

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. U. Walter

**Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase B
auf die Expression fibroserelevanter Gene**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Klett

aus Sonneberg

Würzburg, Dezember 2009

Referent : Prof. Dr. med. U. Walter
Institut für Klin. Biochemie und Pathobiochemie
Universitätsklinikum Würzburg

Koreferent : Priv. Doz. Dr. med. Andreas Schäfer
Medizinische Klinik und Poliklinik I – Kardiologie
Universitätsklinikum Würzburg

Dekan : Prof. Dr. med. M. Frosch
Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Universitätsklinikum Würzburg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2010

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern
Großeltern
und meine Frau

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiovaskulärer Erkrankungen als Haupttodesursache in der westlichen Welt.....	1
1.2	Die extrazelluläre Matrix (EZM)	2
1.2.1	Die Extrazellulärmatrix des Herzens	3
1.2.1.1	Funktionen der kardialen EZM.....	3
1.2.1.2	Aufbau kardialer EZM.....	4
1.2.1.3	Regulation der Extrazellulären Matrix	6
1.3	Kardialer Alterungsprozess und Bedeutung der Myokardfibrose 9	
1.3.1.1	Effektorhormone des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und myokardiale Fibrose	12
1.3.1.2	Regression der myokardialen Fibrose und Folgen....	12
1.4	Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	13
1.4.1	Struktur der MMPs	15
1.4.2	Regulation der MMPs	17
1.4.3	Aktivitätsregulation durch TIMPs.....	18
1.4.4	Regulation der Genexpression der MMPs.....	19
1.4.5	Die Gelatinasen	20
1.4.6	Die MMP-9	20
1.4.6.1	Regulation der Genexpression der MMP 9	21
1.4.7	Die MMP2	22
1.4.7.1	Regulation der MMP-2	24
1.4.8	Die MMP-13	24
1.5	Die Proteinkinase PKB / AKT	24
1.5.1	Aufbau der PKB	25
1.5.2	Synopsis des Aktivierungsprozesses.....	27
1.5.3	Phosphorylierung durch Akt/PKB.....	28
1.5.4	Biologische / physiologische Funktion der PKB.....	28

1.5.4.1	Veränderungen bzw. Modulation des Kohlenhydratstoffwechsels	29
1.5.4.2	Einfluss auf die Proteinsynthese und das Zellwachstum	29
1.5.4.3	Einfluss auf Zellüberleben / Apoptose	30
1.5.4.4	Einfluss der PKB/AKT auf die Zellproliferation.....	30
1.5.4.5	Einfluss von PKB/AKT auf die Angiogenese	31
1.5.4.6	Untersuchungen an PKB KnockOut (KO)-Mäusen	31
1.5.4.7	Untersuchungen an transgenen Mäusen	33
1.5.4.8	Rolle von PKB/AKT am Herzen	34
1.6	Replikative Seneszenz (RS)	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Material.....	37
2.1.1	RNA Präparation:.....	37
2.1.2	Reverse Transkription	37
2.1.3	Reverse Transkription:	38
2.1.4	PCR	38
2.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.1.6	Zymographie.....	39
2.1.6.1	SDS-Protein-PAGE:.....	39
2.1.7	Geräte.....	41
2.2	Methoden	41
2.2.1	Zellkultur.....	41
2.2.2	Adenovirale Transfektion	42
2.2.3	RNS-Präparation.....	43
2.2.3.1	DNA Verdau.....	43
2.2.3.2	Säulenaufreinigung.....	44
2.2.3.3	Nukleinsäurebestimmung	44
2.2.3.4	Reinheit der RNS-Präparation	44

