer Tabelle dargestellt (s. Anhang, Tab. 1).



S Signalpeptidsequenz

Pro Propeptidomäne

Cat Katalytische Domäne

Hpx Hämopexin Domäne (gehört zur C Domäne)

Zn Zink

Fn Fibronektin

Abbildung 1: Domänenstruktur eines MMPs am Beispiel des MMP-2, -9.

Die MMPs zeichnen sich durch eine gemeinsame einheitliche Domänenstruktur aus (Abb. 1):

1. Signalpeptidsequenz; lokalisiert das Translationsprodukt auf dem endoplasmatischen Retikulum
2. Propeptiddomäne; wird für Enzymaktivität abgespaltet
3. katalytische Domäne; diese bindet das für die Aktivität der Proteinase benötigte Zinkatom
4. C-terminale Domäne; hier erfolgt die Komplexbildung der Proenzymform mit dem spezifischen Inhibitor

Die Gelatinasen besitzen eine fünfte Domäne, die Gelatine als Substrat bindet. Die meisten Matrixmetalloproteinasen werden als Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert und dort durch enzymatische Spaltung aktiviert. Die Balance der Abbau- und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix ist für die Erhaltung der Matrix limitierend. Eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung dieses Gleichgewichts spielen die MMPs, die sowohl sezerniert werden als auch membrangebunden auftreten (Nagase 2006 562-73).

Im Herzen erfolgt die Synthese der MMPs in allen dort vorhandenen Zellen, wie in Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen (Spinale 2002 520-30).

In vivo unterliegt die Expression und Aktivierung der MMPs einem strengen Kontrollmechanismus. Dieser wird auf verschiedenen Ebenen (Transkription, Translation, posttranslationale Aktivierung der Pro-Form und Interaktion mit ihren Inhibitoren, den Tissue Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP) (Fielitz 2004 809-20) reguliert.

Der Prozess des kardialen Remodelings, der bei verschiedenen Formen der Herzhypertrophie auftritt, wurde früher meist intrinsischen Veränderungen in den Kardiomyozyten zugeschrieben. Viele Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Veränderungen in der myokardialen extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle beim kardialen Remodeling spielen (Spinale 2002 520-30).

Wie bereits erwähnt hat sich gezeigt, dass die extrazelluläre Matrix des Myokards keine statische Struktur ist, sondern vielmehr ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbauprozessen der Matrixkomponenten darstellt. Diese Dynamik spielt eine fundamentale Rolle in der myokardialen Adaption von pathologischen Reizen (Volumen -und Druckbelastung).

Mit Zunahme der Belastung und der Umbauvorgänge kommt es zu einer Dekompensation und abnormalen Aktivität der MMPs mit Versagen der gegenregulatorischen Mechanismen (Boluyt and Bing 2000 239-249). In verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten MMP-Aktivität und dem myokardialen Remodeling der extrazellulären Matrix bei Knock-out-Mäusen festgestellt werden (Li 2000 214-24). Wenn die Umbauprozesse im Myokard so weit fortgeschritten sind, dass es zu einem Zusammenbruch der extrazellulären Matrix im Sinne eines Kontinuitätsverlust des Kollagengerüsts kommt, führt dies zu einer verminderten Ventrikelfunktion.

Dieses multifaktoriell gesteuerte System der matrixregulierenden Enzyme ist im Rahmen von kardialen Erkrankungen dysreguliert.

1.4 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs)

Die MMP-Aktivität wird von zwei Haupttypen der endogenen Inhibitoren reguliert: α_2 - Makroglobuline und TIMPs, wobei die MMP-Aktivität in flüssigen Medien verstärkt vom α_2 - Makroglobulin reguliert wird und im Extrazellulärraum von den TIMPs (Birkedal-Hansen 1993 197-250).

TIMPs sind spezifische Inhibitoren, die MMPs 1:1 stöchiometrisch binden. Dabei binden sich die TIMPs mit einer hohen Affinität an das aktive Zentrum der MMPs und hemmen so die Substratbindung der einzelnen MMPs (Mann and Spinale 1998 1699-702). Vier Subtypen von TIMPs wurden bis jetzt bei Vertebraten identifiziert (TIMP-1, -2, -3 und -4). Ihre Expression ist sowohl bei der Entwicklung wie auch im Gewebe-Remodeling reguliert. Änderungen der TIMP Aktivitäten sind entscheidend, da sie eine direkte Auswirkung auf die MMP-Aktivität haben (Visse

and Nagase 2003 827-39). Während im gesunden Organismus ein ständiges Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix herrscht, verschiebt sich das Gleichgewicht beim pathologischen Zustand, wie der Myokardhypertrophie in Richtung TIMPs. Eine vermehrte Expression von TIMPs führt zu einem verminderten Abbau der Matrix und damit zu einer Akkumulation der Matrix. Die Polypeptide besitzen eine Molekülmasse von 20-30 kDa, die in ihrer Aminosäuresequenz zu 40-50 % homolog sind (Yang 2003 227-37). Alle vier TIMPs zeichnen sich durch zwölf Cysteinreste aus, die durch Ausbildung von sechs Disulfidbrücken für die Tertiärstruktur wesentlich sind. Das mit den MMPs interagierende Ende ist für die Spezifität der MMP-Inhibition von Bedeutung (Gomez 1997 111-22).

Eine Schlüsselrolle in der Erhaltung des Gleichgewichts der extrazellulären Matrix nehmen TIMP-1 und TIMP-2 ein. Sie können alle bekannten MMPs mit Ausnahme des MT1-MMPs (MMP-14) binden und somit inaktivieren.

TIMP-3 nimmt in der Familie der TIMPs eine Sonderrolle ein, weil es nicht wie die anderen Inhibitoren frei in der extrazellulären Matrix vorkommt, sondern an bestimmte Strukturen der Matrix gebunden ist (Yu 2000 31226-32).

TIMP-4 ist ein Protein, welches ein hohes Expressionsniveau im Herzen aufweist (Mann and Spinale 1998 1699-702).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden kardiale Umbauvorgänge bei biventrikulärer Herzhypertrophie untersucht.

Der Bearbeitung des Themas ging die Etablierung einer reproduzierbaren biventrikulären Herzhypertrophie im Tiermodell voraus. Wir entschieden uns für die Simulation eines angeborenen Links-Rechts-Shunts und konsekutiver biventrikulärer Hypertrophie.

Folgende Fragestellung wurde dazu bearbeitet:

1. Welche hämodynamischen Veränderungen können nach Simulation eines kongenitalen Herzfehlers durch Anlage eines aortopulmonalen Shunts beobachtet werden?
2. Ist BNP, das als Marker für myokardialen Stress angesehen wird, bei der Entwicklung einer biventrikulären Hypertrophie als Folge eines angeborenen Links-Rechts-Shunt involviert?
3. Welche Veränderungen zeigen die extrazellulären Matrixproteine bei kongenitaler biventrikulärer Myokardhypertrophie auf verschiedenen Regulationsebenen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe?
4. Gibt es Unterschiede der MMP- bzw. TIMP-Expression zwischen dem linken und dem rechten Ventrikel?

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der extrazellulären Matrix auf molekularbiologischer Ebene bei kongenitaler biventrikulärer Hypertrophie untersucht. Dazu wurde in einem Tiermodell durch intrauterine Anlage eines aortopulmonalen Shunts (AP-Shunts) eine biventrikuläre Hypertrophie induziert. Als Versuchstiere wurden bayerische Bergschafe gewählt, die sich durch einfache Haltung und Toleranzbreite bei rezidivierenden chirurgischen Eingriffen auszeichnen.

Insgesamt wurden 14 klinisch gesunde, hochträchtige Schafe von Februar 2004 bis Juni 2005 im Institut für präklinische Forschung des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München operiert. Die Eingriffe erfolgten gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes. Der entsprechende Versuchsantrag wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 18.08.1986 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Nummer 9303).

Das Gewicht der trächtigen, erwachsenen Schafe betrug im Mittel 78 ± 2 kg. In einem ersten Schritt erfolgte ca. eine Woche vor der natürlichen Geburt die intrauterine Anlage eines AP-Shunts von 8mm Durchmesser bei einem der Feten. Die Nachbeobachtungszeit der Lämmer nach spontaner Geburt betrug 21 ± 2 Tage. Als Kontrolltiere dienten gesunde Lämmer, vorzugsweise das Zwillingstier, aber auch altersgleiche gesunde Tiere. Nach dieser Beobachtungszeit erfolgte unter Allgemeinanästhesie eine Operation der Kontroll- und Shunttiere zur Erfassung der hämodynamischen Daten.

Der Versuchsplan ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und den Versuchsablauf

	Kontrollgruppe (1) (n = 7)	Shuntgruppe (2) (n = 7)
t = ca.1 Woche vor der Geburt	nicht operiertes Zwillingsstier oder klinisch gesundes Lamm	Intrauterine Anlage eines aortopulmonalen Shunts
t = 0 Tage	Geburt	Geburt
t = 0 bis 21±2 Tage	Beobachtungszeitraum	Beobachtungszeitraum
t = 21±2 Tage	Allgemeinanästhesie Sternotomie Hämodynamische Messung Herzbiopsie Euthanasie	Allgemeinanästhesie Sternotomie Hämodynamische Messung Herzbiopsie Euthanasie

t = Zeitpunkt , n = Anzahl

2.1.1 Ablauf der Operation: intrauterine Anlage des aortopulmonalen Shunts beim Lammfeten

Der operative Eingriff erfolgte in Allgemeinanästhesie. Nach Prämedikation der hochträchtigen Mutterschafe mit Ketamin (15mg/kg KGW, i.m., Narketan®) erhielten die Tiere einen venösen Zugang über die Vena cephalica. Nach Applikation des Hypnotikums Propofol (2-4mg/kg KGW, i.v., Propofol 2% MCT Fresenius) wurde eine orotracheale Intubation durchgeführt. Das Muttertier wurde in Rückenlage auf den Operationstisch gelegt, die maschinelle Beatmung (Servo-Ventilator 900D, Siemens) angeschlossen und druckkontrolliert (IPPV) beatmet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran (2-2,3 V % Forene®). Das Fell wurde im ventralen Bereich des Abdomens geschoren, die Haut in diesem Bereich gewaschen und steril abgedeckt (Abb. 2). Zusätzlich wurde ein Lokalanästhetikum (Xylocain®, AstraZeneca) im Bereich des Hautschnitts subkutan injiziert. Intraoperativ wurde Ketamin (2mg/kg KGW, i.v., Narketan®) nach Bedarf verabreicht.

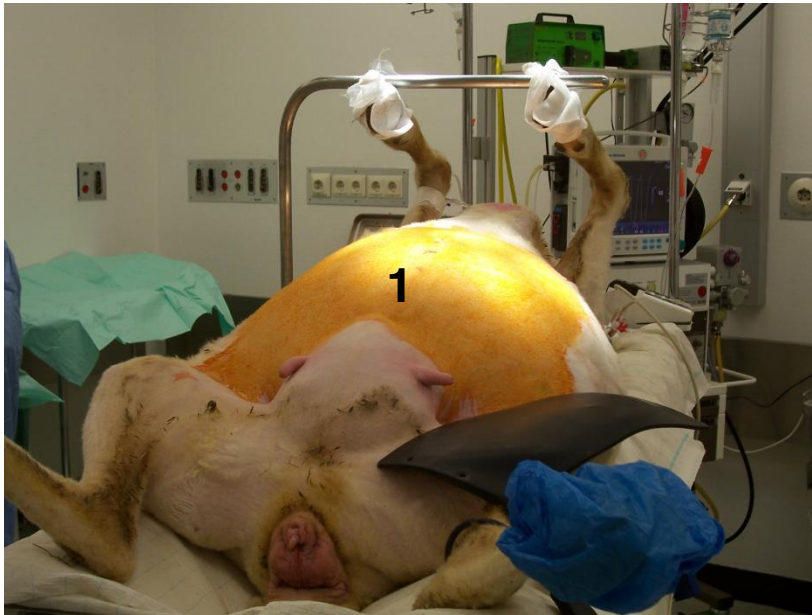


Abbildung 2: Muttertier in Rückenlage auf dem Operationstisch, Operationsgebiet (1) steril abgewaschen

Das perioperative Monitoring bestand aus Pulsoxymetrie und invasiver Blutdruckmessung.

Nach der Laparotomie entlang der Linea alba wurde mittels Palpation die Lokalisation des Kopfes und der Schultergliedmaßen eines der meist zwei Lämmer im Uterus bestimmt.

Nach Inzision des Uterus wurde die vordere linke Extremität und der Thorax des Lammes exponiert (Abb. 3+4).



Abbildung 3: Exposition des Lammfetens in der Fruchtblase

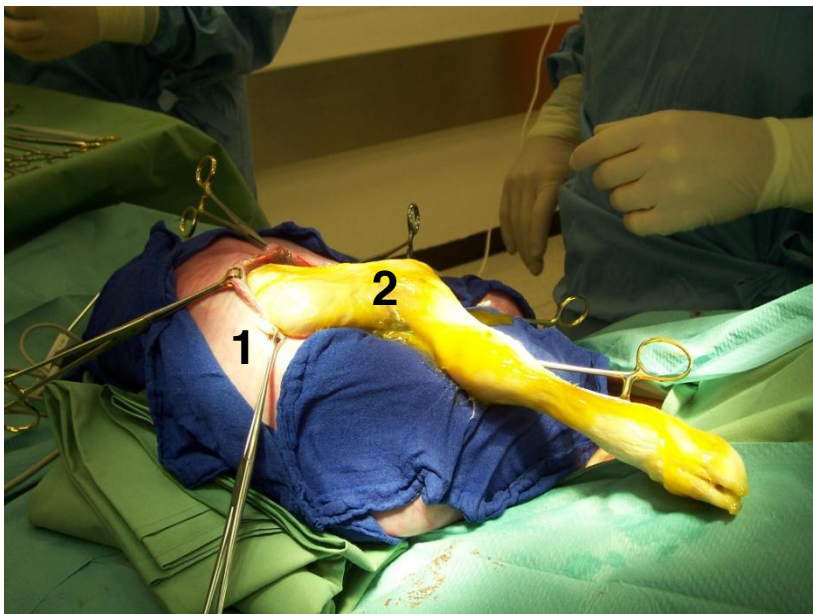


Abbildung 4: Eröffnete Fruchtblase (1), exponierte linke Extremität (2) des Lammfetens

Als Operationszugang zur AP-Shunt-Anlage beim Lammfeten wurde eine linkslaterale Thorakotomie im dritten Interkostalraum durchgeführt. Die Eröffnung des Perikards erfolgte entlang des pulmonalarteriellen Hauptstammes. An dieser Stelle wurden die Aorta und die *Arteria pulmonalis* freipräpariert und umschlungen (Abb. 5). Die Pulmonalarterie wurde partiell ausgeklemmt und inzidiert. Eine Polytetrafluoroethylen-Gefäßprothese (Goretex, Durchmesser 8mm, Länge 2mm) wurde mit fortlaufender Naht End-zu-Seit anastomosiert (Abb. 6). Nach dem

partiellen Ausklemmen der *Aorta ascendens* wurde in entsprechender Technik eine Anastomose mit dem anderen Ende der Prothese angefertigt (Abb. 7+8).

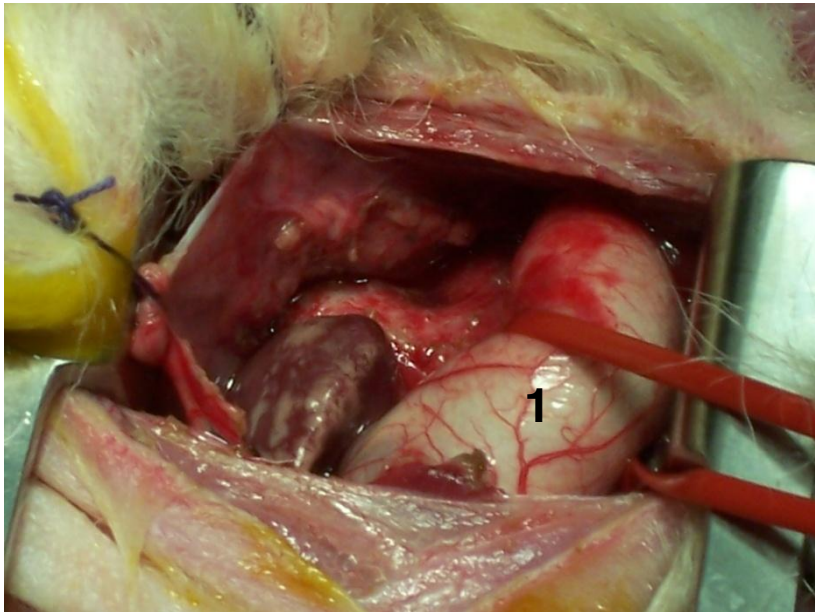


Abbildung 5: Blick auf die umschlungene *Aorta ascendens* (1) nach linkslateraler Thorakotomie

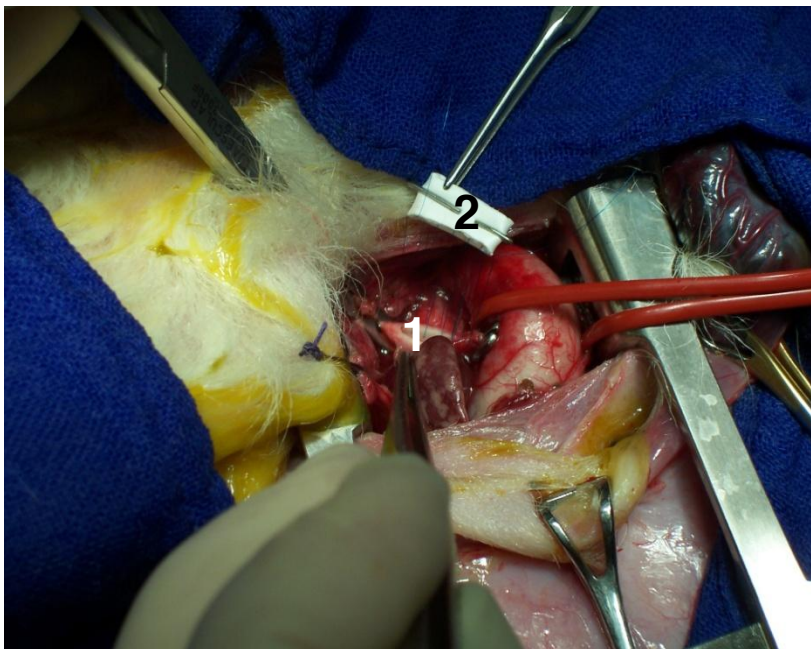


Abbildung 6: Partiiell ausgeklemmte Pulmonalarterie (1), 8mm Polytetrafluoroethylen Gefäßprothese (2) mit fortlaufender Naht End-zu-Seit anastomosiert

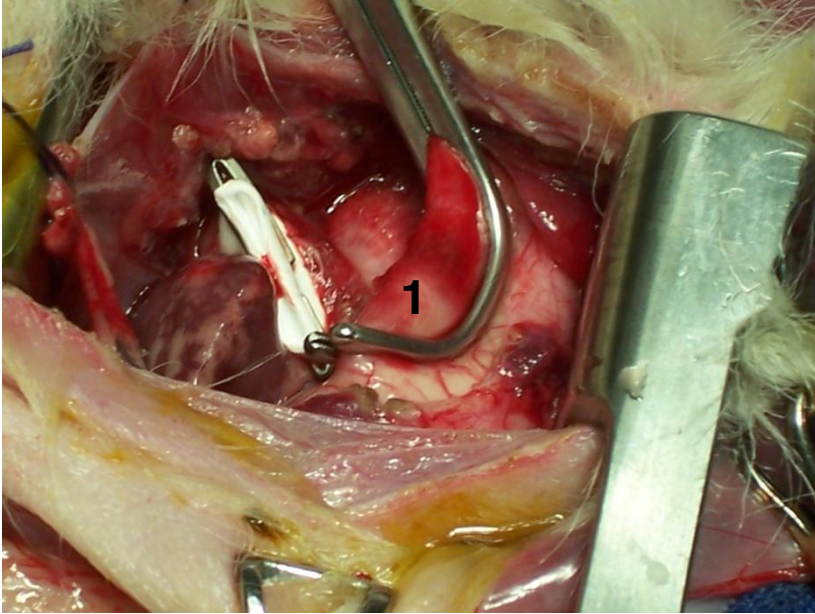


Abbildung 7: Partiiell ausgeklemmte *Aorta ascendens* (1)

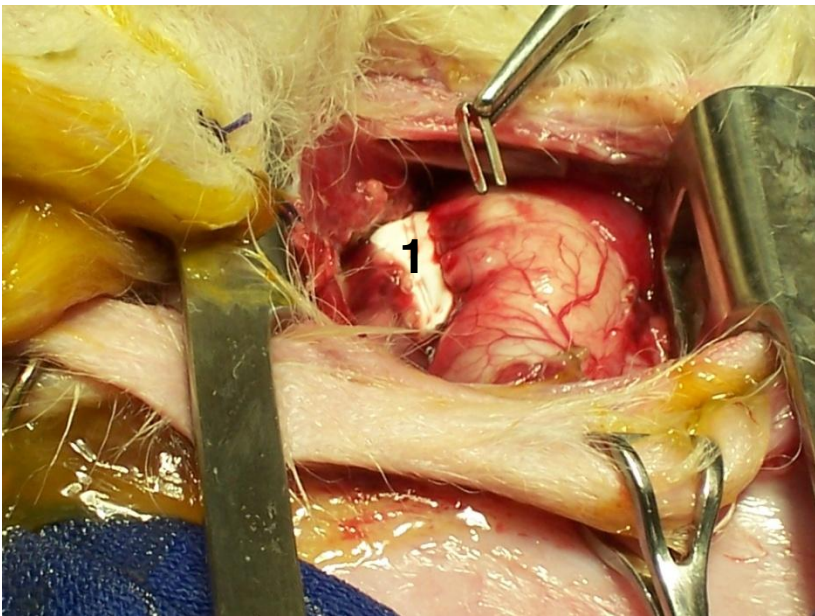


Abbildung 8: AP-Shunt (1)

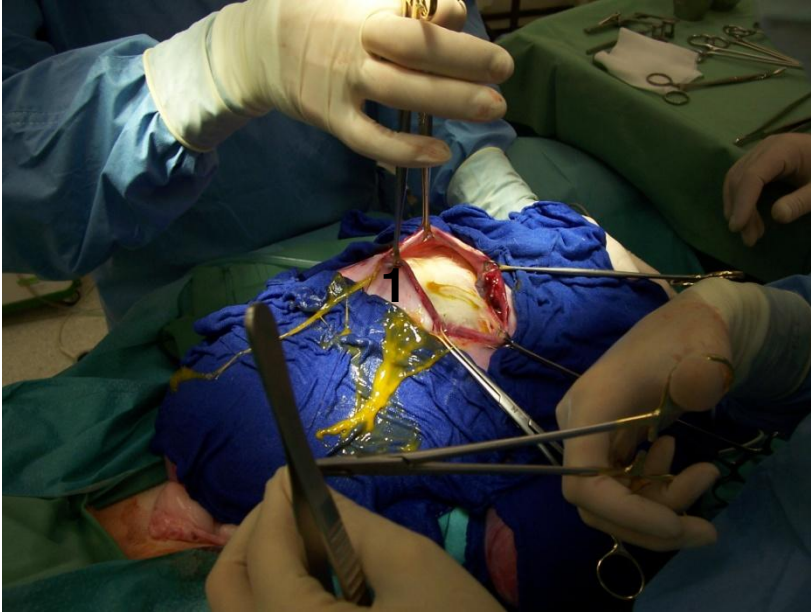


Abbildung 9: Verschluss der Fruchtblase (1)

Der Thorax wurde nach der Blutstillung verschlossen und die Fruchtblase mit Infusionslösung (Ringer-Lösung®) aufgefüllt, um die verloren gegangene Amnionflüssigkeit zu ersetzen. Der Verschluss des Abdomens wurde mit einer fortlaufenden Naht durchgeführt. Postoperativ wurden die Muttertiere mit Buprenorphin (0,005 mg/kg KGW, i.m., Temgesic®) zur Schmerztherapie einmal täglich über 2 Tage versorgt. Als antimikrobielle Prophylaxe erhielten die Tiere Penicillin (2 Millionen IE., i.m., Penicillin G®) und Gentamycin (80mg i.m., Gencin®). Nach Spontangeburt wurden die Lämmer im Untersuchungszeitraum (21±2 Tage) alle 3 Tage gewogen und ihre Atem- und Herzfrequenz dokumentiert.

2.1.2 Ablauf der Operation: Hämodynamische Messungen bei den Versuchstieren und Probenentnahme

Die Operation der 21±2 Tage alten Lämmer wurde unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die Tiere erhielten einen intraarteriellen Katheter zur invasiven Blutdruckmessung und einen venösen Infusionszugang. Die Narkose erfolgte mit Diazepam (0,2mg/kg KGW, i.v., Diazepam®), Ketamin (2mg/kg KGW, i.v., Narketan®) und Propofol (2-4mg/kg KGW, i.v., Propofol 1%, Fresenius®) (Abb. 10). Nach orotrachealer Intubation wurden die Tiere in Rückenlage im Bereich der Leiste,

der seitlichen Halsgegend und des gesamten Thorax rasiert und steril abgewaschen. Vor der Operation wurde den Lämmern zur BNP-Plasmaspiegel-Bestimmung Blut abgenommen. Als Operationszugang wurde eine mediane Sternotomie gewählt.

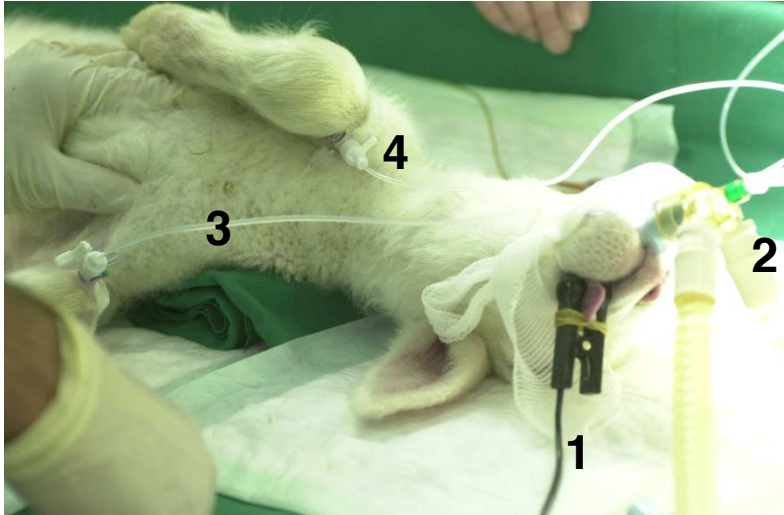


Abbildung 10: Präoperative Vorbereitung beim Lamm, Pulsoxymeter (1), Tubus (2), Venöser Katheter (3), Arterieller Katheter (4)

Durch Platzierung eines Katheters in der *Aorta descendens* über Punktion der *Arteria femoralis* war es möglich, die Herzfrequenz und den systemarteriellen Blutdruck kontinuierlich zu messen. Um eine kontinuierliche Messung des Drucks im rechten Vorhof zu ermöglichen, wurde über die *Vena jugularis externa* ein Katheter in den rechten Vorhof eingeführt. Durch Verschieben des Katheters in die Pulmonalarterie war es möglich den pulmonalarteriellen Druck zu messen. Zusätzlich wurde über eine 2mm Inzision im linken Vorhof der linksatriale Druck mittels Katheter gemessen. Der Fluss über der linken Pulmonalarterie wurde bei den Shunttieren distal der Gefäßprothese und bei den Kontrolltieren distal der obliterierten physiologischen aortopulmonalen Verbindungen (*Ductus arteriosus*) mittels Ultraschallsonde gemessen. Die hämodynamischen Messungen erfolgten im Anschluss an eine 30 minütige Erholungsphase nach vollständiger Instrumentierung (Abb. 11).

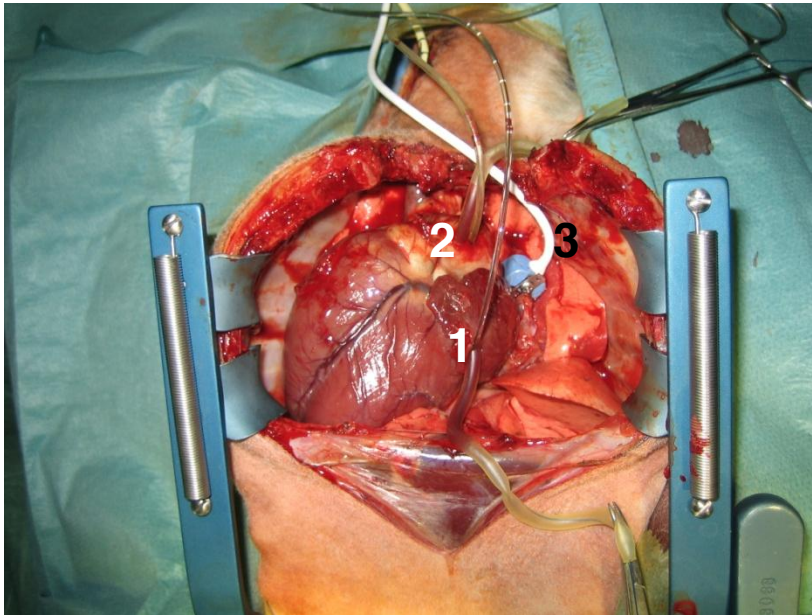


Abbildung 11: Intraoperative Situation: Häodynamische Messung, Katheter im linken Vorhof (1), Katheter in der Pulmonalarterie (2), Flusssonde um die linke Pulmonalarterie (3)

Zur Bestimmung des pulmonalarteriellen Flussverhältnisses wurden Blutproben aus dem rechten Ventrikel, der distalen Pulmonalarterie, dem linken Vorhof und der descendierenden Aorta entnommen und jeweils die Sauerstoffsättigung gemessen. Zur Quantifizierung des aortopulmonalen Shunts wurde der Qp:Qs mittels der Fickschen Formel berechnet.

$$\mathbf{Qp:Qs = (S O_2 SAB - S O_2 MVB) / (S O_2 PVB - S O_2 PAB)}$$

(S = Sättigung, SAB = systemisch arterielles Blut, MVB = gemischt-venöses Blut, PVB = pulmonal-venöses Blut, PAB = pulmonalarteriell Blut)

Nach Abschluss der Messungen erfolgte die Euthanasie der Tiere durch rasche Injektion von Kaliumchlorid. Danach wurde das Herz entnommen und der AP-Shunt auf Offenheit kontrolliert (Abb.12). Linker und rechter Ventrikel wurden nach der Beobachtungszeit von 21±2 Tagen getrennt gewogen. Die Herzgewichte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das Körpergewicht der Lämmer bezogen.

Nach Bestimmung des Gewichts von linken und rechten Ventrikel wurden Myokardproben beider Ventrikel asserviert.

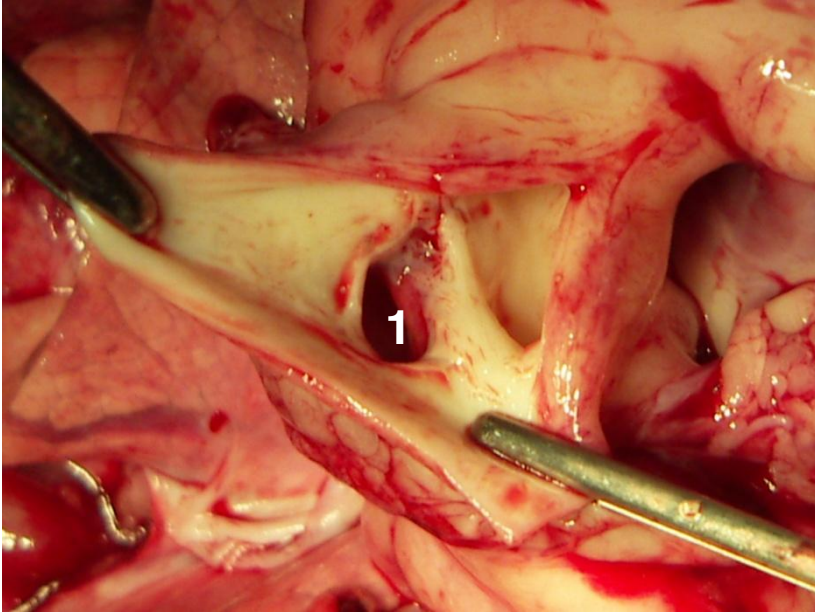


Abbildung 12: Längs inzidierte *Aorta Ascendens* mit Blick in den offenen Shunt (1)

2.2 Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

Die Reagenzien und die Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen werden im Anhang aufgeführt.

2.3 Analyse auf mRNA-Ebene

2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurde aus Mykardproben des linken und rechten Ventrikels die Gesamt-RNA isoliert. Dabei wurde die optimierte Guanidinisothiocyanat /Phenol-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) angewandt. Die Mykardproben wurden abgewogen und unter Verwendung von peqGold RNAPure (peqLab, Erlangen, D.) mit dem Ultraturrax (IKA Labortechnik T25 basik) homogenisiert. Als Reinigungsschritt wurden die Proben 10 Minuten bei 4° C und 14000 rpm (5417R Wesseling-Berzdorf Eppendorf®, Hamburg, D.) zentrifugiert und der klare Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Den Proben wurde pro eingesetzten Milliliter peqGold RNAPure 0,2ml Chloroform zugegeben und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend 5 Minuten bei 4° C und 14000 rpm zentrifugiert und dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Um die RNA-Präzipitation zu verbessern, wurde den Proben 1µl Glykogenlösung und pro eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure 0,5ml Isopropanol zugesetzt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Cups 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Isopropanol wurde abgezogen und das Pellet zweimal mit 1ml 75%igem Ethanol durch vortexen und anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 14000rpm und 4°C) gewaschen.

Die RNA wurde an der Luft getrocknet, in 50 µl Wasser gelöst und bei -75°C aufbewahrt.

2.3.2 DNase-Behandlung von RNA

Dieses Verfahren hat zum Ziel kontamierende DNA aus RNA-Präparationen zu entfernen und anschließend die zugegebene DNase und vorhandene divalente Kationen, welche die Amplifikation hemmen würden, aus der Probe zu entfernen. Es wurde das DNA-free Kit™ von Ambion verwendet.

Zu der RNA Probe wurde 10 % des 10x DNase-Puffers und 1 µl der DNase I (2units) gegeben, gemischt und bei 37° C für 25 Minuten inkubiert. Nach Resuspension des DNase-Inaktivierungsreagens wurden 10 % des RNA-Probevolumens zugegeben und der Ansatz für 2 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Um das DNase-Inaktivierungsreagenz zu pelletieren, wurden die Proben bei 10000 rpm und 4° C für 1 Minute zentrifugiert. Die RNA-Lösung wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt.

2.3.3 Konzentrationsmessung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde mittels zweier Verdünnungsstufen, welche mit Reinstwasser angefertigt wurden (1:50,1:25), gemessen. Der RNA-Gehalt der Probe wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Biophotometer (Eppendorf®, Hamburg, D.) bestimmt. Der Quotient zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Er lag bei allen Versuchen zwischen 1,7 und 2,0.

2.3.4 RNA-Checkgel

Für die Überprüfung isolierter RNA auf die Anwesenheit der 28S und 18S-RNA-Bande wurde ein Formaldehyd (5,55%)-Agarose (1,5%)-Gel angefertigt. Dazu wurden die Proben bei 65° C 15 Minuten denaturiert.

Nach der Elektrophorese (100V, 20 Minuten) wurde das Gel für 1 Stunde in Ethidiumbromid (0,5µg/ml) gelegt und über Nacht in Reinstwasser gewaschen und mittels Image Master VDS (GE-Healthcare, Freiburg, D.) fotografiert.

2.3.5 Semiquantitative real-time RT-PCR

Die Expressionsrate der mRNA von BNP, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 wurde durch semiquantitative one-step real time PCR untersucht. Die PCR wurde mit dem LightCycler 1,5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D.) und dem QuantiTect® SYBR® Green one-step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, D.) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug immer 20 µl. Bei jeder Reaktion wurde GAPDH als Referenzgen amplifiziert.

RT-PCR Ansatz:

Tabelle 8: Real time RT-PCR Ansatz

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
2xQuantiTect SYBR Green	10 µl	1x
QuantiTect RT Mix	0,2 µl	0,2 µl/Reaktion
Primer Forward	0,5 µl	0,25 pmol/µl
Primer Reward	0,5 µl	0,25 pmol/µl
Rnase-free water	7,3 µl	
BSA	0,5 µl	0,5 µl/µl
Template	1 µl	50 ng/Reaktion
Totales Volumen	20 µl	

Bei der one-step RT-PCR erfolgen die Reverse Transkription und die PCR nacheinander in demselben Reaktionsgefäß. Indem alle Reagenzien für beide Reaktionsabläufe zu Beginn zugegeben wurden, konnten potentielle Fehlerquellen, die durch häufiges pipettieren entstehen, minimiert werden. Zusätzlich wurde zum Ansatz BSA zugegeben, um unspezifische Signale abzufangen und die Bindung der RNA an die Glaskapillaren zu verhindern.

Im Folgenden soll das Prinzip der semiquantitativen real-time PCR kurz dargestellt werden:

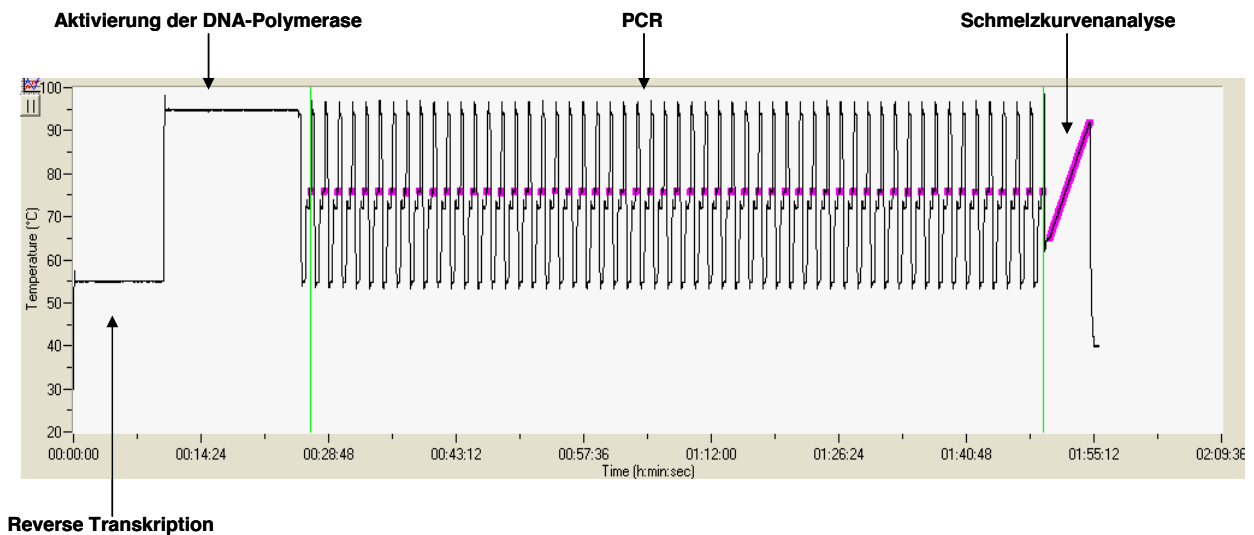


Abbildung 13: Ein fünf-Schritt-Laufprotokoll für die RT-PCR:

1. Reverse Transkription und Aktivierung der DNA-Polymerase
2. PCR (Denaturierung)
3. PCR (Annealing, Elongation)
4. Schmelzkurvenanalyse
5. Abkühlung

In einem ersten Schritt wurde die komplette mRNA bei 55° C mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Aktivierung der DNA-Polymerase wurde ein Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 95° C gemacht und dabei die Reverse Transkriptase deaktiviert. Folgendes Temperaturprofil schloss sich an:

Tabelle 9: Thermocyclereinstellungen für das One-Step RT-PCR Kit

Denaturierung	Annealing	Elongation	Meßtemperatur	Anzahl der Zyklen
94° C 15 Sekunden	55° C 20 Sekunden	72° C 20 Sekunden	78° C 5 Sekunden	45

Um eine genauere SYBR Green I Fluoreszenzmessung des Produktes zu erhalten, wurde nach jedem Amplifikationsschritt ein zusätzlicher Messpunkt eingeführt. Der Crossing Point (CP) wurde für jedes Transkript mittels der Second-Derivate-Maximum-Methode berechnet. Dabei wurde die LightCycler Software 3,5 (Roche Molecular Biochemicals) benutzt. Der Crossing Point (CP) wird definiert als die

Schwelle, bei der das Fluoreszenzsignal größer ist als das Hintergrundsignal (Abb. 14).

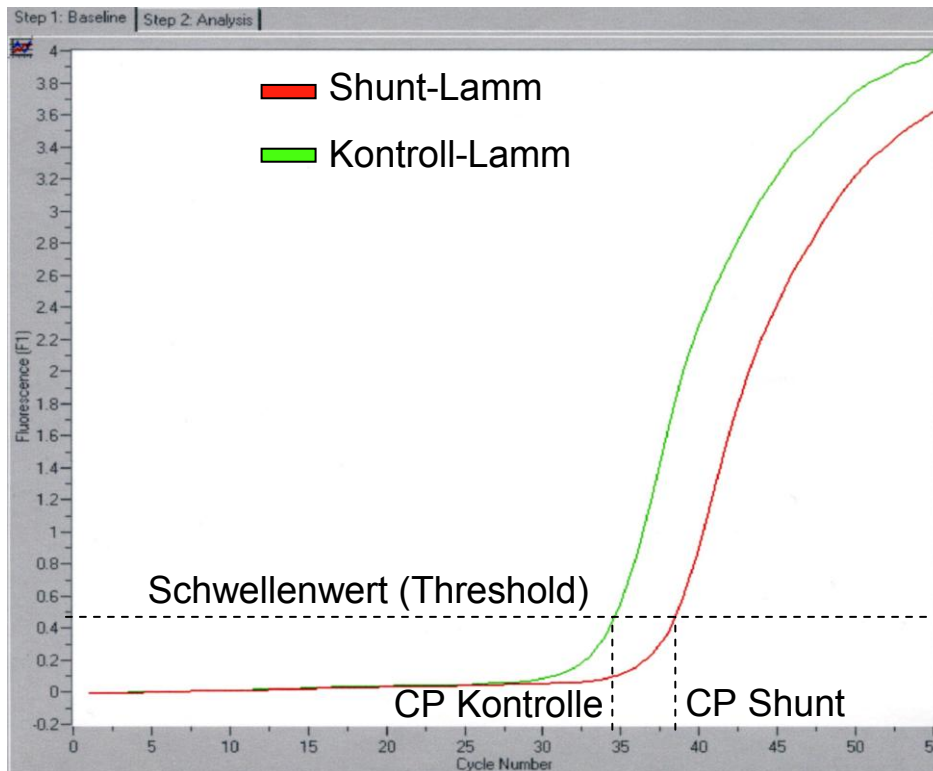


Abbildung 14: Phasen der PCR-Produktakkumulation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl, CP=Crossing Point

Die Berechnung der Expressionsdaten erfolgte mit der REST© Software (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>). Diese Software gibt die Effizienz (berechnet anhand der Standardkurve) für jedes Transkript des gesuchten Gens an. Gleichzeitig wird die relative Expressions-Ratio des gesuchten Gens (BNP, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) mittels der Formel

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}} \text{Zielgen(Kontrolle-Probe)} / (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}} \text{Referenzgen(Kontrolle-Probe)}$$

(Pfaffl MW Nucleic Acids Res 2001;29:2002-2007) berechnet. Aus dieser Formel geht hervor, dass sich die Expressions-Ratio des gesuchten Gens aus der real-time PCR-Effizienz (E), dem Crossing Point (CP) und der Differenz (Δ) aus dem gesuchten Gen versus dem Referenzgen bestimmen lässt. Die Expressionsänderungen zwischen dem zu untersuchenden Gen und dem

Referenzen wurden auf Signifikanzen mittels der Rest© Software untersucht (Pfaffl MW, Nucleic Acids Res 2002; 30:e36).

Vor der Quantifizierung der zu untersuchenden Probe (Housekeeping Gen GAPDH, BNP, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) wurden Eichkurven von Konzentrationen, die sich über 3-4 Zehnerpotenzen erstrecken, erstellt (Abb. 15). Diese Eichkurven wurden unter den gleichen Bedingungen (s. Tabelle 3) wie die Amplifikation der zu quantifizierenden mRNA, erstellt. Das Template, welches für die Erstellung der Eichkurve verwendet wurde, wurde aus einem Pool gewonnen, der alle zu untersuchenden Proben beinhaltet.

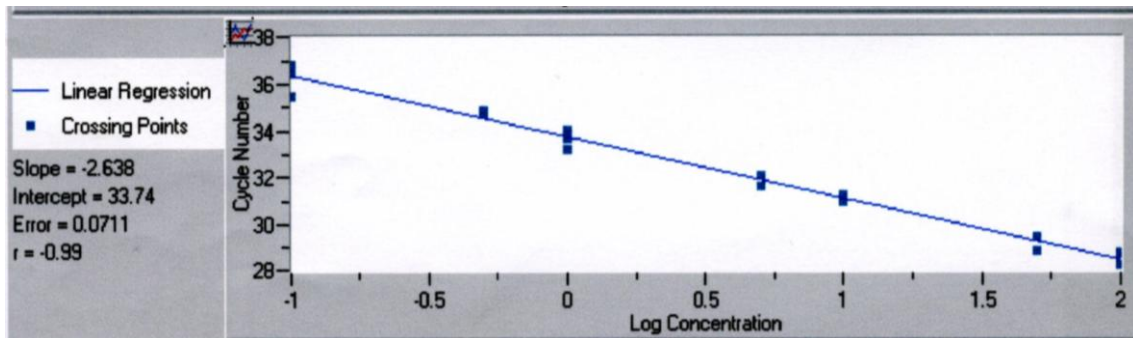


Abbildung 15: Eichkurve am Beispiel von GAPDH

Zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikate wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb.16). Diese Analyse ist von Roche© patentiert. Sie beruht darauf, dass jedes amplifizierte Produkt eine bestimmte Schmelztemperatur und Schmelzkurvenverlauf hat, welche sich in dem DNA-Basen-Gehalt (GC) und der Sequenz des Amplifikats begründet. Das PCR-Produkt wird durch die spezifische Schmelztemperatur bestimmt.

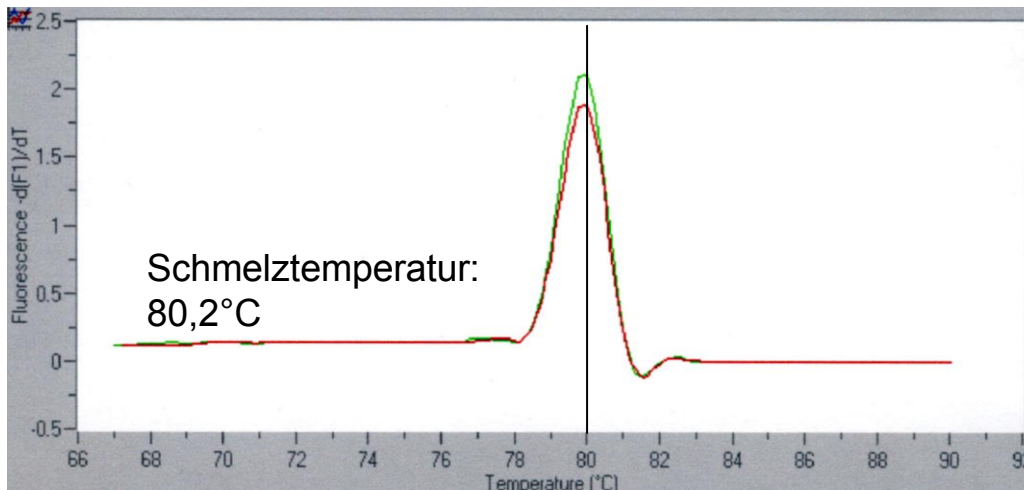


Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität des Produktes. Jedes Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur und Schmelzkurvenverlauf

Zusätzlich wurde zur Überprüfung der PCR-Produkte ein 2%iges Agarosegel angefertigt.