2.2.4	Reverse Transkription	45
2.2.5	Erstellung der Primer	45
2.2.5.1	Primerliste.....	46
2.2.6	Mengen und Konzentrationen für 1 PCR Ansatz.	48
2.2.7	Vorabtests und Optimierung der PCR	48
2.2.8	Agarosegel-Elektrophorese	48
2.2.9	Beispiele für Primer-Einstellung	49
2.3	Zymographie	50
2.3.1	Färben:	51
2.3.2	Entfärben	51
2.4	Datenanalyse.....	51
2.5	PCR	51
2.6	Normierung	52
2.7	Zymographie	53
3	Ergebnisse	54
3.1.1	Einfluss des Leervektors auf die Expression der untersuchten EZM-Proteine	54
3.1.2	Auswirkung einer aktiven PKB auf die Genexpression der MMP-2/-9/-13	57
3.1.3	Expression der MMP-2/-9/-13 nach transienter Transfektion mit konstitutiv inaktiver PKB	58
3.1.4	Ergebnisse der untersuchten Gene, bei denen sich keine entsprechend hohen und signifikanten Abhängigkeiten der Genexpression bezüglich der PKB/Akt-Funktion darstellte	59
3.1.4.1	Auswirkung einer aktiven PKB auf die Genexpression der verschiedenen EZM-Proteine.....	59
3.1.4.2	Expression extrazellulärer Matrixproteine nach transienter Transfektion mit konstitutiv inaktiver PKB	61

3.2	Ergebnisse der Analyse der differentielle Genexpression.....	62
3.3	Ergebnisse der zymographischen Untersuchungen	67
3.3.1	Einfluss des Vektorkonstrukt auf die Aktivität der MMP-2/-9.	68
3.3.2	Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Aktivität der MMP-2/-9	69
3.3.3	Einfluss der konstitutiv inaktiven AKT/PKB-Mutante auf die Proteinsynthese der MMP-2/-9	70
3.3.4	Ergebnisse bezüglich der MMP-13 in der Zymographie.....	73
4	Diskussion	74
4.1.1	Beziehung zwischen messenger-RNS und Protein.....	74
4.2	Regulation der Genexpression der MMP-2/-9/ und 13.....	76
4.2.1	Die MAP-Kinase Signaltransduktionswege	77
4.2.2	Einflussnahme von AKT/PKB auf MAP-Kinasen.....	78
4.3	Mögliche Transkriptionsregulation über NF- κ B.....	81
4.4	Mögliche Genregulation über den WNT Signalweg.....	83
4.5	Mögliche Interaktion von AKT/PKB mit dem JAK-STAT- Signalweg über die Kinase mTOR.....	84
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis.....	89
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	98
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	99
	Danksagung	
	Lebenslauf.....	

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskulärer Erkrankungen als Haupttodesursache in der westlichen Welt

Herz-Kreislaufkrankheiten sind weiterhin die häufigsten Todesursachen bei Männern und Frauen in Deutschland, wenn auch ein Rückgang der Sterbeziffern bei Herz-Kreislauf-Krankheiten in den letzten Jahren zu verzeichnen ist. Ab einem Alter von 65 Jahren nimmt die Bedeutung dieser Todesursache rapide zu. Hinzu kommt, dass in den kommenden 25 Jahren die Gruppe der über-65-Jährigen von derzeit 20% auf knapp 30% der gesamten Bevölkerung ansteigen wird. Nach Lakatta werden pathophysiologische Mechanismen, die zu kardiovaskulären Erkrankungen führen, durch den Alterungsprozess von Gefäßen und des Herzens modifiziert bzw. erst ermöglicht. Hierbei stellt die zum Tode führende Herzinsuffizienz, also das Unvermögen des Herzens, trotz ausreichenden venösen Blutangebots, den gesamten Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend zu versorgen, den Endpunkt dar. Sie entsteht aus einer Kombination von kardiovaskulärer Krankheit, (risikobehaftetem) Lebensstil und einem Alterungsprozess des kardiovaskulären Systems (Lakatta 2002).

Als wichtigste Ursache einer symptomatischen Herzinsuffizienz bei älteren Patienten wird heute die diastolische Dysfunktion bei erhaltener systolischer Funktion verantwortlich gemacht. Die beitragenden Faktoren sind vielfältig. Am häufigsten umfassen sie die ischämische Kardiomyopathie nach Herzinfarkt und das Hypertonieherz. Histopathologisch findet man meistens eine kardiale Fibrose (Burlew and Weber 2002). Primär glaubte man, dass die Prozesse während des myokardialen Remodelings auf die Myozyten und den kontraktilen Apparat beschränkt seien. In den letzten Jahren konnte jedoch ge-

zeigt werden, dass die Umbauprozesse auch in der extrazellulären Matrix (EZM) einen wichtigen Faktor darstellen. Sowohl humane als auch Tierstudien konnten belegen, dass es mit den Veränderungen an der EZM zu Veränderungen der Herzgeometrie und damit zur Störung der Myokardfunktion kommen kann. Ebenfalls können Störungen der komplexen Interaktion zwischen den Matrixproteinen zu einer Störung der Myokardfunktion führen (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