Die Auswertung erfolgte mit dem ImageMaster®VDS System und der ImageMaster® 1D Elite Software (Amersham-Pharmacia, Freiburg, D.).

2.4 Analyse auf Proteinebene

2.4.1 Westernblot

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik des Westernblots benutzt, um Proteinexpression der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren zu bestimmen.

2.4.1.1 Bearbeitung von Gewebeproben

Zur Proteinisolierung aus Myokard für den Westernblot wurde das Gewebe mit dem Ultra-turrax homogenisiert.

Nach Zugabe des RIPA Puffers mit dem darin enthaltenem Protease-Inhibitor-Cocktail wurde das Gewebe mit dem Ultraturrax unter Kühlung auf Eis homogenisiert.

Die Proben wurden in Eppendorf-Cups überführt und bei 4° C und 14000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und bis zur Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay auf Eis aufbewahrt.

2.4.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Von jeder Probe wurden zwei Verdünnungsstufen in RIPA Puffer hergestellt. Für den Testansatz wurden 10 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe (1:50, 1:25) entnommen und 300 µl Bradford-Reagenz zugesetzt. Nach 5 Minuten wurden die Küvetten im Photometer (Eppendorf, Hamburg, D.) bei 280 nm vermessen.

Eine Eichgerade wurde anhand einer Verdünnungsreihe mit BSA als Proteinstandard angelegt.

2.4.1.3 Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-Page) für den Westernblot

Für die Gelelektrophorese wurden 8%ige Polyacrylamidgele (Tabelle 4) verwendet. Die Proteinproben wurden mit Proteinsamplepuffer versetzt und 4 Minuten bei 95° C denaturiert. Als Proteinstandard wurde der MagicMark™ XP (Qiagen, Hilden, D.) verwendet.

Die SDS-Page erfolgte bei 120 V in 1x Laufpuffer (s.2.2.1) mit dem Mini Protean-3-Electrophoresis System (Biorad, München, D.)

Tabelle 10: Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für den Westernblot

Zymogramm-Trenngel (8%)	Zymogramm-Sammelgel(4%)
Reinstwasser	Reinstwasser
30% (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung	30% (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung
2,5 ml Trenngelpuffer	2,5 ml Sammelgelpuffer
50 µl 10% (w/v) <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat	50 µl 10% (w/v) <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
APS (Sigma)	APS (Sigma)
5 µl <u>T</u> etramethylethylenediamine	10 µl <u>T</u> etramethylethylenediamine

TEMED (Sigma)	TEMED (Sigma)
0,1 ml 10%(w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat	0,1 ml 10%(w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat
SDS	SDS

2.4.1.4 Westernblot Analyse

Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin (Towbin et al. 1979). Der Protein-Transfer aus den 0,75 mm dicken Gelen wurde in einer Mini Trans Blot Cell (Biorad, München, D.) in Blotpuffer für 1 Stunde bei 120V und 4° C durchgeführt.

Der Erfolg des Transfers konnte durch eine Färbung der Gele mit GelCode® (Pierce, Rockford, USA) kontrolliert werden.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in Blocking-Puffer (s.2.2.1) 1 Stunde geblockt, um die unspezifischen Bindungsstellen abzufangen. Primäre Antikörper und sekundäre Antikörper wurden in Blocking-Puffer verdünnt.

Die Membran wurde über Nacht bei 4° C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach der Entfernung des ersten Antikörpers wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für 3 Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Die Proteine auf der Membran wurden durch Chemiluminiszenz detektiert und mit Hilfe der Computersoftware (QuantaOne ® Biorad, München, D.) ausgewertet.

2.4.2 Zymographie

Die Zymographie dient dem Nachweis der Gelatinase-Aktivität der Matrixmetalloproteinasen im Gewebeisolat.

2.4.2.1 Proteinisolierung

Die Gewebeproben wurden in Proteinisolierungspuffer (s.2.2.2) auf Eis mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm und 4° C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt.

2.4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels zweier Verdünnungsstufen (1:25,1:50). Die Absorption der Proben wurden im Photometer (Eppendorf, München, D.) bei 280 nm gemessen. Anhand einer BSA-Eichkurve war es möglich die Proteinkonzentration zu bestimmen.

2.4.2.3 Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-Page) für die Zymographie

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels kontinuierlicher SDS-Page nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Es wurden 10%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 11: Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für die Zymographie

Zymogramm-Trenngel (10%)	Zymogramm-Sammelgel(4%)
Reinstwasser	Reinstwasser
30 % (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung	30 % (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung
2,5 ml Trenngelpuffer	2,5 ml Sammelgelpuffer
35 µl 10% (w/v) <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat	120 µl 10% (w/v) <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
APS (Sigma)	APS (Sigma)
5 µl <u>T</u> etramethylethylened <u>a</u> mine	26µl <u>T</u> etramethylethylened <u>a</u> mine
TEMED (Sigma)	TEMED (Sigma)

1 ml 10x Gelatine (porkin-SKIN; Sigma)	2,5 ml Sucrose-Lösung
2,5 ml Sucrose-Lösung	

Die Elektrophorese erfolgte bei 100V für 130 Minuten mit dem MiniProtean 3 Electrophoresis System (Biorad, München, D.)

2.4.2.4 Aktivitätsnachweis der Proteine

Nach zweimaligem Waschen (je 15 Minuten) in Renaturierungspuffer wurde das Gel 24h in Entwicklungspuffer bei 37° C gelagert, um einen ausreichenden Gelatine-Abbau zu erzielen. Durch die Färbung mit Coomasie-Blau-Färbelösung (3h) und anschließender Entfärbung in einer Entfärbelösung wurden Gelatineabbau-Banden sichtbar. Die pro-MMP9, pro-MMP2 und MMP-2 Banden wurden anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert und ihre Intensität mit Hilfe einer Image Master 1D Elite v 3.00 (Amersham, GE Healthcare, Freiburg, D.) Software bestimmt.

2.4.3 Reverse Zymographie

Bei der Reversen Zymographie wurde MMP-2 zusätzlich ins Gel eingebettet. Der Nachweis der Matrixmetalloproteinasen-Inhibitoren (TIMPs) basiert auf Bindungen der TIMPs mit den im Gel befindlichen MMPs.

2.4.3.1 Proteinisolierung

Das Gewebe wurde analog der Zymographie behandelt (s.2.4.2.1).

2.4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen wurden aus der Bestimmung bei den Zymographien übernommen.

2.4.3.3 Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-Page) für die

Reverse Zymographie

Die Elektrophorese wurde, wie unter Abschnitt 2.4.2.3 beschrieben, unter Verwendung eines 17%igen Gel 160 Minuten bei 200V durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 12: Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für die Reverse Zymographie

Zymogramm-Trenngel (17%)	Zymogramm-Sammelgel (5%)
4,2 ml Gelatinelösung (8,70mg in 1ml 1M Tris-HCL pH6,8)	1,33 ml (30%w/v) Acrylamid-Bis-Lösung
6,62 ml (30%w/v) Acrylamid-Bis-Lösung	1,55 ml 2M Tris-HCL pH 6,8
3,87 ml Wasser (Millipore Q-Gard3)	125 µl (10%w/v) SDS
0,29 ml (10%w/v) SDS (ResGen)	8,53 ml Wasser (Millipore Q-Gard3)
7,3 µl TEMED	10 µl TEMED
<u>T</u> etramethylethylenediamine (Sigma)	<u>T</u> etramethylethylenediamine (Sigma)
73 µl (10%w/v) APS	200 µl (10%w/v) APS
<u>A</u> mmoniumpersulfat (Sigma)	<u>A</u> mmoniumpersulfat (Sigma)

2.4.3.4 Aktivitätsnachweis der Proteine

Die Gele wurden, wie unter 2.4.2.4 beschrieben behandelt. Die beiden Methoden unterschieden sich in dem Aktivitätsnachweis nur in der Dauer der Färbung. Die Gele wurden bei den Reversen Zymographien 30 Minuten gefärbt.

2.5 Radioimmunassay

Die Bestimmung des BNP im Plasma wurde mittels dem RIA-Kit BNP-26 (Porcine, Ovine, Phoenix Europe, Karlsruhe, D.) durchgeführt.

Nach Herstellung einer Standardkurve war es möglich, die BNP-Konzentrationen zu ermitteln. Das Assay wurde nach Angabe des Herstellers (Phoenix Europe, Karlsruhe, D.) durchgeführt.

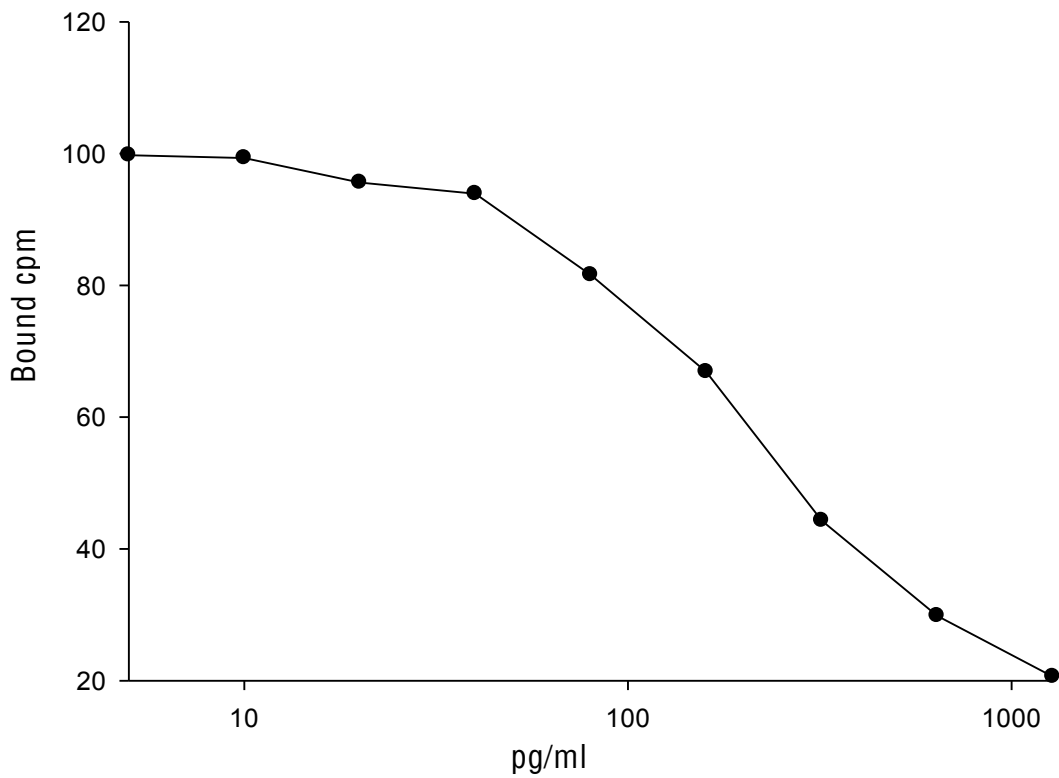


Abbildung 17: Standardkurve zur Bestimmung der BNP-Plasmakonzentration

2.6 Auwertungen

Die Statistik wurde mit SPSS 15.0 für Windows erstellt, wobei der Mann-Whitney-Test (2seitig) angewandt wurde. Die Grafiken wurden mit SigmaPlot 10.0 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Experimentelles Modell

3.1.1 Makroskopische Veränderungen der Muskelmasse

Vor Darstellung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse der Herzgewichte und der hämodynamischen Messungen besprochen.

Nach Anlage des AP-Shunts wurde bei allen Tieren der Gruppe (2) eine biventrikuläre Herzhypertrophie beobachtet. Das linksventrikuläre Gewicht bei den Shunttieren betrug im Mittel $5,9 \pm 0,5$ g/kg Körpergewicht. Dabei bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,000001$) zu der Kontrollgruppe (1), deren linksventrikuläres Gewicht bei $3,3 \pm 0,3$ g/kg Körpergewicht lag.

Auch das rechtsventrikuläre Herzgewicht ($2,1 \pm 0,1$ g/kg Körpergewicht) unterschied sich bei den Shunttieren signifikant ($p < 0,000001$) von den Tieren der Kontrollgruppe ($1,1 \pm 0,1$ g/kg Körpergewicht). Somit konnte nach der Beobachtungszeit eine relative Zunahme des linksventrikulären Gewichtes um 79% und des rechtsventrikulären Gewichtes um 91% beobachtet werden (Abb.18).

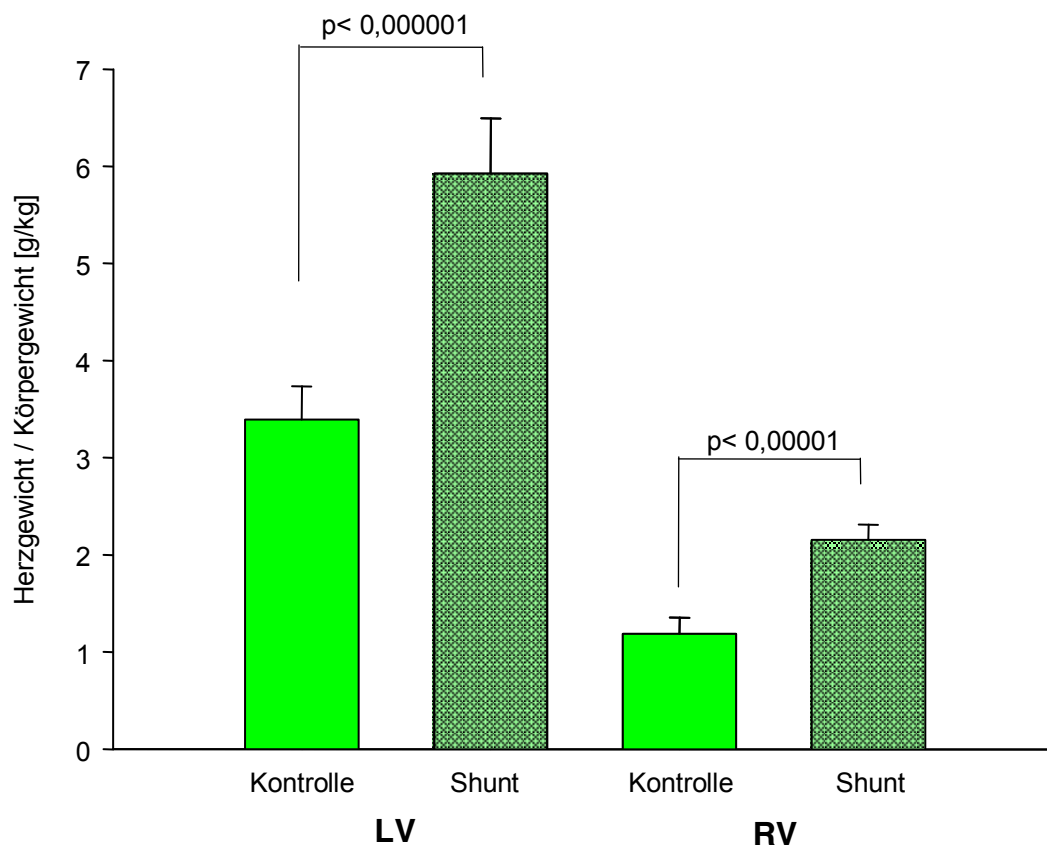


Abbildung 18: Vergleich der Mittelwerte der relativen Gewichte des linken und rechten Ventrikels

3.1.2 Hämodynamik

Im Alter von 21 ± 2 Tagen wurden bei den Shunt- und Kontrolltieren hämodynamische Messungen durchgeführt (Tabelle 13).

Das pulmonal-systemische Flussverhältnis ($Q_p:Q_s$) war bei den Shunttieren signifikant gegenüber den gleichaltrigen Kontrolltieren erhöht ($3,3 \pm 0,8$ vs. $1,08 \pm 0,0$, $p = 0,002$).

Weiterhin konnten wir als Ausdruck der pulmonalen Hypertonie eine statistisch signifikante Steigerung ($p = 0,02$) des Verhältnisses von pulmonalarteriellen Mitteldruck (PAP) zum systemarteriellen Mitteldruck (SAP) bei den Shunttieren zeigen. Im Mittel betrug das Verhältnis PAP:SAP bei den Shunttieren $0,47 \pm 0,1$ (Abb. 19).

Eine signifikante Abnahme des systemischen diastolischen Drucks ($p=0,002$) wurde bei den Shunttieren gegenüber den Kontrolltieren festgestellt. Er betrug im Mittel bei den Tieren mit AP-Shunt $27,10 \pm 7,08$ mmHg (Abb. 20).

Sowohl der linke als auch der rechte Vorhofdruck war bei den Shunttieren erhöht. Diese Druckzunahme war statistisch nicht signifikant (Tabelle 13).

Der Fluss in der linken Pulmonalarterie betrug im Mittel $1133,95 \pm 366,05$ ml/min bei den Shunttieren und war signifikant ($p=0,013$) erhöht gegenüber den Kontrolltieren. Bezieht man den Fluss der Pulmonalarterie auf das Körpergewicht der Tiere, so konnte man auch hier eine signifikante Steigerung des pulmonalen Blutfluss bei den Shunttieren gegenüber den Kontrolltieren sehen ($p=0,01$).

Der berechnete pulmonale Widerstand unterschied sich von den Kontrolltieren nicht signifikant (Tabelle 13).

Tabelle 13: Hämodynamische Daten

Gruppen	Kontrollgruppe (1) (n = 7)	Shuntgruppe (2) (n = 7)
Alter (Tage)	20,2±1,7	20,4±1,7
Gewicht (kg)	11,4±2,6	10,7±2,5
LV/KG (g/kg)	3,3±0,3	5,9±0,5*
RV/KG (g/kg)	1,1±0,1	2,1±0,1*
mLAP (mmHg)	5,94±5,28	6,81±2,38
mRAP (mmHg)	2,90±1,39	4,11±1,85
mPAP (mmHg)	16,6±6,5	23,6±6,2
mSAP (mmHg)	55,8±5,5	50,5±10,0
sSAP (mmHg)	72,5±10,2	85,9±20,2
dSAP (mmHg)	45,1±6,2	27,1±7,0*
PAP: SAP	0,29±0,1	0,47±0,1*
MV (ml/min)	567,1±286,8	1133,9±366,0*
MV/KG (ml/min/KG)	46,23±16,8	108,3±28,9*
PVR (dyn x s x cm⁻⁵ x m²)	0,26±0,21	0,16±0,06
SVR (dyn x s x cm⁻⁵ x m²)	0,59±0,3	0,62±0,31
Qp:Qs	1,08±0,0	3,33±0,8*

Werte angegeben als Mittelwerte±Standardabweichung; LV/KG, linksventrikuläres Gewicht bezogen auf das Körpergewicht; RV/KG rechtsventrikuläres Gewicht bezogen auf das Körpergewicht; mLAP, mittlerer linker Vorhofdruck; mRAP, mittlerer rechter Vorhofdruck; mPAP, mittlerer pulmonalarterieller Druck; mSAP, mittlerer systemarterieller Druck; sSAP, systolischer systemarterieller Druck; dSAP, diastolisch systemarterieller Druck; PAP:SAP, Verhältnis von pulmonalarteriellen Mitteldruck zum systemarteriellen Mitteldruck; MV, Minutevolumen in der linken Pulmonalarterie; MV/KG, Fluss in der linken Pulmonalarterie bezogen auf das Körpergewicht; PVR, pulmonalarterieller Widerstand; SVR, systemarterieller Widerstand, Qp:Qs, pulmonal-systemisches Flussverhältnis; *= signifikant, p<0,05

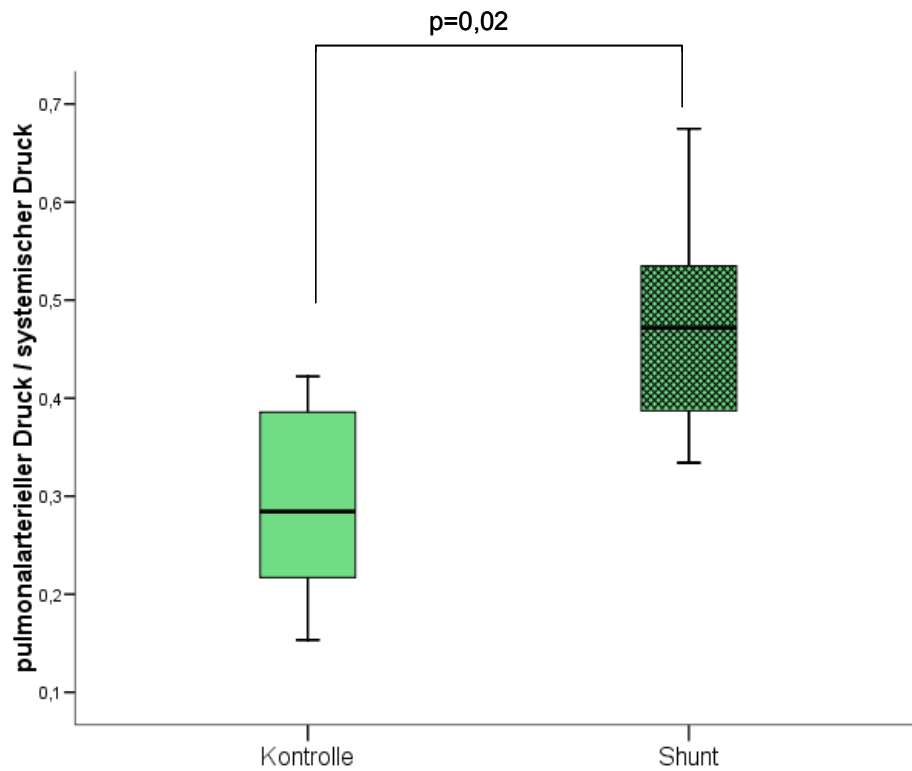


Abbildung 19: Verhältnis von pulmonalarteriellen Mitteldruck (PAP) zu systemarteriellen Mitteldruck (SAP)

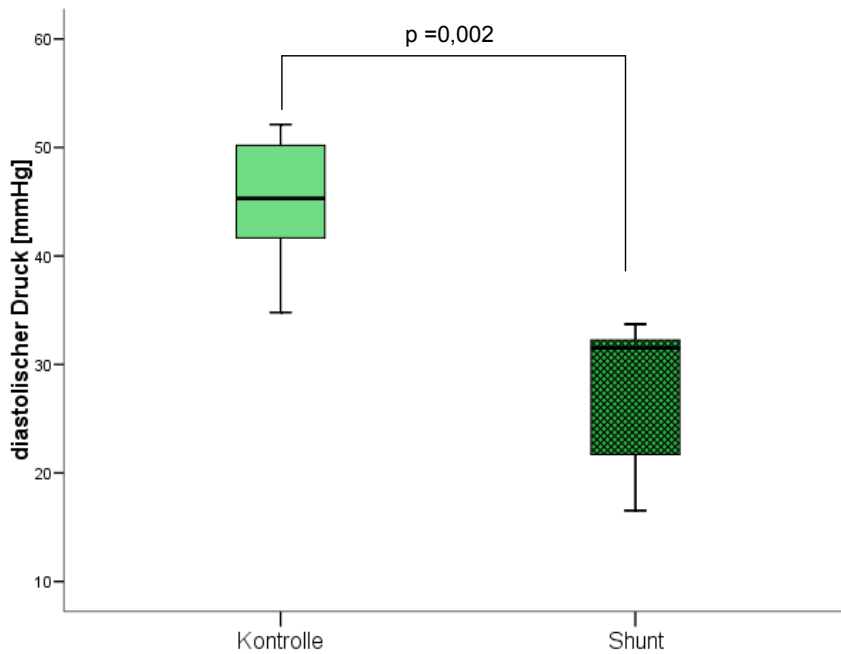


Abbildung 20: Vergleich der systemischen diastolischen Drücke von Kontroll- und Shunttieren

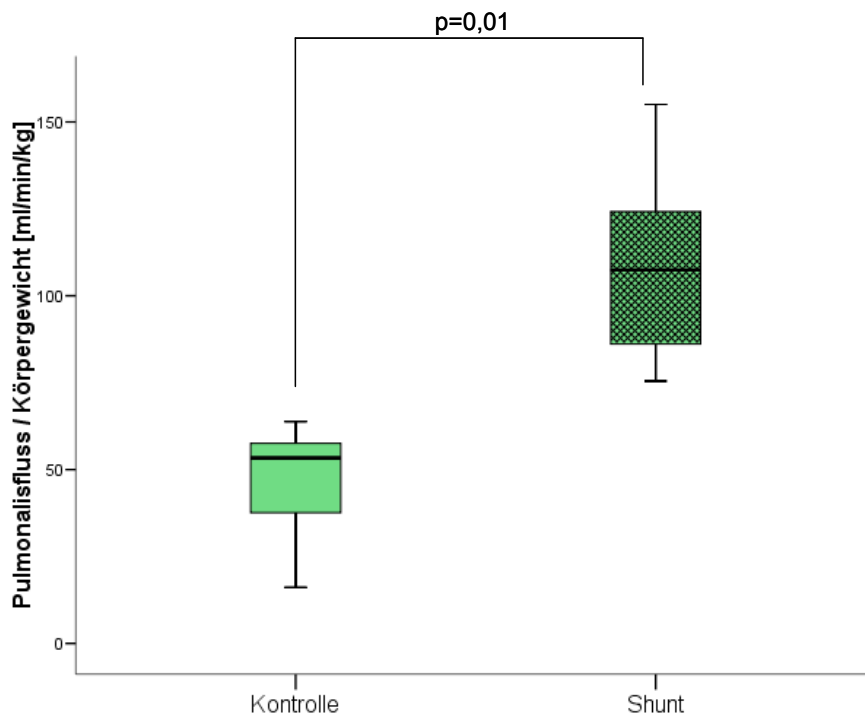


Abbildung 21: Verhältnis des pulmonalarteriellen Flusses zum Körpergewicht

3.2 BNP Plasmaspiegel

Um die kardiale Druck- bzw. Volumenbelastung mit einem Laborparameter zu verifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Plasma BNP-Spiegel in beiden Gruppen am Ende des Beobachtungszeitraums mittels Radioimmunassay bestimmt. Vergleicht man die Plasmaspiegel der beiden Gruppen, zeigt sich eine signifikante Erhöhung des BNPs im Plasma der Shunttiere gegenüber den gesunden Lämmern um den Faktor 1,8 ($p < 0,001$). Im Mittel betrug der Plasma BNP-Spiegel bei den Shunttieren 273 ± 87 pg/ml. Im Vergleich dazu lag der BNP-Spiegel bei den Kontrolltieren im Mittel bei 169 ± 37 pg/ml (Abb. 22).

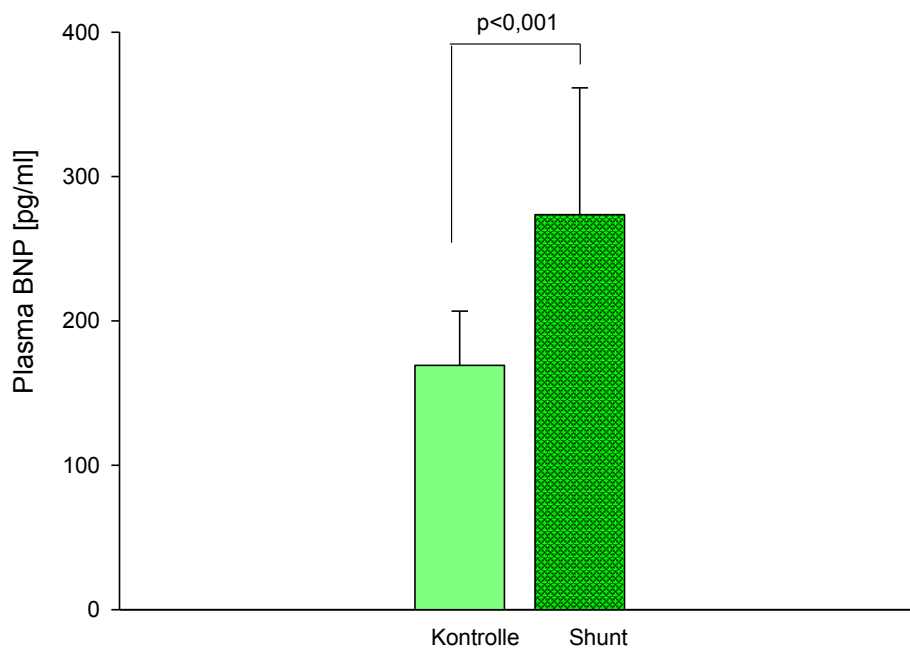


Abbildung 22: Vergleich der BNP-Plasma-Spiegel in den beiden Gruppen mittels Radioimmunassay

3.3 Analyse auf mRNA-Ebene

3.3.1 BNP-Expression

Der Vergleich zwischen gesundem und hypertrophiertem Herzgewebe zeigte eine Erhöhung der BNP-Expression um das 10,9-fache im rechten Ventrikel. Diese Beobachtung erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p=0,32$).

Im linken Ventrikel der Shunttiere zeigte sich eine Aufregulation um das 3-fache ($p=0,42$) (Abb. 23).

Der Vergleich zwischen linkem und rechtem hypertrophierten Herzgewebe (Gruppe 2) zeigte eine 1,5-fach höhere BNP-Expression im rechten Ventrikel (n.s.) (Abb. 24).

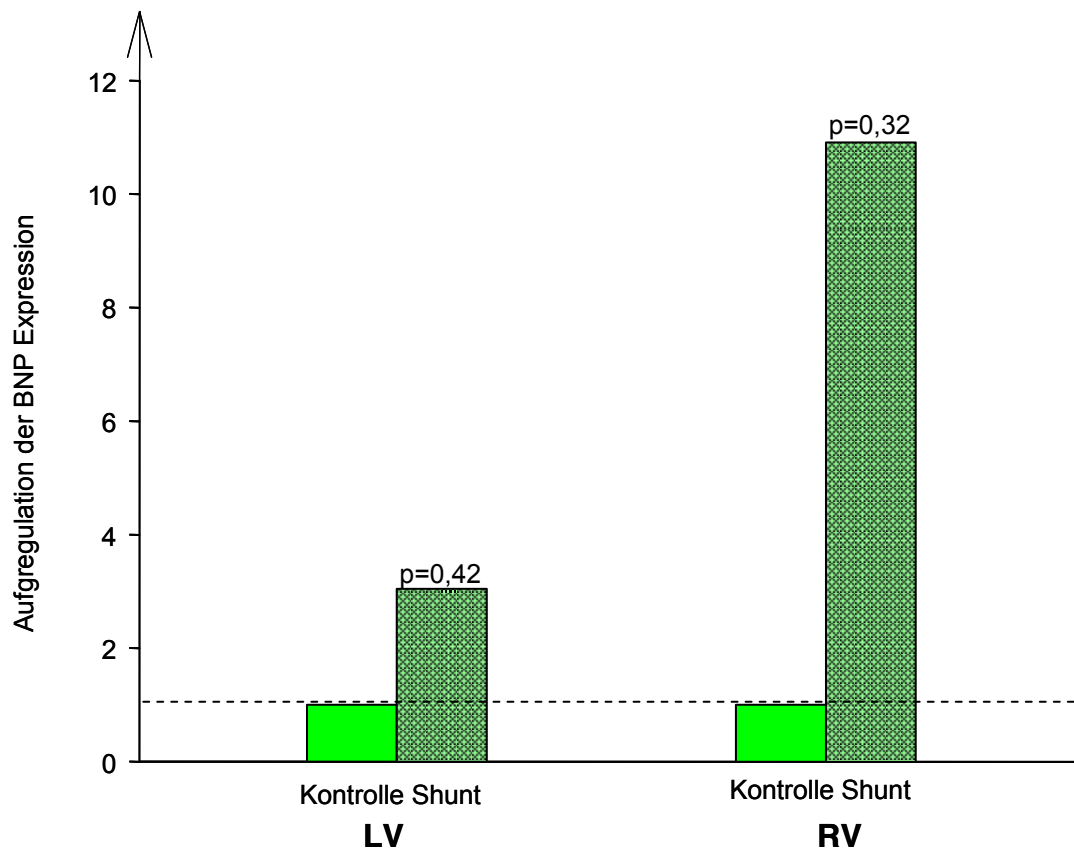


Abbildung 23: Grafische Darstellung der BNP-Expression in Bezug zur Kontrollgruppe

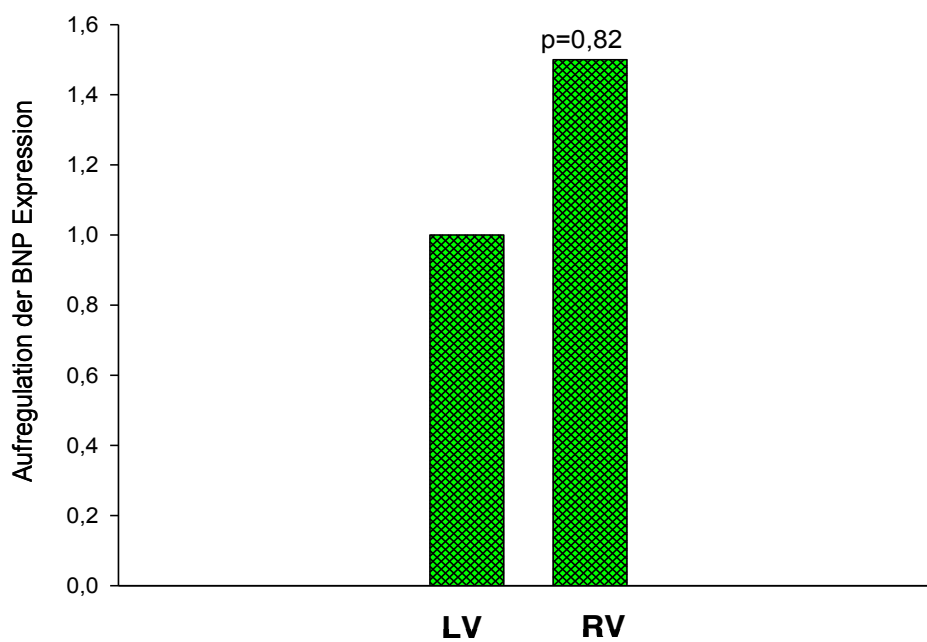


Abbildung 24: Grafische Darstellung der BNP-Expression im rechten hypertrophierten Ventrikel in Relation zum linken Ventrikel.

3.3.2 MMP-2 Expression

Im rechten Ventrikel konnte man eine Aufregulation um das 8,2-fache beobachten. Die Aufregulation der MMP-2 Expression war statistisch nicht signifikant ($p=0,26$) (Abb.26).

Betrachtet man die MMP-2 mRNA Expression der hypertrophierten Herzen im Vergleich zu der Expressionsrate der Kontrolltiere, so zeigt sich im linken Ventrikel eine Aufregulation um das 4,8 fache ($p=0,23$).

Der Vergleich zwischen linkem und rechtem hypertrophierten Ventrikel zeigte eine Steigerung im rechten Ventrikel um den Faktor 4,9 (Abb.27). Diese Aufregulation war statistisch nicht signifikant ($p= 0,16$).

Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge des Amplifikats entsprach dem gesuchten Gen.

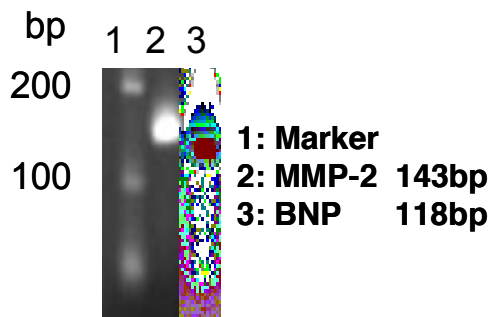


Abbildung 25: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte MMP-2 und BNP

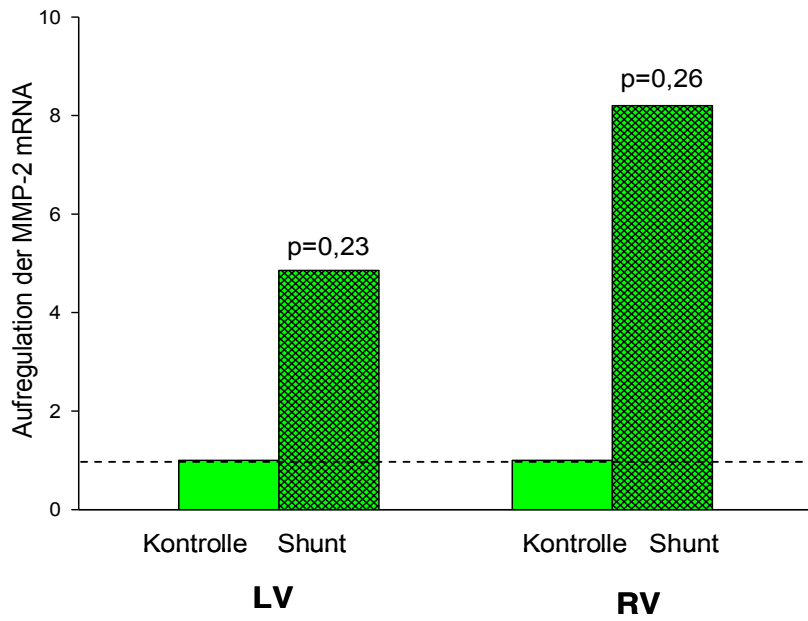


Abbildung 26: Veränderung der MMP-2 mRNA Expression im hypertrophierten Ventrikel (Shunt) in Relation zum gesunden Ventrikel (Kontrolle). Jeweils für den linken Ventrikel (LV) und den rechten Ventrikel (RV).

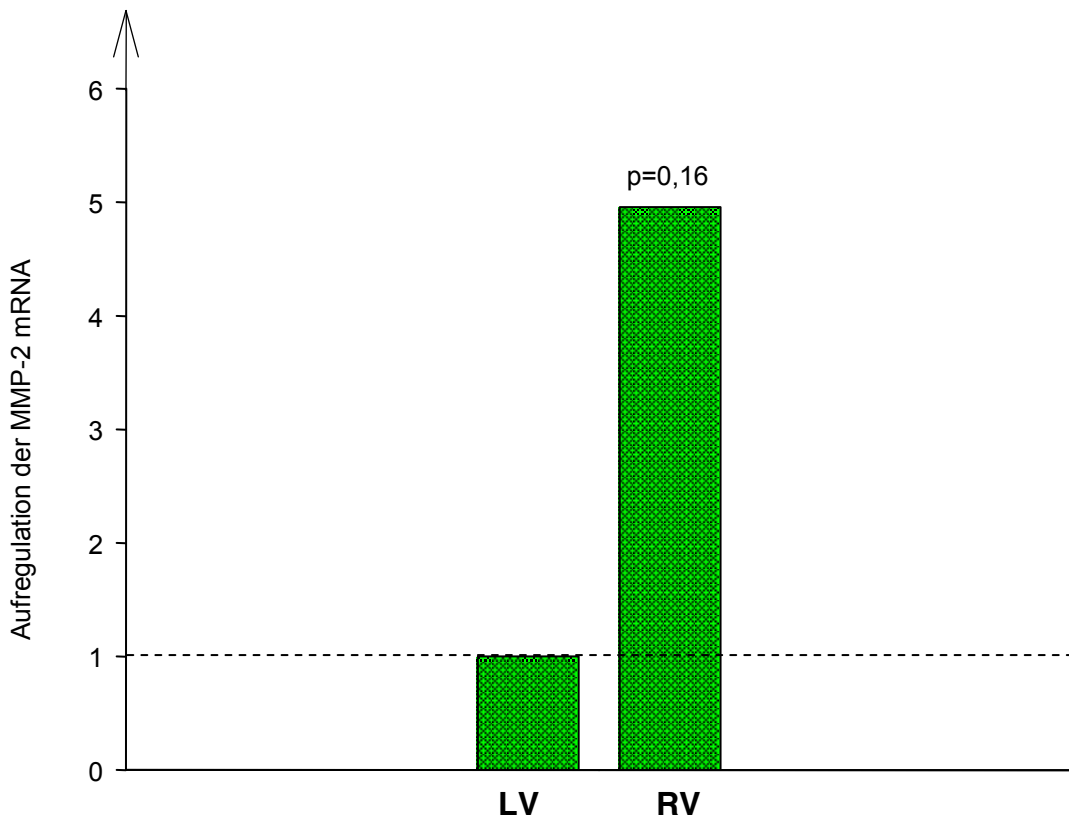


Abbildung 27: Veränderung der MMP-2 mRNA Expression im rechten hypertrophierten Ventrikel in Relation zum linken hypertrophierten Ventrikel

3.3.3 TIMP Expression

Im Weiteren werden die Ergebnisse der Expressionsänderung von TIMPs dargestellt. Vergleicht man die Expression von TIMPs in hypertrophiertem Herzgewebe mit gesundem Herzgewebe im rechten Ventrikel, konnte gezeigt werden, dass TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 durchgehend stärker exprimiert wurden (Abb.32). Die Aufregulation der TIMPs war statistisch nicht signifikant. Im linken Ventrikel war eine Tendenz zur Aufregulation zu sehen. Diese Expressionssteigerung war nicht so stark ausgeprägt wie im rechten Ventrikel. Im Vergleich zwischen linkem und rechtem hypertrophierten Ventrikel konnte kein nennenswerter Unterschied gezeigt werden. Zur Überprüfung der Amplifikate wurden die PCR Produkte auf ein 2% iges Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 31).

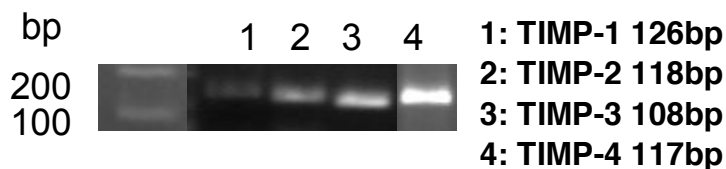


Abbildung 28: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (TIMP-1,-2,-3,-4)

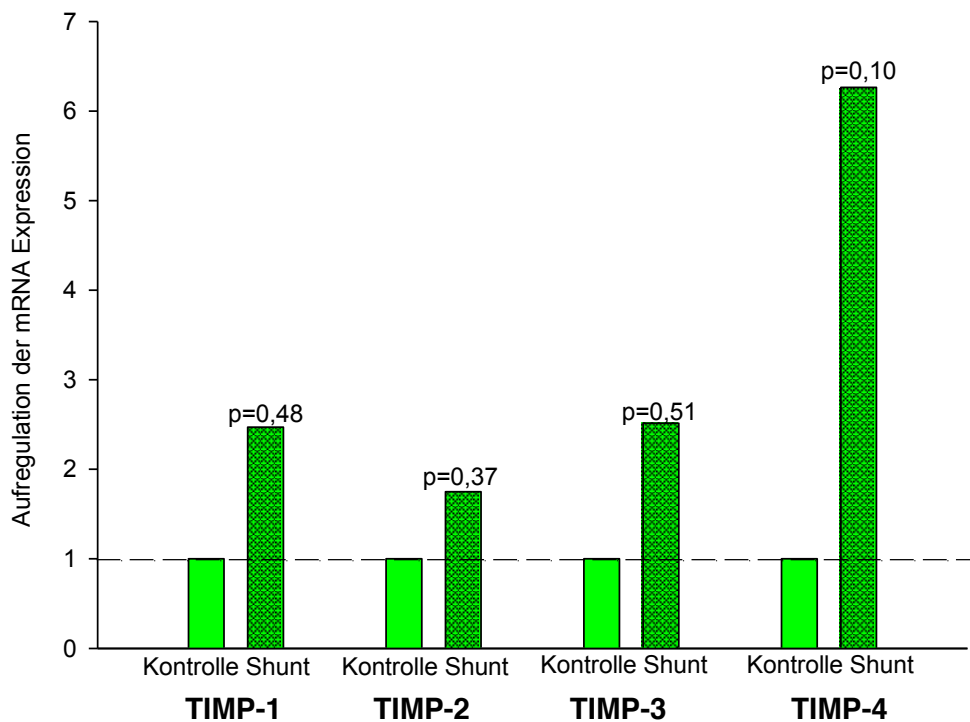


Abbildung 29: mRNA Expression der TIMPS im rechten Ventrikel

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die untersuchten Tiere nach Anlage eines AP-Shunts und Entwicklung einer biventrikulären Hypertrophie im linken und verstärkt im rechten Ventrikel eine vermehrte mRNA Expression der RNA an BNP, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 aufwiesen.

3.4 Analyse auf Proteinebene

In dem folgenden Abschnitt soll anhand der Westernblot-Analyse gezeigt werden, in wieweit sich die Expression der mRNA von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-4 auf der Translationsebene widerspiegelt.

3.4.1 Westernblot

Die Auswertungen der Westernblotanalyse erfolgten semiquantitativ.

3.4.1.1 MMP-2 Proteinexpression

Dabei ergab sich für MMP-2 folgendes Bild:

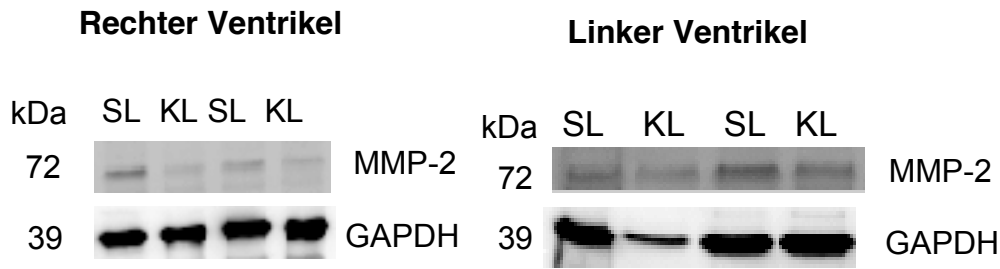


Abbildung 30: Repräsentative Westernblot Analyse des MMP-2 Proteins. Alternierender Auftrag von Shunttieren (SL) und Kontrolltieren (KL).

Im linken Ventrikel konnte entsprechend der mRNA-Expression eine Tendenz zur vermehrten Proteinexpression des MMP-2 gezeigt werden (Abb.34). Der Vergleich von hypertrophiertem und gesundem Myokard zeigte im rechten Ventrikel keine Veränderung auf Proteinebene.

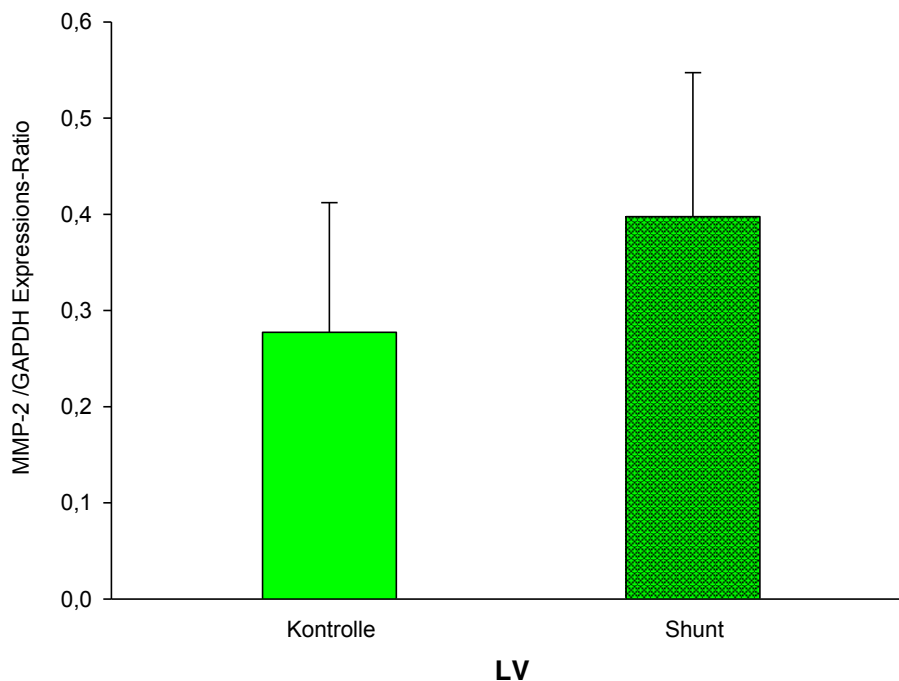


Abbildung 31: Vergleich der MMP-2 Proteinexpression von Kontroll- und Shunttieren im linken Ventrikel

3.4.1.2 TIMP-1 Proteinexpression

Entsprechend den Veränderungen der mRNA Expression stieg auch die Proteinexpression von TIMP-1 im linken Ventrikel des hypertrophierten Herzen an (Abb.36). Im rechten Ventrikel konnte kein Unterschied gefunden werden.