1.2 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix ist ein vom Gewebetypus-abhängig strukturiertes Makromolekülgeflecht. Hauptsächlich besteht die EZM aus Proteinen, Polysacchariden und Mineralien. Die enorme Variationsbreite bezüglich der Funktionalität entsteht aus der Zusammensetzung der einzelnen Makromolekül-Typen der EZM, sowie durch deren Strukturierung. Die Strukturmoleküle der EZM werden zum größten Teil von den Fibroblasten und Fibrozyten gebildet. Die EZM enthält mehrere Untergruppen von Makromolekülen:

➤ **Glycosaminoglykane:**

Sie gehören zu den Polysacchariden, die gewöhnlich an Proteine gebunden sind. In dieser Form nennt man sie Proteoglykane.

➤ **Faserproteine:**

Diese kann man anhand ihrer Funktion in zwei Untergruppen einteilen kann: Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, sowie Anheftungsproteine wie Fibronectin und Laminin.

Glycosaminoglykane und Proteoglykane bilden einen wasserhaltigen Grundstoff, der Druck aufnehmen kann, die Faserproteine sorgen für die Zugfestigkeit und Elastizität. Der Anteil jedes Strukturproteins wird durch Synthesemenge und Abbauaktivität bestimmt. Beim Ab-

bau der EZM steht die enzymatische Degradation im Vordergrund. Eine wichtige Gruppe stellen dabei die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) dar, welche ebenfalls von den Fibroblasten gebildet werden. Die Aktivitätsregulation dieser Enzyme erfolgt unter anderem durch die TIMPS (engl.: Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases), Inhibitoren der MMPs, die ebenfalls von den Fibroblasten gebildet werden (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

1.2.1 Die Extrazellulärmatrix des Herzens

1.2.1.1 Funktionen der kardialen EZM

Die EZM stellt eine der wichtigsten Determinanten der mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels dar. Sie besteht größtenteils aus einem Geflecht von Kollagenfasern, insbesondere Kollagen I und III, die zusammen mit den anderen Komponenten des Interstitiums als Medium zwischen dem Myozyten, den Gefäßen der Blutversorgung und des lymphatischen Systems fungieren. Stoffwechseledukte und -produkte vom Myozyten und zum Myozyten müssen durch sie hindurch diffundieren (Janicki 1992; de Souza 2002).

Die EZM bestimmt durch ihren Aufbau den größten Teil der diastolischen Funktion und der Ventrikelgröße (Weber, Clark et al. 1987; de Souza 2002). Sie koordiniert den Kraftfluss von den Myozyten zur Ventrikelkammer (de Souza 2002).

Bezugnehmend auf diese wichtigen Funktionen der EZM konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des myokardialen Kollagens zu veränderten mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels sowie auch zu einer veränderten ventrikulären Funktion führen (Janicki 1992; de Souza 2002). In Untersuchungen der letzten Jahre häufen sich die Hinweise, dass diese Umbauprozesse der EZM am Herzen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung der Herzinsuffizienz darstel-

len (Pauschinger, Knopf et al. 1999; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

1.2.1.2 Aufbau kardialer EZM

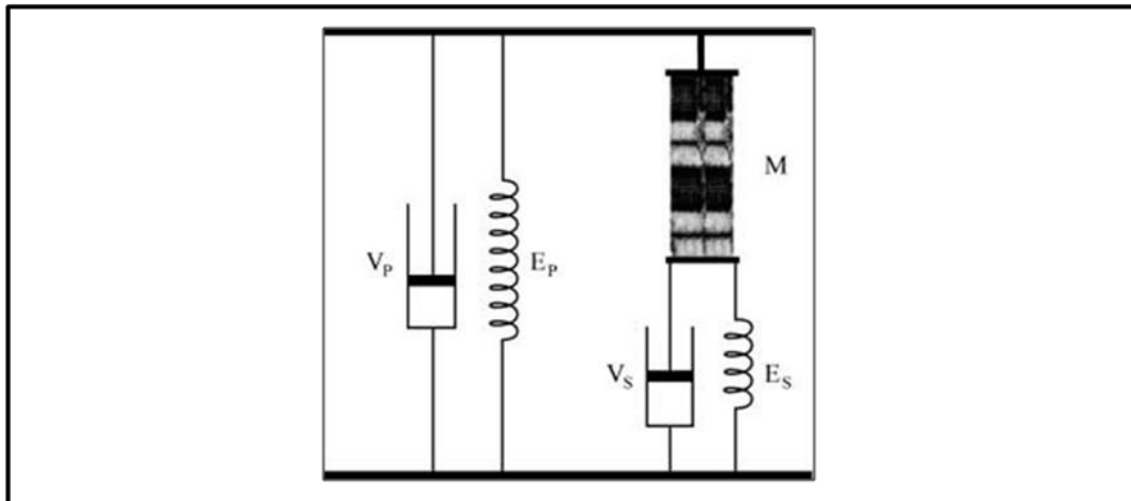


Abbildung 1 (Burlew und Weber 2002).

Anordnung visköser und elastischer Elemente in einem muskemechanischen Modell. Das kardiale Kollagennetzwerk wird durch in Serie (s) geschaltete elastische (E), viskoelastische (V) und parallel geschaltete (p) Elemente neben den kardialen Myozyten (M) dargestellt.

Der Hauptbestandteil der kardialen EZM besteht im wesentlichen aus Kollagen, Polypeptidketten, die sich zu Triple-Helices zusammenschließen und Kollagenfibrillen bilden (Montes und Junqueira 1982). Biochemisch lassen sich 14 verschiedene Kollagene unterscheiden, von denen nur Kollagen Type I, II, III, V und XI Fibrillen bilden. Die Hauptkomponenten des myokardialen Kollagens sind zu 85% Kollagen I und zu 11 % Kollagen III. Darüber hinaus besteht die EZM des Herzens aus Basalmembranbestandteilen (Kollagen Typ IV, Laminin) und Signalproteinen (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

Das myokardiale Kollagennetzwerk zeichnet sich durch elastische und viskoelastische Komponenten (E und V in Abb.1) aus, die in Serie und parallel (Indices s und p in Abb.1) zu den Myozyten geschaltet sind.

Somit trägt es im Sinne eines muskelmechanischen Modells (Abb.1) entscheidend zu dessen mechanisch-dynamischen Eigenschaften bei.