Linker Ventrikel

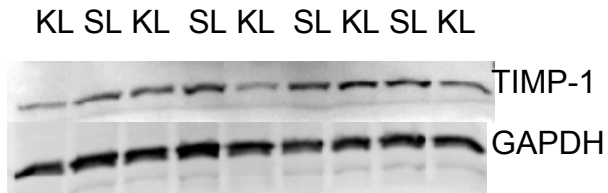


Abbildung 32: Repräsentative Westernblot Analyse von TIMP-1 im linken Ventrikel

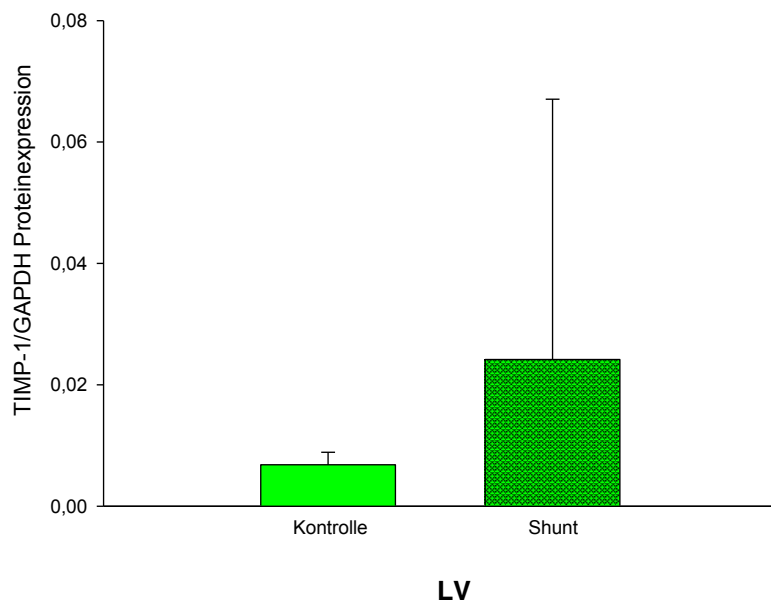


Abbildung 33: TIMP-1 Expression im Vergleich von Kontroll- und Shunttieren im linken Ventrikel

3.4.1.3 TIMP-4 Proteinexpression

Neben der erwarteten Bande im Bereich 27-30 kDa (TIMP-4) wurde eine weitere Bande im Bereich von 45kDa nachgewiesen.

Die 45kDa Bande zeigte im linken Ventrikel in der Gruppe der Shunttiere eine vermehrte Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Im rechten Ventrikel konnte kein Unterschied zwischen den Shunttieren und den Kontrolltieren gezeigt werden (Abb.37).

Im Vergleich von hypertrophiertem Myokard und der Kontrollgruppe zeigte die Bande im Bereich von 27-30 kDa sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel eine gesteigerte Proteinexpression.

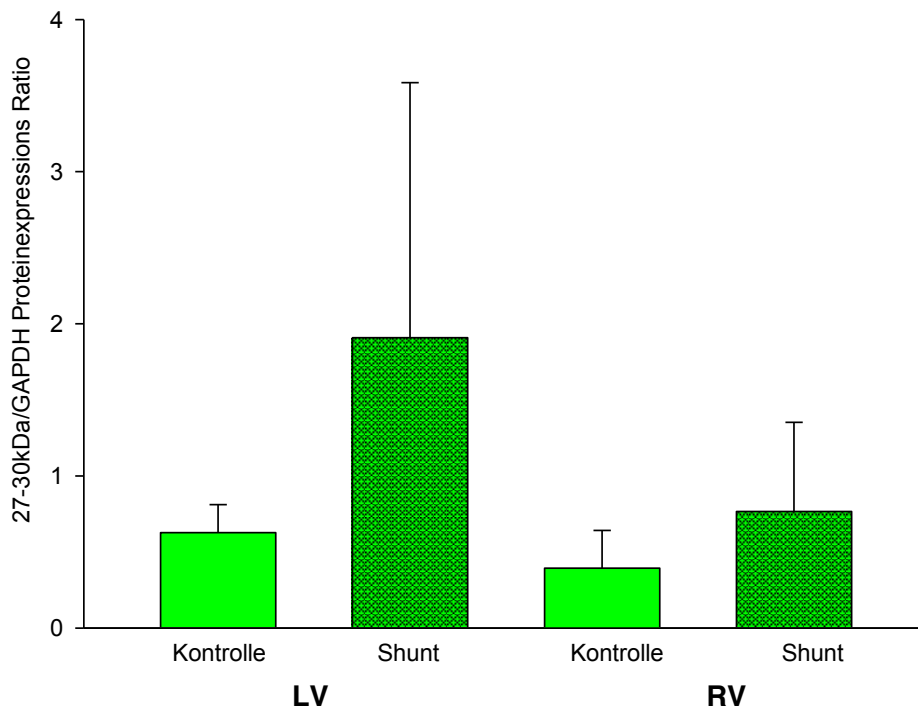


Abbildung 34: Proteinexpression im Bereich von 27-30 kDa. Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Shuntgruppe

Addierte man die 27-30 kDa Bande und die 45 kDa Bande (Total TIMP-4) wurde eine Tendenz zur gesteigerten Proteinexpression sowohl im rechten, als auch im linken Ventrikel in der Gruppe der Shunttiere nachgewiesen. Im rechten Ventrikel der hypertrophierten Herzen war die Aufregulation der Proteinexpression signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe.

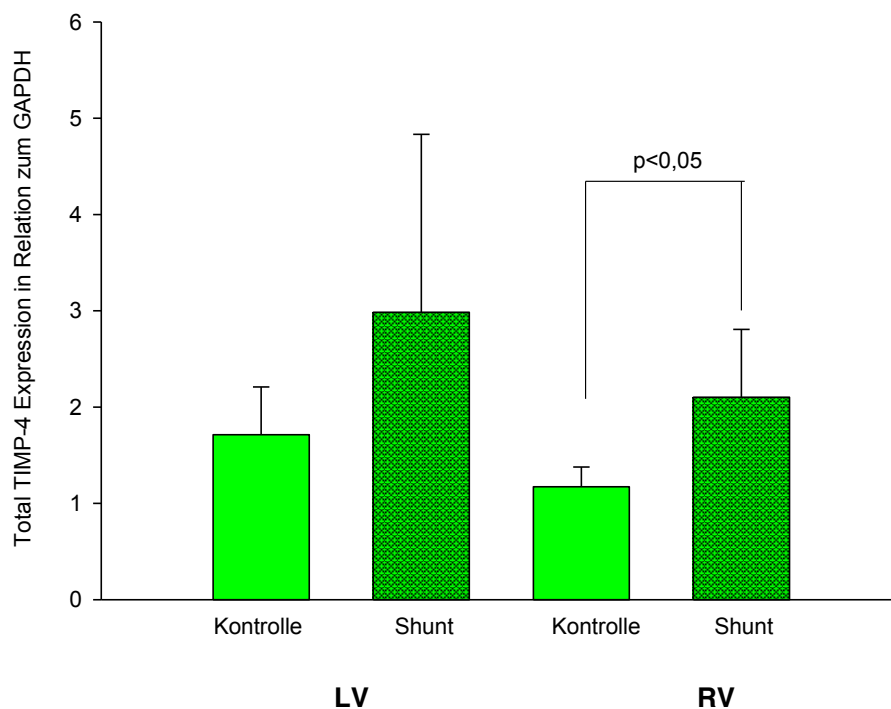


Abbildung 35: Total TIMP-4 Expression im Vergleich von Kontroll- und Shunttieren für den linken und rechten Ventrikel

Auf translationaler Ebene konnten wir keinen nennenswerten Unterschied im Vergleich zwischen linkem und rechtem hypertrophiertem Herzgewebe für MMP-2, TIMP-1 und TIMP-4 zeigen.

3.4.2 Zymographie und Reverse Zymographie

Ein wichtiger Aspekt war es, neben den Untersuchungen der mRNA-Expression und der Expression auf translationaler Ebene, die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren zu untersuchen. Hierfür wurden Gelatine Zymographien und Reverse Zymographien durchgeführt.

3.4.2.1 MMP-Aktivität

Neben der Bande für das MMP-2 (72kDa) konnten Banden im Bereich von 78kDa (pro-MMP-2) und 100kDa (pro-MMP9) sowohl für den rechten als auch für den linken Ventrikel nachgewiesen werden.

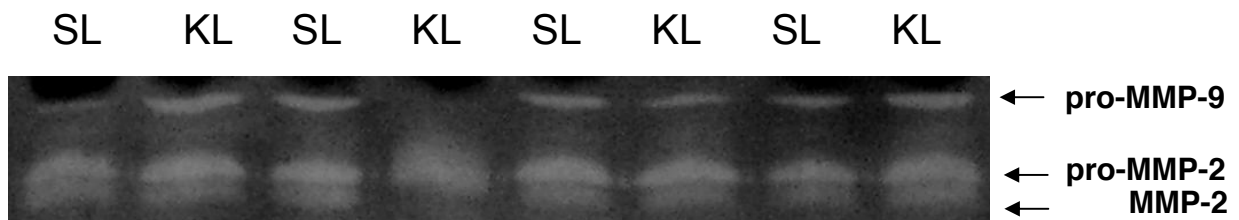


Abbildung 36: Repräsentative Gelatine-Zymographie im rechten Ventrikel. Alternierender Auftrag Kontroll- und Shunttieren.

Der Vergleich von hypertrophierten und normalen Herzen zeigte im linken und rechten Ventrikel bezüglich der Proteinaktivität von pro-MMP-2, MMP-2, MMP-9 und Total-MMP keinen signifikanten Unterschied (Abb. 40). Vergleicht man jedoch die MMP-Aktivitäten der Shunttiere im rechten und linken Ventrikel, konnte man eine signifikant höhere Aktivität im rechten Ventrikel für das pro-MMP-2 ($p < 0,00001$), MMP-2 ($p < 0,001$) und Total-MMP ($p < 0,001$) erkennen (Abb. 41). Die gesteigerte Aktivität im rechten Ventrikel gegenüber dem linken Ventrikel konnte auch in der Gruppe der Kontrolltiere gezeigt werden. Hier zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz.

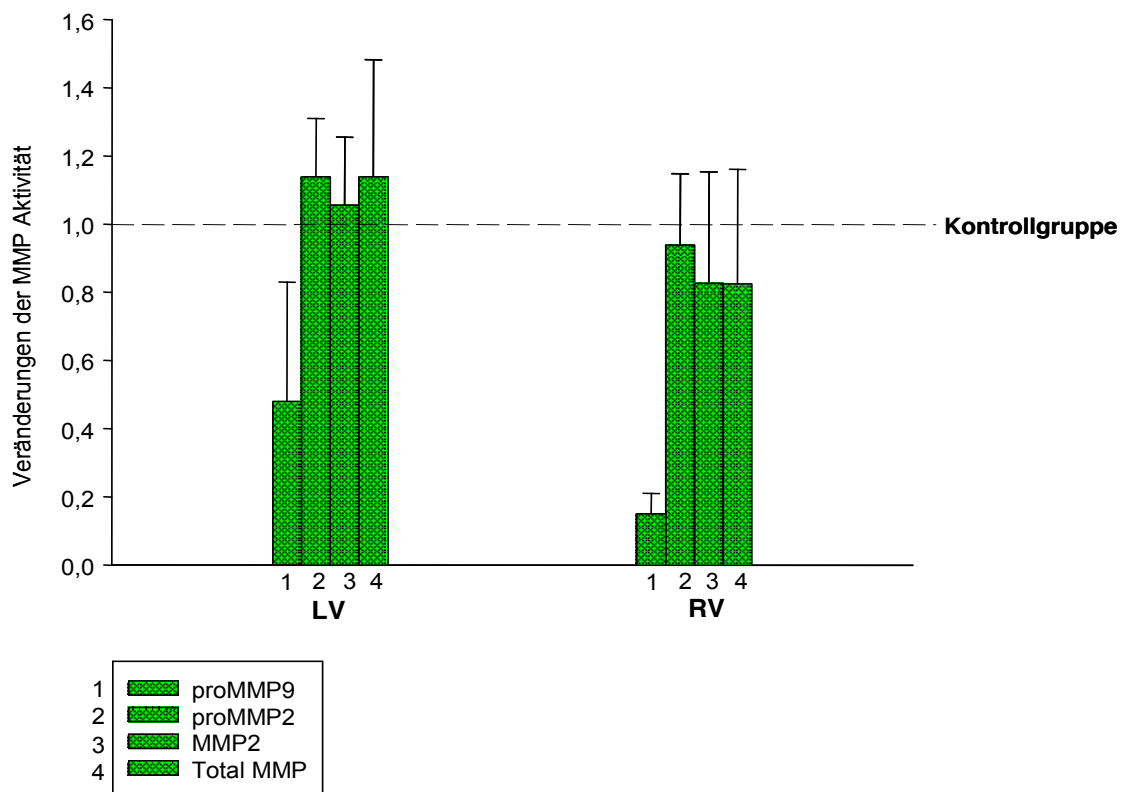


Abbildung 37: Darstellung der verschiedenen MMP-Aktivitäten in der Gruppe der Shunttiere im linken und rechten Ventrikel in Relation zu der Kontrollgruppe, wobei die Aktivität der Kontrolltiere gleich eins ist.

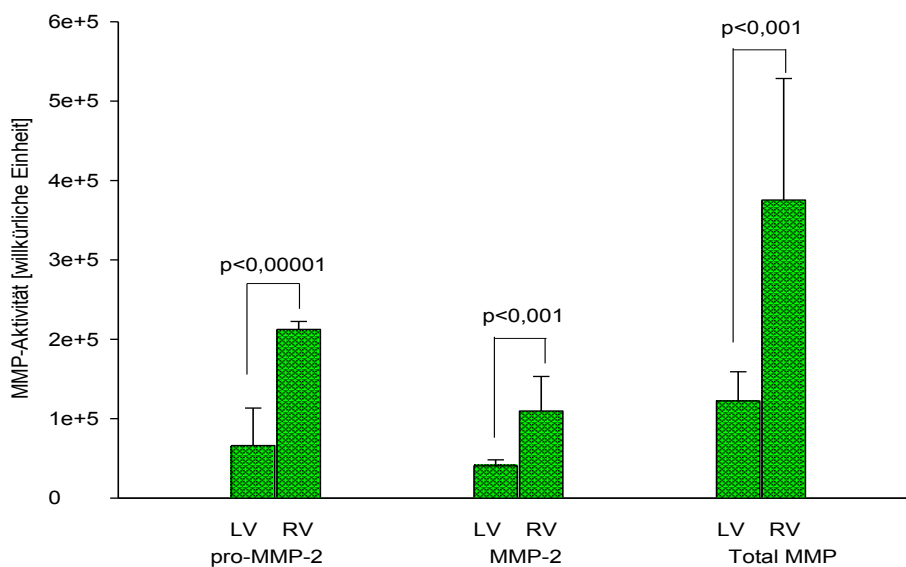


Abbildung 38: MMP-Aktivität im Vergleich von rechtem und linkem Ventrikel der Shuntgruppe

3.4.2.2 TIMP-Aktivität

Das Polyacrylamidgel zeigte insgesamt drei Banden (27-30kDa, 24kDa, 21kDa), welche mit Hilfe des Proteinmarkers bestimmt wurden.

Sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel konnte keine Veränderung der TIMP-Aktivität in der Gruppe der Shunttiere gezeigt werden (Abb. 42). Lediglich im Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel innerhalb der Shuntgruppe konnte eine signifikante höhere Aktivität für Total-TIMP (Summe aller Banden) im rechten Ventrikel beobachtet werden (Abb.43).

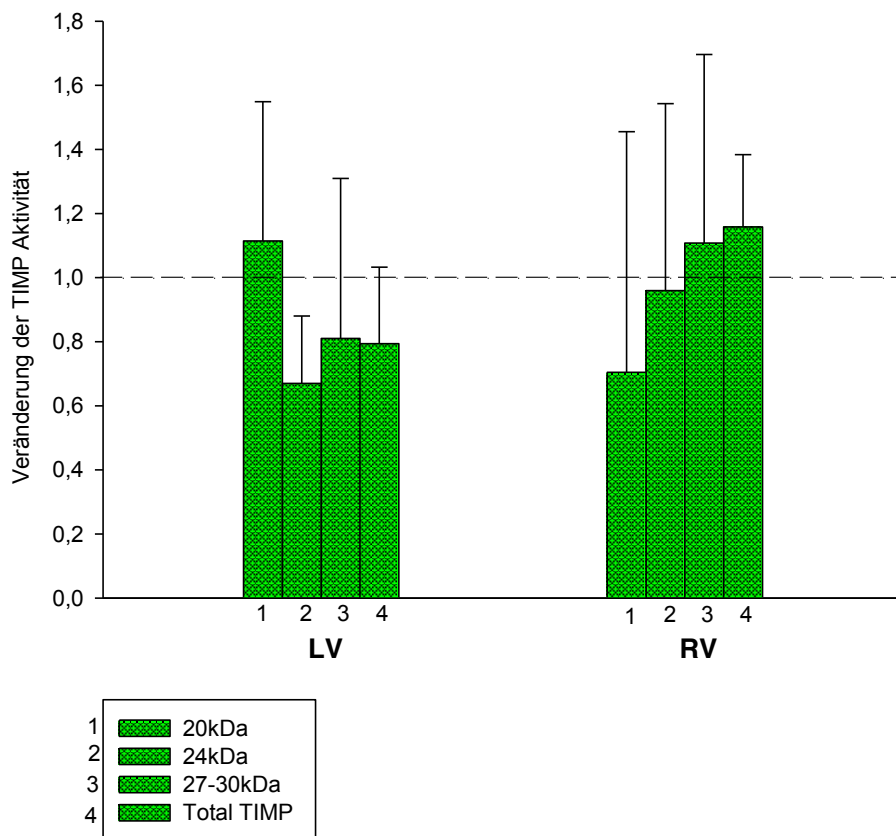


Abbildung 39: TIMP-Aktivitäten der Shunttiere im linken und rechten Ventrikel im Vergleich zur Kontrollgruppe

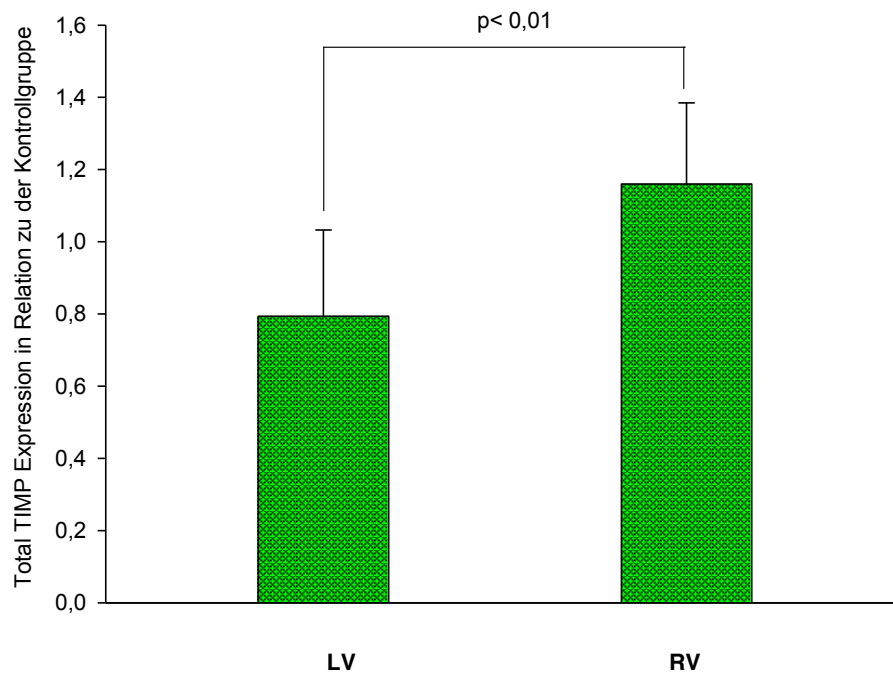


Abbildung 40: Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel der Shunttiere für Total-TIMP bezogen auf die Kontrolltiere

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die untersuchten Tiere nach Anlage eines AP-Shunts und Entwicklung einer kongenitalen biventrikulären Hypertrophie eine vermehrte Expression der RNA von BNP, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel aufwiesen. Auf translationaler Ebene (Westernblot) konnte eine Tendenz zur Aufregulation der MMP-2 und TIMP-1 Proteine im linken Ventrikel gezeigt werden. Für das Protein TIMP-4 konnte biventrikulär eine gesteigerte Expression gezeigt werden. Die Aktivitäten (Zymographie, Reverse Zymographie) der einzelnen Proteine zeigten jedoch keine nennenswerte Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel zwischen Shunttieren und den Kontrolltieren zeigte auf mRNA-Ebene deutliche Unterschiede.

Im rechten Ventrikel zeigten alle untersuchten Gene eine stärkere Expressionsrate als im linken Ventrikel.

Diese Beobachtung konnte auf translationaler Ebene für die untersuchten Proteine (MMP-2, TIMP-1, TIMP-4) nicht gezeigt werden.

Die Aktivität der Proteine (pro-MMP2, MMP-2, Total-MMP) in der Shuntgruppe zeigte im rechten Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel eine hoch signifikante Aktivitätssteigerung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im rechten Ventrikel der Shunttiere das Transkript und die Aktivität der zu untersuchenden Proteine der extrazellulären Matrix im Vergleich zum linken Ventrikel gesteigert sind.

4 Diskussion

Bei einem Links-Rechts-Shunt tritt Blut aufgrund des Druckgradienten zwischen den beiden Keisläufen von der linken Herzseite auf die rechte Herzseite über. Das Ausmaß des Blutflusses durch den Shunt (sog. Shuntvolumen) ist von der Größe des Defekts und den Widerstandsverhältnissen im großen und kleinen Keislauf abhängig. Bei großem Shuntquerschnitt steigt das Shuntvolumen. Es addiert sich zum Auswurfvolumen des rechten Ventrikels, so dass die Lungendurchblutung und der Zustrom zum linken Herzen stark ansteigen. Zur Kompensation erhöht sich dessen Auswurf (Frank-Starling-Mechanismus), doch besteht jetzt eine dauernde Volumenbelastung des linken Ventrikels. Durch den zusätzlichen Blutfluss wird der rechte Ventrikel vermehrt volumenbelastet und bei großem strukturellem Defekt mit entsprechender Druckübertragung wird er zusätzlich druckbelastet.

Druck- und Volumenbelastung am Herzen sind Reize, die zur Aktivierung von Kompensationsmechanismen führen (Nagatomo 2000 H151-61).

Diese Mechanismen ermöglichen - allerdings nur zeitlich begrenzt - eine Steigerung bzw. Stabilisierung der Herzleistung.

Auf zellulärer Ebene werden dabei strukturelle und funktionelle Umbauprozesse im Herzmuskel beobachtet, die - makroskopisch als Herzhypertrophie sichtbar - unter dem Begriff Myokardremodeling zusammengefasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell durch pränatale Anlage eines aortopulmonalen Shunts eine kongenitale biventrikuläre Hypertrophie erzeugt. Es sollen Veränderungen in der extrazellulären Matrix beschrieben, deren funktionelle Bedeutung dargestellt, sowie der Zusammenhang zum Myokardremodelling diskutiert werden. Weiterhin war es mit unserem Modell möglich, die Veränderungen der extrazellulären Matrix zwischen linkem und rechtem Ventrikel zu vergleichen. Durch den aortopulmonalen Shunt wurde der

linke Ventrikel einer Volumenbelastung und der rechte einer Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt.