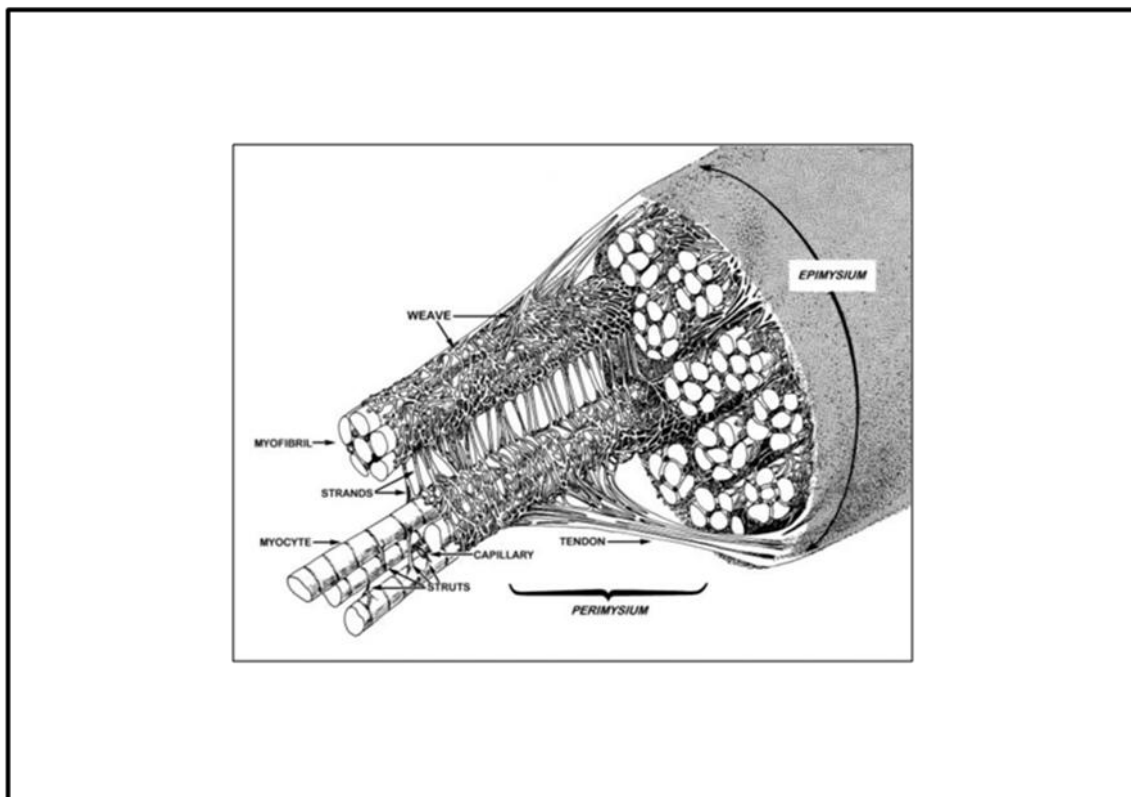


Abbildung 2 Aufbau des Herzmuskels (Burlew and Weber 2002)

Lichtmikroskopisch werden diese Strukturen ähnlich dem des Skelettmuskels als Endomysium, Perimysium und Epimysium bezeichnet (Abb.2) (Robinson, Cohen-Gould et al. 1983; Burlew and Weber 2002). Die Bedeutung der Kollagenfasern für die mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels ist sehr komplex. Wichtige Parameter stellen Typ, Menge des vorkommenden Kollagens, Konfiguration und Lokalisation der Verbindungen zwischen den Kollagenfasern und dem Myozyten dar. Die Kollagenfasern (Typ I-Kollagen) aber auch die retikulären Fasern des Typ III-Kollagens zeichnen sich durch hohe Zugfestigkeit aus. Elastische Eigenschaften entstehen durch die vernetzte Struktur innerhalb der kardialen EZM. Die Energie für die elastischen

Rückstellungskräfte wird in der Systole im Fibrillen-Netzwerk aufgenommen und in der Diastole wieder freigegeben. Letztendlich resultiert ein negativer intraventrikulärer Druck (Sog). Er stellt die elastische Komponente dar. Aufgrund der internen Gewebereibung geht ein Teil der Rückstellungsenergie als Wärme „verloren“, dies entspricht der viskösen Komponente. Die restliche Ventrikelfüllung wird durch die Vorhofsystole aktiv geleistet.

Das durch die EZM gebildete Fibrillennetzwerk bewahrt außerdem die kardiale Form und gewährleistet die korrekte Kraftlenkung während der Systole (Burlew and Weber 2002).

Weiterhin schützen die epimysealen Kollagenfaserbündel die Sarkomere vor dem zu weiten Auseinandergleiten während der Diastole, um nicht den optimalen Arbeitspunkt zu verlassen (Robinson, Cohen-Gould et al. 1983). Die endomysealen Fasern verknüpfen die Myozyten untereinander, scheiden sie ein und füllen den extrazellulären Raum zwischen den Myozyten (Robinson, Cohen-Gould et al. 1983). Perimyseale Kollagenfaserbündel verbinden das Epimysium mit dem Endomysium.

1.2.1.3 Regulation der Extrazellulären Matrix

Die komplexe Struktur der EZM, z.B. der Kollagene, wird auf der Ebene der Synthese und der Degradation reguliert. Die Regulation der Kollagensynthese kardialer Fibroblasten erfolgt auf zellulärer Ebene (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002). So konnten Eghbali und Weber 1990 zeigen, dass hauptsächlich die myokardialen Fibroblasten, im Gegensatz zu den Myozyten, entsprechende m-RNA enthalten, die zur Biosynthese von Kollagen I, III und IV notwendig ist. Im Vergleich zu anderen Systemen ist der Proteinumsatz in der EZM relativ niedrig. Bonnin und Sparrow (Bonnin und Sparrow 1978)

zeigten 1978 beim Hund, dass die tägliche Syntheserate ca. zehnmal geringer ist als bei nicht-kollagenen Proteinen.

Die Fibrillen-bildenden Kollagene werden vom myokardialen Fibroblasten als Prokollagene synthetisiert und danach sekretiert. Durch Proteinasen werden die an den N- und C-terminalen Enden befindlichen Propeptide abgespalten. Verschiedene Faktoren können die Kollagensynthese induzieren: Zytokine (z.B. Interleukin 1- β), Wachstumsfaktoren (PDGF), TGF β 5, Angiotensin, Aldosteron und mechanischer Stress (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

Im Gegensatz zur zellulären Regulation der Synthese der EZM-Kollagene steht die Degradation derselben. Sie ist durch eine Ausgewogenheit zwischen den Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren (TIMPs) gekennzeichnet.

Die MMPs gehören zur Gruppe Zink-abhängiger Enzyme. Die heute bekannten MMPs lassen sich in zwei Untergruppen aufteilen:

MMPs, die in den extrazellulären Raum sekretiert werden, und die membranständigen MMPs.

Alle MMPs werden als Prepro-Enzyme synthetisiert und als inaktive Pro-MMPs in die EZM sekretiert. Die Aktivierung erfolgt durch Serinproteasen, wie z.B. Plasmin. Die MMPs können dann diffus im extrazellulären Raum enzymatisch aktiv werden. Die MT(Membran-Type)-MMPs können aufgrund ihrer Membranbindung eine lokal begrenzte Degradation bewirken.

Grundsätzlich sind alle MMPs an der Regulation des Kollagenbestandes beteiligt. Die als Stromolysine bekannten MMPs, wie die MMP-3, können ein ganzes Spektrum an Matrixproteinen spalten, darunter auch Kollagen I, IV, und Proteoglykane. Dagegen können MMP-1, -8, -13 dreifach helikale Kollagenfibrillen in

Gelatinfragmente spalten. Gelatinasen wie MMP-2 und -9 können nun diese Fragmente weiter aufspalten (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

Der Aktivierungsgrad der MMPs kann spezifisch durch TIMPs inhibiert werden. Vier verschiedene Subtypen TIMP I-IV sind derzeit bekannt. Alle TIMPs sind ähnlich aufgebaut und können durch ihre direkte Interaktion mit den MMPs zur Hemmung deren Aktivität beitragen.