Zunächst werden die hämodynamischen Veränderungen und die makroskopisch sichtbaren Veränderungen (Herzhypertrophie) in unserem Modell diskutiert.

4.1 Intrauterine Anlage eines aortopulmonalen Shunts: Hämodynamische Auswirkungen

Durch die intrauterine Anlage eines aortopulmonalen Shunts bei Lämmern konnte postnatal eine biventrikuläre Hypertrophie induziert werden (Azakie 2006 1262-71). Weiterhin zeigte sich in Übereinstimmung mit anderen Tiermodellen, die einen aortopulmonalen Shunts platziert hatten (Eppinger 1941 127-43; Reddy 1995 606-13; Fratz 2004 L592-7), dass bei den hämodynamischen Messungen eine Veränderung des pulmonalen Blutflusses, des pulmonal-systemischen Flussverhältnisses ($Q_p:Q_s$), des diastolischen Drucks und des Quotienten aus pulmonalarteriellen Druck und systemischem Druck, zu sehen war. Im Einzelnen zeigte sich in unserem Modell bei den Shunttieren eine Erhöhung des pulmonal-systemischen Flussverhältnisses mit einem $Q_p:Q_s$ von 3,3, welcher sich signifikant ($p < 0,001$) von den Kontrolltieren unterschied.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Reddy et al. nach intrauteriner Anlage des aortopulmonalen Shunts und einmonatiger Beobachtungszeit, dass der Fluss über der linken Pulmonalarterie bei den Shunttieren gesteigert war (Reddy 1995 606-13).

Im Mittel betrug der Fluss bei unseren Shunttieren $1133,95 \pm 366,0$ ml/min und war damit im Vergleich zur altersgleichen, gesunden Kontrollgruppe, bei denen der Fluss im Mittel bei $567,14 \pm 286,85$ ml/min lag, signifikant erhöht. In den meisten Tiermodellen mit gesteigertem pulmonalen Blutfluss wurde der aortopulmonale Shunt bei bereits ausgewachsenen Tieren platziert (Eppinger 1941 127-43; Hawe 1972 652-64; Michel 1985 H1106-13). Aufgrund eines niedrigen pulmonalvaskulären Widerstands zum Zeitpunkt der Operation hatten diese

Modelle wenig Erfolg bei der künstlich induzierten Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks. Weiterhin führte der große Links-Rechts-Shunt meist zur raschen Ausbildung einer relevanten Herzinsuffizienz. Fasules et al. untersuchten in ihrem Modell bei neugeborenen Kälbern durch Anlage eines Shunts zwischen der linken Pulmonalarterie und der Aorta Veränderungen der Hämodynamik bei erhöhten pulmonalen Blutfluss (Fasules 1994 867-75). Es zeigte sich in Übereinstimmung zu unserem Modell ein erhöhter pulmonaler Fluss. Die Arbeitsgruppe konnte in einem Untersuchungszeitraum von 10 Wochen keine ventrikuläre Hypertrophie erkennen, da zur authentischen Simulation eines kongenitalen Herzfehlers das Faktum fehlte, dass die Tiere nicht schon bei der Geburt einen Herzfehler aufwiesen. In allen Modellen wurde die Verbindung zwischen systemischem und pulmonalem Kreislauf erst nach intrapartalem Abfall des pulmonalvaskulären Widerstands und nach der Periode des Lungenwachstum und der Entfaltung hergestellt.

Für unser Modell entscheidend ist der verzögerte Abfall des pulmonalvaskulären Widerstands und der Anstieg des pulmonalen Blutflusses (Hoffman 1981 873-7). Wir nahmen an, dass eine intrauterine aortopulmonale Shuntanlage in einem zeitlich verzögerten Abfall des pulmonalvaskulären Widerstands resultiert. Folglich konnten wir eine signifikante Erhöhung des pulmonalvaskulären Flusses und des Verhältnisse von pulmonalarteriellem Druck und systemischem Druck (PAP:SAP) sehen. Unter diesen Umständen konnten die Tiere die Veränderung besser tolerieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wir in unserem Modell realitätsgetreu einen kongenitalen Herzfehler mit erhöhtem pulmonalvaskulärem Fluss simulieren konnten. Weiterhin erlaubte uns das Modell die frühe Evaluation von physiologischen, molekularen und morphologischen Veränderungen, welche durch den gesteigerten pulmonalen Blutfluss während des Wachstums und der Entwicklung entstanden, zu untersuchen.

4.2 Herzhypertrophie

Bei den Shunttieren kam es, erkennbar an der Zunahme der Herzgewichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, zur Herzhypertrophie. Die Hypertrophie betraf sowohl den linken als auch den rechten Ventrikel, wie durch die Einzelgewichte (LV/ KG, RV/ KG) ausgewiesen wurde (siehe Abb. 12). Im vorliegenden Tiermodell konnte gezeigt werden, dass nach intrauteriner Anlage eines aortopulmonalen Shunts eine biventrikuläre Myokardhypertrophie erzeugt werden kann. Hierbei zeigte sich linksventrikulär eine Zunahme des Gewichtes um 79% und rechtsventrikulär um 91% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Unterschied erwies sich als hoch signifikant ($p < 0,000001$), somit wies der rechte Ventrikel eine größere Zunahme des Herzgewichts auf als der linke.

Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die Ursache der verschiedenen Größenzunahmen die unterschiedlichen Reize waren, die auf die Ventrikel wirkten oder die unterschiedliche Morphologie der beiden Ventrikel.

Die Linksherzhypertrophie wurde in unserem Modell vorwiegend durch Volumenbelastung induziert. Im rechten Ventrikel wurde die Hypertrophie durch die Summe von Druck- und Volumenbelastung erzeugt.

In anderen Modellen konnte gezeigt werden, dass Druckbelastung zu einer konzentrischen und Volumenbelastung zu einer exzentrischen Linksherzhypertrophie führt (Opie 2006 356-67). Inwieweit diese beiden unterschiedlichen Formen der Herzhypertrophie sich jedoch im Herzgewicht widerspiegeln, wurde nicht untersucht. Dies wäre aber eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Gewichtszunahme der beiden Ventrikel. Die beiden verschiedenen Muster der Ventrikelhypertrophie wurden jedoch meist nur am linken Ventrikel untersucht.

Minami untersuchte in seinem Model mit hypertensiven Ratten, die nach Verabreichung von Monochromatalien (Alkaloid) eine pulmonale Hypertonie entwickelten, das rechtsventrikuläre Remodeling (Minami 2006 629-37). So konnte er im Vergleich zu anderen Studien, die die linksventrikuläre Hypertrophie

untersuchten, zeigen, dass das Remodeling nach Druckbelastung im rechten Ventrikel ähnlich zu dem im linken Ventrikel ist (Minami 2006 629-37).

Die unterschiedlichen Reaktionen des Ventrikels auf Druck- und Volumenbelastung konnten auch auf extrazellulärer Matrixebene licht- und elektronenmikroskopisch bereits 1975 beschrieben werden (Maron 1975 725-39). Carabello beschrieb 2002 den Unterschied des konzentrischen Remodelings und des exzentrischen Remodelings und fand dabei heraus, dass es bei Druckbelastung zu einer Aufregulation der Hypertrophie-erzeugenden Proteine kommt und im Gegensatz dazu bei Volumenbelastung zu einer Reduktion ihrer Inhibitoren. Weiter fand er heraus, dass die Reduktion der Hypertrophie-hemmenden Proteine weniger ins Gewicht fallen und somit die Hypertrophie weniger stark ausgebildet war. Es lässt sich also feststellen, dass eine Volumenbelastung gegenüber einer Druckbelastung einen geringeren Grad an Hypertrophie erzeugt (Carabello 2002 S258-63).

Unsere Ergebnisse wurden durch diese These bekräftigt, da der vornehmlich druckbelastete rechte Ventrikel eine stärkere relative Gewichtszunahme aufwies als der linke Ventrikel.

Eine andere mögliche Erklärung der unterschiedlichen Veränderung der Ventrikel auf die Belastung ist die Morphologie und Faserausrichtung des linken Ventrikels, die sich grundsätzlich von der des rechten unterscheidet. Kann man im linken Ventrikel subepikardial eine linksgängige Helix der Myofibrillen sehen, so findet sich im rechten Ventrikel eine subendokardiale rechtsgängige Helix (Sengupta 2006 1988-2001).

Die Formen beider Ventrikel sind genetisch determiniert und passen exakt zu ihrer jeweiligen Funktion (Yacoub 1979 3-6). Sir Magdi Yacoub beschrieb 1992 den linken Ventrikel als flaschenförmigen Körper, in dem sich Einfluss- und Ausflussstrom eine Öffnung teilen. Diese Tatsache ermöglicht dem linken Ventrikel, Blut gegen hohe Widerstände auszuwerfen. Im Gegensatz dazu beschrieb er den rechten Ventrikel als abgeflachte Röhre, die den linken Ventrikel umwickelt und separate Ein- und Ausflussöffnungen hat. Das vorgesetzte

Kontraktionsmuster ahmt peristaltische Bewegungsmuster nach. Diese Konstellation ist für die Beförderung von Blut gegen geringen Widerstand nötig (Yacoub 1995 156-7). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Volumenbelastung eines Ventrikels die Interaktion mit dem anderen Ventrikel verändert und dieser Effekt vom Perikard unterstützt wird (Bove and Santamore 1981 365-88).

Fogel beschrieb in seiner Studie ventrikuläre Kontraktionsmuster vom rechten Ventrikel, die als Systemventrikel funktionieren (Fogel 1998 330-8). Dabei verglich er Patienten mit hypoplastischem Linksherzsyndrom nach einer Fontan-Operation mit solchen Patienten, die eine Mustard-Operation bei Transposition der großen Gefäße (TGA) erhielten. Der rechte Ventrikel bei der TGA-Gruppe zeigte eine viel größere Stauchung und Heterogenität von Drehungen als die Fontan-Gruppe. Er stellte die Hypothese auf, dass die Unterschiede bei den Kontraktionsmustern auf einem Fehlen des linken Ventrikels bei der Fontan-Gruppe beruhen (Fogel 1998 330-8).

Neben der unterschiedlichen Form und Faserausrichtung des linken Ventrikels im Vergleich zum rechten Ventrikel und den verschiedenen Reizen, die auf die Ventrikel wirken, könnten diese verschiedenen Kontraktionsmuster ein weiterer Grund dafür sein, dass der rechte Ventrikel extremere Auswirkungen auf die Belastung zeigt als der linke Ventrikel.

In unserem Modell würden diese Unterschiede somit die unterschiedliche Größenzunahme der Ventrikel erklären.

4.3 BNP als Biomarker bei kardialer Dysfunktion

Das Brain Natriuretic Peptid (BNP) repräsentiert einen wertvollen Biomarker bei Herzerkrankungen und deren Risikostratifizierung. Palazzuoli et al. konnten zeigen, dass der Hormonspiegel im Blut die klinischen und prognostischen Informationen mit den traditionellen Labormarkern für Herzerkrankungen (z.B. Troponin, MB-Kreatinkinase, C-reaktives Protein) wertvoll ergänzt (Palazzuoli 2007 491-6).

So wurde aufgrund des diagnostischen Potentials das BNP im Jahre 2005 in die ESC-Richtlinien für Diagnostik und Behandlung von chronischen Herzerkrankungen als "rule out test" aufgenommen (Krum 2005 2472; author reply 2473-4).

Reesink et al. konnten bei Patienten mit pulmonaler Hypertension und damit einhergehender rechtsventrikulärer Dysfunktion eine Korrelation zwischen dem BNP-Plasmaspiegel und dem rechtsventrikulären Remodeling zeigen.

In unserem Modell untersuchten wir den Effekt von Volumen- und Druckbelastung auf den Plasmaspiegel von BNP.

Der Plasmaspiegel bei den Shunttieren lag im Mittel bei $273,57 \pm 87$ pg/ml und war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant gesteigert, bei denen der BNP Spiegel im Mittel bei 169 ± 37 pg/ml lag.

Unsere Ergebnisse weisen in eine ähnliche Richtung wie Nakamura et al. Sie konnten bei hypertensiven Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie eine signifikante Erhöhung des BNP Plasmaspiegels im Vergleich zur altersgleichen und gesunden Kontrollgruppe (Nakamura 2003 1025-9) zeigen.

Im gesunden Herzen befindet sich der Hauptbildungsort des BNP in den Vorhöfen (Goetze 2006 1648-50).

Bei hypertensiven Ratten konnten Mukoyama et al. hingegen zeigen, dass der Ventrikel der Hauptbildungsort und Hauptsyntheseort des BNP ist. (Mukoyama 1991 1402-12).

Weiterhin untersuchten wir die Expression der mRNA vom BNP im linken und rechten Ventrikel. Dzimiri et al. untersuchten in ihrer Studie neben dem Plasmaspiegel von BNP auch die mRNA Expression von BNP bei Patienten mit einer linksventrikulären Volumenbelastung durch Aortenklappeninsuffizienz im linken und rechten Ventrikel. Sie konnten zeigen, dass sowohl im linken als auch

im rechten Ventrikel sowie im Plasma eine signifikante Verdoppelung des BNPs im Vergleich zu altersgleichen gesunden Patienten auftrat (Dzimiri 2002 563-9).

In unserem Modell konnten wir eine Erhöhung der BNP mRNA im rechten Ventrikel um das 10,9-fache und im linken Ventrikel um das 3-fache im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigen.

Der Unterschied unseres Modells zu Dzimiri et al. liegt zum einen darin, dass wir eine relevante Erhöhung der BNP mRNA im Gegensatz zu der gesunden Kontrollgruppe aufzeigen konnten. Zum anderen erfolgte zusätzlich zur Volumenbelastung des linken Ventrikels auch eine Druckbelastung des rechten Ventrikels.

Man nimmt an, dass die endokrine Antwort des Herzen auf verschiedene hämodynamische Anforderungen - sowohl chronisch als auch akut - eine Veränderung der Transkription, der Translation, der Post-Translation, der Speicherung und der Freisetzung von BNP ist (de Bold 1996 7-18; Thibault 1999 193-217).

In dem Modell von Thibault et al. wurde versucht, den intrazellulären Signalweg, der die Sekretion von Natriuretischen Peptiden steuert, in Herzzellen nachzuweisen (Thibault 1999 193-217). Um diese Mechanismen zu erforschen, wurde meist mit Primärkulturen von neonatalen kardialen Ventrikel- und Vorhofzellen gearbeitet.

Beide Zelltypen synthetisieren BNP während der Embryogenese. Dieses fetale Genexpressionsprogramm verliert sich jedoch rasch nach der Geburt (Hassall 1988 161-9; Larsen 1993 201-10).

Es wurde durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass die BNP-Expression im fetalen Ventrikel im Vergleich zum adulten Ventrikel erhöht ist (Scott and Jennes 1987 479-81; Wei 1987 1325-9; Hersey 1989 35-41).

Ein Zusammenhang zu unserem Modell zeigt sich darin, dass viele Studien eine erhöhte Genexpression von BNP bei Patienten mit Herzerkrankungen und

speziell bei Hypertrophie nachweisen konnten (Saito 1989 298-305; Hosoda 1991 1152-5; Kawakami 1996 197-204). Während der Entwicklung einer Herzhypertrophie werden in den Myozyten bestimmte fetale Genexpressionen reaktiviert (Day 1987 485-91; Swynghedauw 1999 215-62; Thibault 1999 193-217). Diese Gen-Reaktivierung ist jedoch nicht Ursache einer Hypertrophie. So konnten Cameron und Ellmers zeigen, dass die hypertrophierte Zelle von BNP direkt moduliert wird und nicht durch Reize, die eine Hypertrophie verursachen (z.B. Druckbelastung) (Cameron and Ellmers 2003 2191-4).

Wir sind davon überzeugt, dass auch in unserem Modell während der Entwicklung der Hypertrophie eine Genaktivierung stattgefunden haben muss, die eigentlich in der fetalen Entwicklung des Herzens abläuft.

Da physiologisch der BNP-Spiegel nach der Geburt rasch abfällt, ist ein entscheidender Punkt in unserem Versuchsaufbau, dass die Lämmer nach der Geburt aufgrund der intrauterinen Anlage des Shunts keinen physiologischen Zustand erreichen. Somit wäre eine dauerhafte fetale Genaktivierung in den Lämmern mit Shunt eine mögliche Erklärung für die deutlich erhöhte Genexpression des BNPs und des erhöhten Plasmaspiegels.

4.4 Expression von MMPs und ihren Inhibitoren TIMPs bei biventrikulärer Hypertrophie

Die bisher vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass beim Myokardremodeling unter anderem Veränderungen der extrazellulären Matrix stattfinden (Spinale 2002 520-30).

Dieses extrazelluläre Matrix-Remodeling wird größtenteils durch MMPs vermittelt, die eine Vielfalt von extrazellulären Matrix-Komponenten abbauen (Spinale 2002 520-30).

Die MMPs spielen nicht nur kardial eine entscheidende Rolle, sondern beispielsweise auch bei Um- und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix in der Angiogenese, der Wundheilung und dem Wachstum (Nagase 2006 562-73).

Die Kontrolle der MMP-Aktivität vollzieht sich auf verschiedenen Ebenen: Transkription, Translation, postrtranslationale Aktivierung der Pro-Form und Interaktion mit ihren Inhibitoren, den TIMPs (Spinale 2002 520-30; Fielitz 2004 809-20).

TIMPs spielen eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Degradation der extrazellulären Matrix durch die MMPs. So konnte bei Knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass bei Mangelfunktion der TIMPs ein nachteiliges, linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt entstand. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war das linksventrikuläre enddiastolische Volumen bei den Knock-out-Mäusen signifikant erhöht. Zudem zeigten diese Tiere eine verminderte Kontraktilität des linken Ventrikels (Creemers 2003 H364-71).

Es konnte außerdem in Tiermodellen nachgewiesen werden, dass die Regulation der MMPs und ihrer Inhibitoren auf verschiedene Reize wie Druck oder Volumen unterschiedlich gesteuert werden (Spinale 1998 482-95; Peterson 2001 2303-9). Darüber hinaus konnte in Tiermodellen eine zeitabhängige Induktion der MMPs und TIMPs nach Druck- und Volumenbelastung belegt werden (Spinale 1998 482-95).

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen der extrazellulären Matrix von hypertrophierten Myokardproben (Chancey 2002 1983-8; Fielitz 2004 809-20; Heymans 2005 1136-44) fanden wir Veränderungen in der Expression der mRNA sowie eine erhöhte Proteinexpression von MMPs und ihren Inhibitoren im hypertrophierten Ventrikel gegenüber einem gesunden Myokard (Spinale 2002 S332-8).

Im Einzelnen wurde auf Transkriptionsebene sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel eine Aufregulation der MMP-2-Expression bei den Shunttieren im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Die Expression der RNA von TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 war ebenso biventrikulär aufreguliert.

Auf Proteinebene wurde für MMP-2 und TIMP-1 im linken Ventrikel ein Anstieg der Expression aufgezeigt.

Bei den Untersuchungen zur Proteinexpression konnte neben der 27-30kDa Bande des TIMP-4s eine weitere Bande im Bereich von 45kDa nachgewiesen werden. Die zusätzliche Bande von 45kDa bei der Westernblot-Analyse von TIMP-4 kann durch eine Komplexbildung von MMPs mit TIMPs erklärt werden (Thomas 1998 1708-15).

Im linken Ventrikel zeigte sich hierbei eine Aufregulation der 45kDa Bande, die für den rechten Ventrikel nicht nachweisbar war.

In Ergänzung dazu zeigte sowohl die 27-30kDa Bande als auch die Summe (Total TIMP-4) der beiden Banden eine biventrikuläre Aufregulation der TIMP-4 Proteinexpression.

Bezüglich der MMP- und TIMP-Aktivität konnte zwischen hypertrophiertem und gesundem Myokard kein Unterschied gezeigt werden.

MMPs und ihre Inhibitoren spielen eine entscheidende Rolle beim kardialen Remodeling (Mann and Spinale 1998 1699-702; Li 2000 214-24; Spinale 2002 520-30; Spinale 2002 S332-8). Mann und Spinale sehen im kardialen Remodeling nicht nur eine abnorme Kollagensynthese, sondern auch eine Kollagen-Degradation. Sie beschreiben die extrazelluläre Matrix als dynamisches Gleichgewicht in Abhängigkeit von Proteinen, welche für die Synthese und Degradierung der Matrix und deren Inhibitoren verantwortlich sind.

In Hinblick auf Myokardhypertrophie durch Druck- und Volumenbelastung wurden Expressionsveränderungen von Genen der MMP- und TIMP-Familien bereits früher an verschiedenen Modellen untersucht (Heymans 2005 1136-44). Heymans et al. untersuchten Myokardproben von Patienten mit isolierten Aortenstenosen auf veränderte Genexpression von TIMP-1 und TIMP-2 im Vergleich zu Myokardproben von gesunden altersgleichen Kontrollenpersonen. Sie zeigten in ihren Untersuchungen bei den Patientenproben mit Linksherzhypertrophie eine Erhöhung der TIMP-1 und TIMP-2 mRNA Expression (Heymans 2005 1136-44).

Auch Fielitz et al. zeigten in ihren Untersuchungen bei Patienten mit Linksherzhypertrophie durch Aortenstenose eine erhöhte Expression von TIMP-2 und TIMP-3 mRNA (Fielitz 2004 809-20). Im Gegensatz zu Heymans Ergebnissen konnten sie bei den Myokardproben von den Patienten mit Aortenstenose jedoch eine Erniedrigung der TIMP-1 mRNA und eine unveränderte TIMP-4 mRNA nachweisen.

Vergleicht man Heymans und Fielitz's Studien, so wurde der Zeitpunkt der Probeentnahme durch die Operation (Aortenklappenersatz) festgelegt, wobei die Myokardhypertrophie unterschiedlich fortgeschritten war. Fielitz's Patienten hatten eine linksventrikuläre Hinterwanddicke im Mittel von $15 \pm 0,6$ mm. Im Gegensatz dazu lag die Hinterwanddicke von Heymans Patienten im Mittel bei $13 \pm 0,4$ mm.

Es lässt sich also feststellen, dass der Schweregrad der Hypertrophie ein bedeutendes Kriterium für die Expression der TIMPs während der verschiedenen Stadien der kardialen Herzhypertrophie ist. So fanden Li et al. schon 2000 bei hypertensiven Ratten mit einer kompensierten Myokardhypertrophie eine Aufregulation der MMP-2 mRNA (Li 2000 214-24). Weiter fand er eine erhöhte mRNA Expression und Proteinexpression von TIMP-1 und TIMP-2. Entsprechend zeigte sich in unserem Modell einer biventrikulären Hypertrophie durch Anlage eines aortopulmonalen Shunts eine Aufregulation von MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 auf Transkriptionsebene. Das Verfehlen der Signifikanzgrenze ist dabei vermutlich auf die kleine Fallzahl ($n=7$) und die im Vergleich dazu große Varianz der Werte zurückzuführen. Im Gegensatz zu Li et al., deren Versuchstiere keine Veränderungen der TIMP-3 Expression und eine Herabregulation des TIMP-4 zeigten, konnten wir eine Aufregulation von TIMP-3 mRNA biventrikulär feststellen. Weiterhin zeigten unsere Versuchstiere eine Aufregulation des herzspezifischen TIMP-4 auf mRNA- und Proteinebene.

Der Grad der Hypertrophie spielt weiterhin eine Rolle bei dem Übergang von der kompensierten kardialen Funktion zur funktionellen Dekompensation (Eichhorn and Bristow 1996 2285-96).

In einer Arbeit von Tozzi wurde die MMP-Aktivität und die TIMP-Abundanz bei hypertrophierten Schweineherzen mit Aortenbanding untersucht. Sie konnten zeigen, dass im Stadium der Kompensation die MMP-Aktivität gesteigert war und

im Stadium der Dekompensation die MMP-Aktivität in Relation zur TIMP-Abundanz abgesunken war. Daraus wurde geschlossen, dass die Aktivität und die Abundanz der extrazellulären Matrix-Proteine phasenabhängig sind (Tozzi 2007 663-9).

So lässt sich die Expressionsteigerung der mRNA für TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 unter dem Aspekt eines alternierenden und zeitabhängigen Gleichgewichts zwischen Inhibitoren und Aktivatoren betrachten. In unserem Versuchsaufbau wurde die Regulation nicht zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, sondern die Veränderung nach einem definierten Zeitpunkt von 21 ± 2 Tagen.

Auf Proteinebene konnten wir im Gegensatz zur Transkriptionsebene kein einheitliches Bild sehen. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Coker konnten wir linksventrikulär eine gesteigerte Abundanz für MMP-2 finden (Coker 1998 H1516-23). Weiter konnten wir jedoch weder für die MMPs noch für ihre Inhibitoren eine Veränderung in der Aktivität der Proteine nachweisen.

Zu den gleichen Ergebnissen kam Li et al 2000, der die MMP-1, -2 und -3 Aktivität bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion vor und nach Implantation eines linksventrikulären Unterstützungssystems untersuchte.

Iwanaga et al untersuchten in ihrem Modell die verschiedenen Aktivitätsgrade der Matrixmetalloproteinasen vom linksventrikulären Remodeling hin zum manifesten Herzfehler. Sie konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Aktivität des MMP-2 zeitabhängig ist (Iwanaga 2002 1384-91). Dabei folgte auf eine unveränderte myokardiale MMP-2 Aktivität im Stadium der kompensierten Hypertrophie eine Steigerung der MMP-2 Aktivität im Verlauf der Dekompensation nach 17 Wochen. Die von uns beobachteten unveränderten MMP-2 Aktivitäten würden demnach darauf hinweisen, dass sich die Shunttiere auch zum Zeitpunkt unserer Untersuchung im Stadium der kompensierten kardialen Hypertrophie befanden. Diese unveränderten MMP-2-Aktivitäten könnten durch die Tissue Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, die stöchiometrisch MMP 1:1 binden und so einen direkten Effekt auf die Aktivität der MMPs haben, begründet sein. (Thomas 1998

1708-15; Feldman 2001 654-5; Heeneman 2003 516-25; Visse and Nagase 2003 827-39).

Dass die MMP-2 mRNA und Proteinexpression im Gegensatz dazu eine Aufregulation zeigten, deutet auf eine Regulation auf verschiedenen Ebene hin (Briest 2003 379-387).

Auch Nagatomo et al. zeigten, dass längere Druckbelastung die MMP-Aktivität wieder auf ein physiologisches Level herabfallen lässt und diese Beobachtung mit dem Kontrollverlust der Inhibitoren einhergeht (Nagatomo 2000 H151-61).

Daraus lässt sich schließen, dass progrediente Herzerkrankungen mit komplexen zeitabhängigen Regulationsmechanismen der extrazellulären Matrix verbunden sind. Die extrazelluläre Matrix steht unter ständiger Kontrolle der MMPs, deren Umsatz einer fortlaufenden Regulation durch verschiedene Faktoren unterliegt (Li 2000 214-24). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass myokardiale MMP- und TIMP-Expression bei kompensierter Herzhypertrophie erhöht sind. So lässt sich weiterhin sagen, dass nicht nur die Expression der MMPs und TIMPs für sich eine entscheidende Rolle im myokardialen Remodeling spielen, sondern gleichzeitig auch deren Fließgleichgewicht (Gupta and Grande-Allen 2006 375-83).

4.5 Expression von MMPs und ihren Inhibitoren TIMPs bei kongenitaler biventrikulärer Hypertrophie im Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel

Die rechtsventrikuläre Funktion ist eine entscheidende Determinante im Langzeitverlauf bei Patienten mit komplexen kongenitalen Herzfehlern, chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen und pulmonaler Hypertension (Bolger 2003 970-6; Faber 2007 197-209).

Bei vielen Formen der angeborenen Herzfehler unterliegt der rechte Ventrikel abnormalen Belastungsbedingungen, die in rechtsventrikulärer Hypertrophie und Remodeling resultieren. Der permanente Fortschritt in der Behandlung von

Patienten mit angeborenen Herzfehlern hat das Überleben gesteigert. Dieser Prozess resultiert jedoch gleichzeitig auch in der Zunahme von Erwachsenen mit unphysiologischen rechtsventrikulären Belastungsbedingungen (Wren and O'Sullivan 2001 438-43).

Die initiale Adaption des rechten Ventrikels an die Belastung beinhaltet Hypertrophie und Remodeling. Zu diesem Zeitpunkt ist die rechtsventrikuläre Funktion noch gut erhalten und wird als kompensierte rechtsventrikuläre Myokardhypertrophie bezeichnet. In diesem Stadium ist der rechte Ventrikel noch fähig, die erhöhte Belastung auszugleichen. Auf längere Zeit hin wird er jedoch dekomensieren und es wird zu einem Rechtsherzversagen kommen.

Ist der rechte Ventrikel in der Lage, langfristig die Zirkulation des Systemkreislaufs zu übernehmen?

Pettersen et al. beschäftigten sich zu dieser Fragestellung mit dem Kontraktionsmuster des rechten Ventrikel als Systemventrikel (Pettersen 2007 2450-6). Sie konnten in ihrer Studie zeigen, dass es im rechten Ventrikel, der als Systemventrikel fungierte, im Vergleich zum normalen rechten Ventrikel bei der Kontraktion eine Verlagerung von der longitudinalen Verkürzung hin zur circumferenten Verkürzung gab. Dieses Kontraktionsmuster ähnelt dem normalen linken Ventrikel und würde die Änderung in der Ventrikelgeometrie und/oder die myokardiale Hypertrophie erklären.

In unserem Modell kam es nach 21 ± 2 Tagen zu einer biventrikulären Herzhypertrophie, die rechtsventrikulär stärker ausgebildet war. So war das rechtsventrikuläre Gewicht im Verhältnis zum Körpergewicht (LV/KG) um 91% gegenüber den Kontrollen gesteigert, während die Erhöhung im linken Ventrikel mit 79% deutlich geringer ausfiel. Wie Eichhorn in seiner Arbeit zeigte, spielt der Schweregrad der Hypertrophie eine entscheidende Rolle bei dem Übergang der kompensierten kardialen Funktion zur funktionellen Dekompensation (Eichhorn and Bristow 1996 2285-96). Kardiale Hypertrophie geht mit extrazellulärem Remodeling einher. MMPs und TIMPs spielen eine entscheidende Rolle bei diesem kardialen Remodeling.

Herpel et al untersuchten in ihrer Arbeit den Unterschied im Aufteilungsmuster der MMPs und der TIMPs zwischen linken und rechten Ventrikel (Herpel 2005 369-78). Sie konnten zeigen, dass bei Dilatativer Kardiomyopathie und Ischämischer Kardiomyopathie MMPs im rechten Ventrikel, anders als im linken, aufreguliert waren. Der Nachweis der MMPs und TIMPs erfolgte jedoch indirekt über detektierte Fibroblasten, mit der Hypothese, dass je mehr Substrat in einem Gebiet vorhanden ist, desto mehr MMPs müssen dort expremiert sein (Unverferth 1986 816-20).

Die meisten Arbeitsgruppen beschäftigen sich im Zusammenhang mit Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix (Unverferth 1986 816-20; Nogami 1996 483-94; Mundhenke 1997 265-73; Rossi 1998 1031-41; Bergman 2007 H1847-60) nur mit dem linken oder dem rechten Ventrikel.

In unserem Modell verglichen wir die Expression der extrazellulären Matrix Proteine im linken und rechten hypertrophierten Ventrikel nach 21 ± 2 Tagen Volumen- bzw. Druck- und Volumenbelastung.

Die MMP-2 mRNA Expression war im rechten Ventrikel im Vergleich zum linken um das 4,5-fache erhöht. Die Aktivitäten für die MMPs waren signifikant für proMMP-2 und MMP-2 ($p < 0,0001$, $p < 0,001$) im rechten Ventrikel gegenüber dem linken gesteigert.

Auch die TIMP-1,-2,-3 und -4 mRNA war im rechten Ventrikel gegenüber dem linken vermehrt expremiert. Bei der Aktivität der Inhibitoren konnten wir für Total-TIMP eine signifikante Steigerung im rechten hypertrophierten Ventrikel gegenüber dem linken nachweisen.

Stellt man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den Herzgewichten, so lässt sich erkennen, dass je stärker die Herzhypertrophie ausgeprägt ist, desto stärker ist auch die Expression der MMPs und ihrer Inhibitoren.

Eine weitere mögliche Ursache für die Differenz zwischen dem rechten und linken Ventrikel ergibt sich, wie vorstehend diskutiert, aus den verschiedenen

Kontraktionsmustern der Ventrikel und die dadurch unterschiedlich ausgeprägte Hypertrophie, die wiederum dann eine unterschiedlich stark exprimierte MMP und TIMP mRNA und Aktivität verursacht.

Bei vielen operativen Therapien von kongenitalen Herzfehlern, wie zum Beispiel der Senning Operation, wird der rechte Ventrikel zum Systemventrikel.

Es wurde gezeigt, dass es bei diesen Operationen bei einigen der Patienten zu einem Rechtsherzversagen kam (Rentzsch 2005 524-31). Diese Beobachtungen am Menschen stützen unsere Annahme, dass die erhöhte Expression der MMPs und TIMPs im rechten Ventrikel auf eine geringere Toleranzbreite des rechten Ventrikels auf Druck- und Volumenbelastung basiert, beziehungsweise einen höheren Umsatz an extrazellulärer Matrix hat als der Linke. Folglich ist dies der erste Schritt zur Dekompensation.

Zusammenfassend kann zur Lösung der Fragestellung dieser Dissertation gesagt werden, dass in unserem Modell realitätsgetreu ein kongenitaler Herzfehler mit Veränderungen des pulmonalen Blutflusses, des pulmonal-systemischen Flussverhältnisses ($Q_p:Q_s$), des diastolischen Drucks und des Quotienten aus pulmonalarteriellen und systemischem Druck simuliert werden konnte.

Auch bei dem vorliegenden Modell einer kongenitalen biventrikulären Hypertrophie lässt sich eine Erhöhung des BNP-Plasmaspiegels und der BNP-Expression in den Ventrikeln nachweisen. Dies ist, wie in anderen Modellen, auf eine fetale Genaktivierung zurückzuführen.

Die Induktion einer biventrikulären Hypertrophie durch einen angeborenen Links-Rechts-Shunt führt zur Aufregulation bestimmter MMPs und TIMPs auf Transkriptions- und Translationsebene im Sinne einer komplexen und zeitabhängigen Regulation.

Im rechten Ventrikel der Shunttiere waren Transkript und Aktivität der untersuchten Proteine im Vergleich zum linken Ventrikel gesteigert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der rechte Ventrikel eine geringere Toleranzbreite aufweist als der linke.

5 Zusammenfassung

Eine Querverbindung zwischen *Aorta descendens* und *Arteria pulmonalis* führt durch den Links-Rechts-Shunt zu einer Volumenbelastung des linken Herzens und einer Druckbelastung des rechten Herzens. Abhängig von dem Shuntvolumen sind die Folgeerscheinungen eine vermehrte Lungendurchblutung und eine biventrikuläre Hypertrophie. Die Pathogenese der Myokardhypertrophie geht mit Veränderungen von extrazellulären Matrixproteinen einher. Die myokardialen Umbauvorgänge werden Remodeling genannt und sind unter anderem durch die Anpassung des Interstitiums an die neuen Arbeitsbedingungen charakterisiert. Bei allen physiologischen und pathologischen extrazellulären Umbauvorgängen spielt die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle. Die proteolytisch wirksamen Matrixmetalloproteinasen regulieren die Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix. Die Balance der Umbau- und Abbauvorgänge der extrazellulären Matrix ist für die Erhaltung der Matrix limitierend. Ihre Aktivität wird auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene und von endogenen Inhibitoren, den TIMPs, streng reguliert.

Um den Zusammenhang zwischen kongenitaler Hypertrophie und der Expression und Interaktion von MMPs und TIMPs auf verschiedenen Regulationsebenen zu untersuchen, wurde ein Tiermodell zur Induktion einer kongenitalen biventrikulären Herzhypertrophie durch intrauterine Anlage eines 8mm großen aortopulmonalen Shunts etabliert.

An hochträchtigen Schafen wurde 6 ± 1 Tage vor der natürlichen Geburt an den Feten ein 8mm AP-Shunt intrauterin angelegt. Weiterhin untersuchten wir in unserem Modell den hämodynamischen Zustand bei diesem kongenitalen Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt und untersuchten weiterhin die Abundanz des natriuretischen Peptides BNP, das als Biomarker der Herzhypertrophie angesehen wird.

Nach einem 21 tägigen Beobachtungszeitraum konnte eine biventrikuläre Hypertrophie bei den Lämmern mit Shunt gegenüber den gesunden altersgleichen

Tieren gezeigt werden. Dabei war die rechtsventrikuläre Massenzunahme mit 91% größer als die linksventrikuläre Herzgewichtszunahme mit 79%.

Mit hämodynamischen Messungen konnten wir nach Links-Rechts-Shuntanlage eine Erhöhung des pulmonalen Blutflusses, des pulmonal-systemischen Flussverhältnisses ($Q_p:Q_s$), des Quotienten aus pulmonalarteriellen und systemischem Druck und eine Erniedrigung des diastolischen Drucks nachweisen. Mit unserem Modell simulierten wir realitätsgetreu einen angeborenen Herzfehler mit erhöhtem pulmonalvaskulärem Fluss.

Bei den Untersuchungen des natriuretischen Peptids BNP, zeigte sich sowohl im Plasma als auch auf RNA Ebene eine deutliche Erhöhung gegenüber den gesunden Kontrolltieren.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen zur Genexpression der extrazellulären Matrixproteine konnten wir eine biventrikuläre Aufregulation der RNA von MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 sehen. Auf translationaler Ebene konnte eine Aufregulation von MMP-2 und TIMP-1 im linken Ventrikel gezeigt werden. Der Vergleich von linkem und rechtem Ventrikel in der Gruppe der Shunttiere zeigte für alle untersuchten Genen eine stärkere Genexpression im rechten Ventrikel. Auch auf posttranslationaler Ebene zeigte sich eine signifikante Aufregulation für pro-MMP-2, MMP-2 und Total-MMP im rechten Ventrikel.

Aufgrund der intrauterinen Anlage des aortopulmonalen Shunts und dem damit für das Modell entscheidenden verzögerten Abfall des pulmonalvaskulären Widerstands konnten wir die hämodynamischen Ergebnisse in dem Sinn deuten, dass wir mit unserem Modell eine authentische Simulation eines kongenitalen Herzfehlers mit konsekutiver biventrikulärer Hypertrophie simulierten. Die molekularbiologischen Ergebnisse zeigen, dass eine gesteigerte Expression von MMPs und TIMPs auf verschiedenen Regulationsebenen in diesem Modell einer kongenitalen biventrikulären Hypertrophie auftritt. Weiterhin konnten wir aufgrund einer wahrscheinlich geringeren Toleranzbreite des rechten Ventrikels auf Druck- und Volumenbelastung ein vermehrtes Remodeling im rechten im Vergleich zum linken Ventrikel nachweisen.

6 Literaturverzeichnis

- Azaki, A., J. R. Fineman and Y. He (2006). "Myocardial transcription factors are modulated during pathologic cardiac hypertrophy in vivo." J Thorac Cardiovasc Surg 132(6): 1262-71.
- Bergman, M. R., J. R. Teerlink, R. Mahimkar, L. Li, B. Q. Zhu, A. Nguyen, S. Dahi, J. S. Karliner and D. H. Lovett (2007). "Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(4): H1847-60.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo and J. A. Engler (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med 4(2): 197-250.
- Bolger, A. P., A. J. Coats and M. A. Gatzoulis (2003). "Congenital heart disease: the original heart failure syndrome." Eur Heart J 24(10): 970-6.
- Boluyt, M. O. and O. H. L. Bing (2000). "Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model." Cardiovasc-Res 46: 239-249.
- Bove, A. A. and W. P. Santamore (1981). "Ventricular interdependence." Prog Cardiovasc Dis 23(5): 365-88.
- Briest, W., A. Hölzl, B. Rassler, A. Deten, H. A. Baba and H.-G. Zimmer (2003). "Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts." Cardiovasc-Res 57: 379-387.
- Cameron, V. A. and L. J. Ellmers (2003). "Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation." Endocrinology 144(6): 2191-4.
- Carabello, B. A. (2002). "Concentric versus eccentric remodeling." J Card Fail 8(6 Suppl): S258-63.
- Chancey, A. L., G. L. Brower, J. T. Peterson and J. S. Janicki (2002). "Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload." Circulation 105(16): 1983-8.
- Coker, M. L., C. V. Thomas, M. J. Clair, J. W. Hendrick, R. S. Krombach, Z. S. Galis and F. G. Spinale (1998). "Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure." Am J Physiol 274(5 Pt 2): H1516-23.
- Creemers, E. E., J. N. Davis, A. M. Parkhurst, P. Leenders, K. B. Dowdy, E. Hapke, A. M. Hauet, P. G. Escobar, J. P. Cleutjens, J. F. Smits, M. J. Daemen, M. R. Zile and F. G. Spinale (2003). "Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(1): H364-71.
- Day, M. L., D. Schwartz, R. C. Wiegand, P. T. Stockman, S. R. Brunnert, H. E. Tolunay, M. G. Currie, D. G. Standaert and P. Needleman (1987). "Ventricular atriopeptin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone." Hypertension 9(5): 485-91.
- de Bold, A. J., B. G. Bruneau and M. L. Kuroski de Bold (1996). "Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart." Cardiovasc Res 31(1): 7-18.
- Dzimiri, N., A. Moorji, B. Afrane and Z. Al-Halees (2002). "Differential regulation of atrial and brain natriuretic peptides and its implications for the management of left ventricular volume overload." Eur J Clin Invest 32(8): 563-9.
- Eichhorn, E. J. and M. R. Bristow (1996). "Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure." Circulation 94(9): 2285-96.
- Eppinger, E. C., C. S. Burwell and R. E. Gross (1941). "The Effects Of The Patent Ductus Arteriosus On The Circulation." J Clin Invest 20(2): 127-43.

- Faber, M. J., M. Dalinghaus, I. M. Lankhuizen, K. Bezstarosti, A. J. Verhoeven, D. J. Duncker, W. A. Helbing and J. M. Lamers (2007). "Time dependent changes in cytoplasmic proteins of the right ventricle during prolonged pressure overload." J Mol Cell Cardiol 43(2): 197-209.
- Fasules, J. W., F. Tryka, C. W. Chipman and S. H. Van Devanter (1994). "Pulmonary hypertension and arterial changes in calves with a systemic-to-left pulmonary artery connection." J Appl Physiol 77(2): 867-75.
- Feldman, A. M., Y. Y. Li and C. F. McTiernan (2001). "Matrix metalloproteinases in pathophysiology and treatment of heart failure." Lancet 357(9257): 654-5.
- Fielitz, J., M. Leuschner, H. R. Zurbrugg, B. Hannack, R. Pregla, R. Hetzer and V. Regitz-Zagrosek (2004). "Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis." J Mol Med 82(12): 809-20.
- Fogel, M. A., P. M. Weinberg, K. B. Gupta, J. Rychik, A. Hubbard, E. A. Hoffman and J. Haselgrove (1998). "Mechanics of the single left ventricle: a study in ventricular-ventricular interaction II." Circulation 98(4): 330-8.
- Fratz, S., B. Meyrick, B. Ovadia, M. J. Johengen, O. Reinhartz, A. Azakie, G. Ross, R. Fitzgerald, P. Oishi, J. Hess, S. M. Black and J. R. Fineman (2004). "Chronic endothelin A receptor blockade in lambs with increased pulmonary blood flow and pressure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287(3): L592-7.
- Goetze, J. P., L. Friis-Hansen, J. F. Rehfeld, B. Nilsson and J. H. Svendsen (2006). "Atrial secretion of B-type natriuretic peptide." Eur Heart J 27(14): 1648-50.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji and U. P. Thorgeirsson (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J Cell Biol 74(2): 111-22.
- Gupta, V. and K. J. Grande-Allen (2006). "Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells." Cardiovasc Res 72(3): 375-83.
- Hassall, C. J., J. Wharton, S. Gulbenkian, J. V. Anderson, J. Frater, D. J. Bailey, A. Merighi, S. R. Bloom, J. M. Polak and G. Burnstock (1988). "Ventricular and atrial myocytes of newborn rats synthesise and secrete atrial natriuretic peptide in culture: light- and electron-microscopical localisation and chromatographic examination of stored and secreted molecular forms." Cell Tissue Res 251(1): 161-9.
- Hawe, A., A. G. Tsakiris, G. C. Rastelli, J. L. Titus and D. C. McGoon (1972). "Experimental studies of the pathogenesis of pulmonary vascular obstructive disease." J Thorac Cardiovasc Surg 63(4): 652-64.
- Heeneman, S., J. P. Cleutjens, B. C. Faber, E. E. Creemers, R. J. van Suylen, E. Lutgens, K. B. Cleutjens and M. J. Daemen (2003). "The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis." J Pathol 200(4): 516-25.
- Herpel, E., S. Singer, C. Flechtenmacher, M. Pritsch, F. U. Sack, S. Hagl, H. A. Katus, M. Haass, H. F. Otto and P. A. Schnabel (2005). "Extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases differ between various right and left ventricular sites in end-stage cardiomyopathies." Virchows Arch 446(4): 369-78.
- Hersey, R. M., M. A. Nazir, K. D. Whitney, R. M. Klein, R. D. Sale, D. A. Hinton, J. Weisz and V. H. Gattone, 2nd (1989). "Atrial natriuretic peptide in heart and specific binding in organs from fetal and newborn rats." Cell Biochem Funct 7(1): 35-41.
- Heymans, S., B. Schroen, P. Vermeersch, H. Milting, F. Gao, A. Kassner, H. Gillijns, P. Herijgers, W. Flameng, P. Carmeliet, F. Van de Werf, Y. M. Pinto and S. Janssens (2005). "Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart." Circulation 112(8): 1136-44.

- Hoffman, J. I., A. M. Rudolph and M. A. Heymann (1981). "Pulmonary vascular disease with congenital heart lesions: pathologic features and causes." Circulation 64(5): 873-7.
- Hosoda, K., K. Nakao, M. Mukoyama, Y. Saito, M. Jougasaki, G. Shirakami, S. Suga, Y. Ogawa, H. Yasue and H. Imura (1991). "Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle." Hypertension 17(6 Pt 2): 1152-5.
- Iwanaga, Y., T. Aoyama, Y. Kihara, Y. Onozawa, T. Yoneda and S. Sasayama (2002). "Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats." J Am Coll Cardiol 39(8): 1384-91.
- Kawakami, H., H. Okayama, M. Hamada and K. Hiwada (1996). "Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats." Clin Sci (Lond) 90(3): 197-204.
- Krum, H. (2005). "The Task Force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: full text (update 2005)." Eur Heart J 26(22): 2472; author reply 2473-4.
- Larsen, T. H., H. S. Huitfeldt, O. Myking and T. Saetersdal (1993). "Microtubule-associated distribution of specific granules and secretion of atrial natriuretic factor in primary cultures of rat cardiomyocytes." Cell Tissue Res 272(2): 201-10.
- Li, Y. Y., C. F. McTiernan and A. M. Feldman (2000). "Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling." Cardiovasc Res 46(2): 214-24.
- Mann, D. L. and F. G. Spinale (1998). "Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds." Circulation 98(17): 1699-702.
- Maron, B. J., V. J. Ferrans and W. C. Roberts (1975). "Myocardial ultrastructure in patients with chronic aortic valve disease." Am J Cardiol 35(5): 725-39.
- Michel, R. P., T. S. Hakim, R. E. Hanson, A. R. Dobell, F. Keith and D. Drinkwater (1985). "Distribution of lung vascular resistance after chronic systemic-to-pulmonary shunts." Am J Physiol 249(6 Pt 2): H1106-13.
- Minami, S., T. Onodera, F. Okazaki, H. Miyazaki, S. Ohsawa and S. Mochizuki (2006). "Myocyte morphological characteristics differ between the phases of pulmonary hypertension-induced ventricular hypertrophy and failure." Int Heart J 47(4): 629-37.
- Mukoyama, M., K. Nakao, K. Hosoda, S. Suga, Y. Saito, Y. Ogawa, G. Shirakami, M. Jougasaki, K. Obata, H. Yasue and et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest 87(4): 1402-12.
- Mundhenke, M., B. Schwartzkopff and B. E. Strauer (1997). "Structural analysis of arteriolar and myocardial remodelling in the subendocardial region of patients with hypertensive heart disease and hypertrophic cardiomyopathy." Virchows Arch 431(4): 265-73.
- Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res 69(3): 562-73.
- Nagatomo, Y., B. A. Carabello, M. L. Coker, P. J. McDermott, S. Nemoto, M. Hamawaki and F. G. Spinale (2000). "Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control." Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(1): H151-61.
- Nakamura, M., F. Tanaka, S. Yonezawa, K. Satou, M. Nagano and K. Hiramori (2003). "The limited value of plasma B-type natriuretic peptide for screening for left ventricular hypertrophy among hypertensive patients." Am J Hypertens 16(12): 1025-9.
- Nogami, K., S. Kusachi, H. Nunoyama, J. Kondo, C. Endo, K. Yamamoto, T. Murakami and T. Tsuji (1996). "Extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy.

- Immunohistochemical study of endomyocardial biopsy specimens." Jpn Heart J 37(4): 483-94.
- Opie, L. H., P. J. Commerford, B. J. Gersh and M. A. Pfeffer (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet 367(9507): 356-67.
- Orlowska-Baranowska, E., R. Baranowski, L. Greszata and J. Stepinska (2008). "Brain natriuretic peptide as a marker of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis." J Heart Valve Dis 17(6): 598-605.
- Palazzuoli, A., F. Iovine, M. Gallotta and R. Nuti (2007). "Emerging cardiac markers in coronary disease: role of brain natriuretic peptide and other biomarkers." Minerva Cardioangiol 55(4): 491-6.
- Peterson, J. T., H. Hallak, L. Johnson, H. Li, P. M. O'Brien, D. R. Sliskovic, T. M. Bocan, M. L. Coker, T. Etoh and F. G. Spinale (2001). "Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure." Circulation 103(18): 2303-9.
- Pettersen, E., T. Helle-Valle, T. Edvardsen, H. Lindberg, H. J. Smith, B. Smevik, O. A. Smiseth and K. Andersen (2007). "Contraction pattern of the systemic right ventricle shift from longitudinal to circumferential shortening and absent global ventricular torsion." J Am Coll Cardiol 49(25): 2450-6.
- Reddy, V. M., B. Meyrick, J. Wong, A. Khor, J. R. Liddicoat, F. L. Hanley and J. R. Fineman (1995). "In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs." Circulation 92(3): 606-13.
- Rentzsch, A., M. Y. Abd El Rahman, W. Hui, A. Helweg, P. Ewert, M. Gutberlet, P. E. Lange, F. Berger and H. Abdul-Khaliq (2005). "Assessment of myocardial function of the systemic right ventricle in patients with D-transposition of the great arteries after atrial switch operation by tissue Doppler echocardiography." Z Kardiol 94(8): 524-31.
- Rossi, M. A. (1998). "Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans." J Hypertens 16(7): 1031-41.
- Saito, Y., K. Nakao, H. Arai, K. Nishimura, K. Okumura, K. Obata, G. Takemura, H. Fujiwara, A. Sugawara, T. Yamada and et al. (1989). "Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart." J Clin Invest 83(1): 298-305.
- Scott, J. N. and L. Jennes (1987). "Distribution of atrial natriuretic factor in fetal rat atria and ventricles." Cell Tissue Res 248(2): 479-81.
- Sengupta, P. P., J. Korinek, M. Belohlavek, J. Narula, M. A. Vannan, A. Jahangir and B. K. Khandheria (2006). "Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging." J Am Coll Cardiol 48(10): 1988-2001.
- Spinale, F. G. (2002). "Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart." Circ Res 90(5): 520-30.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, C. V. Thomas, J. D. Walker, R. Mukherjee and L. Hebbar (1998). "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(4): 482-95.
- Spinale, F. G., H. Gunasinghe, P. D. Sprunger, J. M. Baskin and W. C. Bradham (2002). "Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure." J Card Fail 8(6 Suppl): S332-8.
- Swynghedauw, B. (1999). "Molecular mechanisms of myocardial remodeling." Physiol Rev 79(1): 215-62.
- Thibault, G., F. Amiri and R. Garcia (1999). "Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart." Annu Rev Physiol 61: 193-217.

- Thomas, C. V., M. L. Coker, J. L. Zellner, J. R. Handy, A. J. Crumbley, 3rd and F. G. Spinale (1998). "Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy." Circulation 97(17): 1708-15.
- Tozzi, R., G. Palladini, S. Fallarini, R. Nano, C. Gatti, C. Presotto, A. Schiavone, R. Micheletti, P. Ferrari, R. Fogari and S. Perlini (2007). "Matrix metalloprotease activity is enhanced in the compensated but not in the decompensated phase of pressure overload hypertrophy." Am J Hypertens 20(6): 663-9.
- Unverferth, D. V., P. B. Baker, S. E. Swift, R. Chaffee, J. K. Fetters, B. F. Uretsky, M. E. Thompson and C. V. Leier (1986). "Extent of myocardial fibrosis and cellular hypertrophy in dilated cardiomyopathy." Am J Cardiol 57(10): 816-20.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res 92(8): 827-39.
- Wei, Y. F., C. P. Rodi, M. L. Day, R. C. Wiegand, L. D. Needleman, B. R. Cole and P. Needleman (1987). "Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system." J Clin Invest 79(5): 1325-9.
- Wess, T. J. and D. E. Cairns (2005). "Nanoarchitectures of the animal extracellular matrix: opportunities for synchrotron radiation studies on collagen and fibrillin." J Synchrotron Radiat 12(Pt 6): 751-7.
- Wren, C. and J. J. O'Sullivan (2001). "Survival with congenital heart disease and need for follow up in adult life." Heart 85(4): 438-43.
- Yacoub, M. H. (1979). "The case for anatomic correction of transposition of the great arteries." J Thorac Cardiovasc Surg 78(1): 3-6.
- Yacoub, M. H. (1995). "Two hearts that beat as one." Circulation 92(2): 156-7.
- Yamazaki, T. and Y. Yazaki (2000). "Molecular basis of cardiac hypertrophy." Z Kardiol 89(1): 1-6.
- Yamazaki, T. and Y. Yazaki (2000). "Molecular basis of cardiac hypertrophy." Z-Kardiol 89(1): 1-6.
- Yang, Y. N., D. Bauer, S. Wasmuth, K. P. Steuhl and A. Heiligenhaus (2003). "Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and 2) during the course of experimental necrotizing herpetic keratitis." Exp Eye Res 77(2): 227-37.
- Yu, W. H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew and J. F. Woessner, Jr. (2000). "TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix." J Biol Chem 275(40): 31226-32.

7 Abkürzungsverzeichnis

AP	aortopulmonal
ANP	atrial natriuretic peptide
BNP	brain natriuretic peptide
CNP	c-type natriuretic peptide
D	Deutschland
MMP	Matrixmetalloproteinasen
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
kDa	kilo Dalton
IPPV	intermittent positive pressure ventilation
i.v.	intravenös
i.m.	intramuskulär
BSA	bovines Serumalbumin
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
IL	Interleukin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time Polymerase-Kettenreaktion
Rpm	round per minute
n.s.	nicht signifikant
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck

8 Tabellen- u. Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen	84
Tabelle 2	Übersicht über die Gruppeneinteilung und den Versuchsablauf	13
Tabelle 3	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Western Blot	85
Tabelle 4	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Zymographie und Reverse Zymographie	88
Tabelle 5	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Real time RT-PCR	89
Tabelle 6	Primer-Sequenzen für die Real time RT-PCR	90
Tabelle 7	Reagenz für das Radioimmunassay	90
Tabelle 8	Real time RT-PCR Ansatz	24
Tabelle 9	Thermocyclereinstellungen für das One-Step RT-PCR Kit	25
Tabelle 10	Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für den Westernblot	29
Tabelle 11	Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für die Zymographie	31
Tabelle 12	Zusammensetzung von Sammel-/Trenngel für die Reverse Zymographie	33
Tabelle 13	Hämodynamische Daten	38
Abbildung 1	Domänenstruktur eines MMP am Beispiel des MMP-2, -9	7
Abbildung 2	Muttertier in Rückenlage auf dem Operationstisch, Operationsgebiet steril abgewaschen	14
Abbildung 3	Exposition des Lammfetens in der Fruchtblase	15
Abbildung 4	Eröffnete Fruchtblase, exponierte linke Extremität des Lammfetens	15
Abbildung 5	Blick auf die umschlungene <i>Aorta ascendens</i> , nach linkslateraler Thorakotomie	16
Abbildung 6	Partiell ausgeklemmte Pulmonalarterie, 8mm Polytetrafluoroethylen Gefäßprothese mit fortlaufender Naht End-zu-Seit anastomosiert	16

Abbildung 7	Partiell ausgeklemmte <i>Aorta ascendens</i>	17
Abbildung 8	AP-Shunt	17
Abbildung 9	Verschluss der Fruchtblase	18
Abbildung 10	Präoperative Vorbereitung beim Lamm, Pulsoxymeter , Tubus, Venöser Katheter und Arterieller Katheter	19
Abbildung 11	Intraoperative Situation: Hämodynamische Messung, Katheter im linken Vorhof, Katheter in der Pulmonalarterie und Flusssonde um die linke Pumonalarterie	20
Abbildung 12	Längs inzidierte <i>Aorta ascendens</i> mit Blick in den offenen Shunt	21
Abbildung 13	Laufprotokoll für die RT-PCR	25
Abbildung 14	Phasen der PCR Produktakkumulation, Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl	26
Abbildung 15	Eichkurve am Beispiel von GAPDH	27
Abbildung 16	Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität des Produktes	28
Abbildung 17	Standardkurve zur Bestimmung der BNP-Plasmakonzentration	34
Abbildung 18	Vergleich der Mittelwerte der Gewichte des linken und rechten Ventrikels	36
Abbildung 19	Verhältnis von pulmonalarteriellem Mitteldruck zu systemarteriellem Mitteldruck	39
Abbildung 20	Vergleich der systemischen diastolischen Drücke von Kontroll- und Shunttieren	39
Abbildung 21	Verhältnis des pulmonalarteriellen Flusses zum Körpergewicht	40
Abbildung 22	Vergleich der BNP-Plasma Spiegel in den beiden Gruppen mittels Radioimmunassay	41
Abbildung 23	Grafische Darstellung der BNP Expression in Bezug zur Kontrollgruppe	42
Abbildung 24	Grafische Darstellung der BNP Expression im rechten hypertrophierten Ventrikel in Relation zum linken Ventrikel	42
Abbildung 25	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte MMP-2 und BNP	43

Abbildung 26	Veränderung der MMP-2 mRNA Expression im hypertrophierten Ventrikel (Shunt) in Relation zum gesunden Ventrikel (Kontrolle)	44
Abbildung 27	Veränderung der MMP-2 mRNA Expression im rechten hypertrophierten Ventrikel in Relation zum linken hypertrophierten Ventrikel	44
Abbildung 28	Elektrophoretische Auftrennung der PCR- Produkte (TIMP-1,-2,-3,-4)	45
Abbildung 29	mRNA Expression der TIMPS im rechten Ventrikel	46
Abbildung 30	Repräsentative Westernblot Analyse des MMP-2 Proteins. Alternierender Auftrag von Shuntieren (SL) und Kontrolltieren (KL)	47
Abbildung 31	Vergleich der MMP-2 Proteinexpression von Kontroll- und Shunttieren im linken Ventrikel	47
Abbildung 32	Repräsentative Westernblot Analyse von TIMP-1 im linken Ventrikel	48
Abbildung 33	TIMP-1 Expression im Vergleich von Kontroll- und Shunttieren im linken Ventrikel	48
Abbildung 34	Proteinexpression im Bereich von 27-30 kDa.Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Shuntgruppe	49
Abbildung 35	Total TIMP-4 Expression im Vergleich von Kontroll- und Shunttieren für den linken und rechten Ventrikel	50
Abbildung 36	Repräsentative Gelatine Zymographie im rechten Ventrikel. Alternierender Auftrag Kontroll- und Shunttieren	51
Abbildung 37	Darstellung der verschiedenen MMP Aktivitäten in der Gruppe der Shunttiere im linken und rechten Ventrikel in Relation zu der Kontrollgruppe, wobei die Aktivität der Kontrolltiere eins ist	52
Abbildung 38	MMP-Aktivität im Vergleich von rechten und linken Ventrikel der Shuntgruppe	52
Abbildung 39	TIMP Aktivitäten der Shunttiere im linken und rechten Ventrikel im Vergleich zur Kontrollgruppe	53
Abbildung 40	Vergleich von linken und rechtem Ventrikel der Shunttiere für total TIMP bezogen auf die Kontrolltiere	54

9 Anhang

9.1 Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen

Tabelle 1: Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen

Subklasse	Name	Synonym	Größe	Substrate und Eigenschaften
Kollagenasen	MMP-1	Kollagenase-1	57kDa	Spaltet Kollagen Typ I, II, III, VII, X spezifisch an einer einzigen Peptidbindung, so dass Fragmente mit $\frac{1}{4}$ bzw. $\frac{3}{4}$ Länge des ursprünglichen Kollagens entstehen
	MMP-8	Kollagenase-2	91kDa	Kollagen Typ I, II, III, VII, X
	MMP-13	Kollagenase-3	54kDa	Kollagen Typ I, II, III, VII, X
	MMP-19	RASI-1, MMP-1	57kDa	Gelantine; fungiert als Autoantikörper bei Rheumatoiden Arthritis
Gelatinasen	MMP-2	Gelantinase A	72kDa	Gelatin Typ I, IV, V, X, Laminin V
	MMP-9	Gelantinase B	92kDa	Gelatin Typ I, IV, V, X, Laminin V
Stromalysine	MMP-3	Stromelysine 1	59kDa	Kollagene Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
	MMP-7	Matrilysin	28kDa	Gelatin, Fibronectin
	MMP-10	Stromelysine 2	53kDa	Kollagen Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
	MMP-11	Stromelysine 3	55kDa	α -1-Antiprotease
	MMP-12	Metalloelastase	54kDa	Elastin
	MMP-26	Matrilysin 2		unbekannt

Membran-Typ-MMPs	MMP-14	MT1-MMP	66kDa	Können MMP-2 und MMP-13 aktivieren MT1,2,3,und 5-MMP besitzen eine transmembranäre Domäne und einen zytoplasmatischen Anteil mit regulativer Funktion für die MMP-Aktivität; MT4-und MT6-MMP gehören zu den GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerten Proteine
	MMP-15	MT2-MMP		
	MMP-16	MT3-MMP		
	MMP-17	MT4-MMP		
	MMP-24	MT5-MMP		
	MMP-25	MT6-MMP		
Andere	MMP-4	Telopeptidase	35kDa	Spaltet Kollagen Typ I am C-terminalen Ende, Fibronectin
	MMP-5	$\frac{3}{4}$ -Kollagen-Endopeptidase	54kDa	Verdaut Fragmente von $\frac{3}{4}$ Länge, die nach Spaltung von Kollagen Typ I, II und III durch Kollagenasen entstehen.
	MMP-6	Saure Metalloproteinase	55kDa	Spaltet Proteoglykane i
	MMP-20	Enamelysin	54kDa	Vorkommen nur im Zahnschmelz
	MMP-23	CA-MMP		Besitzt kein Signalpeptid; ist zell-assoziiert; hohe Expression in reproduktivem Gewebe
	MMP-28	Epilysin		hohe Expression im Hoden

9.2 Western Blot

Tabelle 3: Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Western Blot

Prä-RIPA Puffer	50mM Tris HCL, pH 7,4 1% (v/v) NP 40 Igepal (Sigma, Taufkirchen, D.) 150mM NaCl
------------------------	---

	1mM <u>E</u> thlenediaminetetra <u>a</u> cetic, EDTA
RIPA-Puffer	Prä-RIPA Puffer 200mM Na-ortthovanadatLösung Protease-Inhibitor-Cocktail
Protease-Inhibitor-Cocktail	82% <u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luorid, PMSF 2% Aprotinin 8% Trypsin-Inhibitor 8% Leupeptin in PBS (Invitrogen, Karlsruhe, D.)
Bradford-Reagenz	Fertigreagenz (Sigma, Taufkirchen, D.)
10x Laufpuffer	0,25M Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.) 1,92M Glycin (Sigma, Taufkirchen, D.) 0,1% (w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.)
Blotting-Puffer	0,4% (w/v) SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.) 0,04 M Glycin (Sigma, Taufkirchen, D.) 20% Methanol 0,05M Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.)
Wasch-Puffer	BupH TBS (Pierce, Rockford, USA) Polyoxyethylensorbitanmonolaurate Tween20 (Sigma, Taufkirchen, D.)
Blocking-Puffer	Fertigreagenz nach Anleitung des Hersteller (Pierce, Rockford, USA)
Proteinmarker	MagicMarker XP (Invitrogen, Karlsruhe, D.)
5x Proteinsample Puffer	62,5mM Tris-HCL 2,7mM Glycerol (Sigma, Taufkirchen, D.) 20% (w/s) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.) 2% (w/s) Bromphenolblau β -Mercaptoethanol
Primäre-Antikörper	Mouse Anti-human MMP-2 Monoclonal Antibody (Chemicon, Schwalbach, D.) Rabbit Anti-TIMP-1 Polyclonal Antibody (Chemicon, Schwalbach, D.)

	<p>Rabbit Anti-TIMP-4 Polyclonal Antibody (Chemicon, Schwalbach, D.)</p> <p>Rabbit polyclonal to GAPDH (36840) (abcam, Cambridge, UK)</p>
Sekundäre-Antikörper	<p>Immuno Pure® Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce, Rockford, USA)</p> <p>Immuno Pure® Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce, Rockford, USA)</p>
Stripping-Puffer	<p>0,2M Glycin (Sigma, Taufkirchen, D.)</p> <p>0,1% <u>S</u>odium <u>d</u>odecyl<u>s</u>ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.)</p> <p>1% Tween-20</p> <p>HCL</p>
Enhancend Chemiluminescence solution	<p>50mg Luminol (Sigma, Taufkirchen, D.)</p> <p>0,1M Tris-HCL</p> <p>11mg para-Hydroxycomarinsäure</p> <p>Dimethylsulfoxide DMSO</p> <p>35% H₂ O₂</p>

9.3 Zymographie und Reverse Zymographie

Tabelle 4: Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Zymographie und Reverse Zymographie

Proteinisolierungspuffer	10mM Cacodyl-Säure 150mM NaCl 1µM ZnCl 1,5mM NaN ₃ 0,01% (v/v) Triton X-100 20mM CaCl ₂
10xLaufpuffer	0,25M Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.) 1,92M Glycin 10% (w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.)
Sample-Puffer	12,5% (v/v) 0,5M Tris-HCL pH 6 25% (v/v) Glycerol 4% (w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.) 1% Bromphenolblau
Renaturierungspuffer	100mM Triton X-100
Entwicklungspuffer	50mM Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.) 200mM NaCl 5mM CaCl ₂ 0,02% Brij-35
Färbelösung	25% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,5% Coomasie blue R-250
Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v)Essigsäure
Marker	Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad, München, D.)

9.4 Real time RT-PCR

Tabelle 5: Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Real time RT-PCR

Proteinisolierungsreagenzien	peqGold RNA Pure (peqLab, Erlangen, D.) Glykogenlösung (peqLab, Erlangen, D.) DNA-free Kit™ (Ambion Inc., Woodward Austin, TX, USA)
10xFA Gellaufpuffer	200mM 3-N-Morpholinopropansulfonsäure, MOPS (Sigma, Taufkirchen, D.) 80mM Natriumacetat (Sigma, Taufkirchen, D.) 10mM Ethylenediaminetetraacetat, EDTA (Sigma, Taufkirchen, D.)
RNA-Denaturierungslösung	10x FA Gellaufpuffer 12,3M Formaldehyd
One-step RT-PCR Kit (Qiagen®, Hilden, D.)	2x Quanti Tect SYBR Green I QuantiTect RT Mix RNase-free water
Albumin Bovine Serum, BSA	(Sigma, Taufkirchen, D.)
RT-PCR Primer	MWG, Biotech, Ebersberg, D.

9.5 RT-PCR Primer

Tabelle 6: Primer-Sequenzen für die Real time RT-PCR

Gen	Primer-Sequenz (5'>3')	Größe des PCR-Produktes (bp)
GAPDH forward	CCA CCC AGA AAA CTG TGG AT	127
GAPDH reward	TTG AGC TCA GGG ATG ACC TT	
TIMP-1 forward	CTG CGG ATA CTT CCA CAG GT	126
TIMP-1 reward	GCA GAA CTC ATG CTG TTC CA	
TIMP-2 forward	CCA AGC AGG AGT TTC TGG AC	118
TIMP-2 reward	TGT TTC CAG GAA GGG ATG TC	
TIMP-3 forward	CCT GCT ACT ACC TGC CTT GC	108
TIMP-3 reward	TGC AAG CGT AGT GTT TGC AC	
TIMP-4 forward	CCC TCT GTC GGG TGA AAC TA	117
TIMP-4 reward	TCT CCC AGG GCT CAA TGT AG	
MMP-2 forward	ATC CGT GGG GAG ATC TTC TT	143
MMP-2 reward	TGT GGG TCT TCG TAC ACA GC	
BNP forward	ACC TGT CGC TGC TAG GAT GT	167
BNP reward	GAG TCC CAG GTT TCT TCC AG	

9.6 Radioimmunassay

Tabelle 7: Reagenz für das Radioimmunassay

Brain Natriuretic Peptide-26/BNP-26 (Porcine, Ovine) Kit	Phoenix Europe (Karlsruhe, D.)
---	--------------------------------

10 Danksagung

An erster Stelle will ich meinen Liebsten danken: meinen Eltern, die mich immer in allen Belangen unterstützten und mir zur Seite standen. Walter für seine moralische Unterstützung, das Korrekturlesen meiner Arbeit und seinen grenzenlosen Optimismus. Ganz besonders danke ich ihm dafür, dass er immer für mich da war und ist. Und meinen Freunden, die reichlich wenig in der letzten Phase meiner Arbeit von mir gehört haben.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Lange danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung innerhalb seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Dank seines steten Vertrauens und der umfassenden Unterstützung und Förderung, vor allem was die externe Präsentation meiner Ergebnisse betrifft, war es mir möglich wertvolle Erfahrungen sammeln zu können.

An nächster Stelle will ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Bauernschmitt danken, der in großer Hilfsbereitschaft immer dafür sorgte, dass es mir zu keiner Zeit an irgendetwas mangelte. Er war ein geduldiger Gesprächspartner, der immer wieder ein exzellentes Gespür für Problemstellung und Lösungsansätze bewies. Vor allem hat er mir die Möglichkeit gegeben, eigenständig Forschung zu planen und durchzuführen.

Frau Dr. Sabine Bleiziffer danke ich sehr herzlich für die Vergabe der Arbeit. Ich möchte ihr danken für die stete Gesprächsbereitschaft, zahlreiche Diskussionen und gute Hinweise, die für den Fortgang der Arbeit sehr hilfreich waren.

Dr. Joachim Grammer danke ich für die intensive Betreuung und die zahlreichen Diskussionen sowohl während, als auch vor und nach seiner Arbeitszeit.

Martina Dreßen hat aus einem wirren Geflecht von Primern und RNAs mit viel Liebe zuverlässige Daten geschaffen. Dafür danke ich ihr sehr.

Sara Dummler hat mit ihrem kritischen Blick für Details der Arbeit den letzten Schliff gegeben.

Daniel Ruzicka schaffte es durch seine hervorragenden EDV Kenntnisse meinen Vorbehalt für diese Materie zu relativieren.

Zu guter Letzt danke ich für sachliche und fachliche Unterstützung sowie lustige Diskussionen Svetlana Lachmann, Angelika Bernhard, Sofie Dorn,

Eine Liste der Personen, die zum Gelingen der Arbeit beitragen, wird niemals vollständig sein. Jedes Gespräch über die Arbeit gibt Impulse. Ich möchte allen oben Genannten, und denen, die ich leider vergessen habe, und es trotzdem verdient haben, meinen herzlichen Dank für eine wunderschöne Zeit aussprechen.