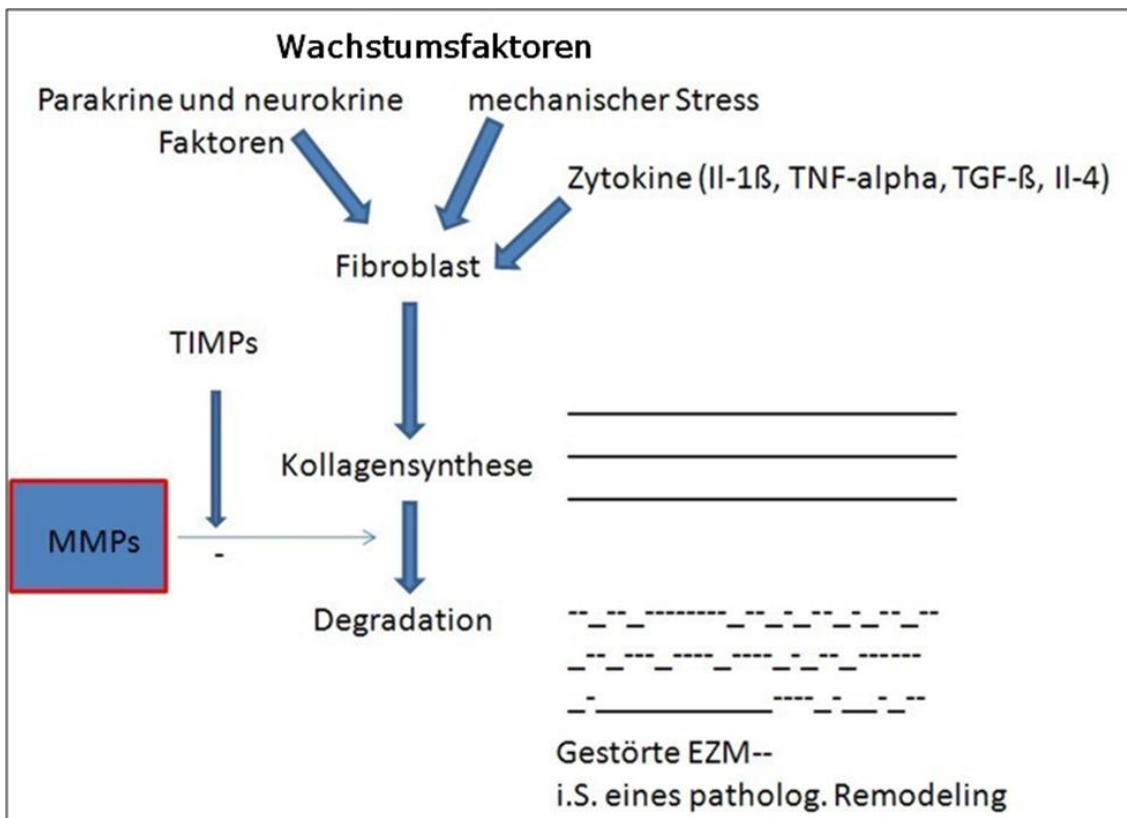


Abbildung 3: Beteiligte Faktoren der Kollagensynthese und Degradation (eigenes Bild)

TIMP-1 kann Komplexe mit MMP-3 und -9 bilden (Gomis-Ruth, Maskos et al. 1997; Spinale, Coker et al. 2000; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002). TIMP-4 kann MMP-3 und -9 blockieren (Liu, Wang et al. 1997) und nimmt im Myokard eine vorherrschende Stellung ein (Li, Feldman et al. 1998). Somit sind TIMPs relevante

endogene Inhibitoren der MMPs innerhalb des Myokards und relevant für Umbauprozesse der extrazellulären Matrix.

Auch in tierexperimentellen Studien konnte die Verbindung zwischen vermehrter MMP-Aktivität und Umgestaltung der extrazellulären Matrix im Zusammenhang mit einer linksventrikulären Funktionsstörung nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der MMP-Aktivität durch TIMPs die Ausbildung einer Herzinsuffizienz infolge eines nichteingetretenen pathologischen Remodellings der EZM verhinderte (Pauschinger, Knopf et al. 1999; Chancey, Brower et al. 2002). Spinale sowie Pauschinger et al. (Spinale, Coker et al. 1999; Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002) konnten in einem Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienzmodell die Strukturveränderungen der myokardialen Matrix durch pharmakologische TIMP-Applikation verhindern.

Verschiedene Patientenstudien berichten über ein Missverhältnis zwischen MMP- und TIMP-Expression bei Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz. Eine Zunahme der MMP-Aktivität und eine Abnahme der Querverbindungen zwischen den Kollagenfibrillen sowie eine Abnahme der TIMP-Expression konnte bei progredienter Herzinsuffizienz bzw. im Endstadium der Herzinsuffizienz auf dem Boden einer dilatativen Kardiomyopathie nachgewiesen werden (Pauschinger, Chandrasekharan et al. 2002).

Die Tiermodelle zeigen also eindeutig, dass ein Zusammenhang zwischen der MMP-Expression und der daraus folgenden Umgestaltung der EZM mit folgender konsekutiver Herzinsuffizienz besteht.

1.3 Kardialer Alterungsprozess und Bedeutung der Myokardfibrose

Mit zunehmendem Alter nimmt die Wandstärke des linken Ventrikels (LV) zu. Diese linksventrikuläre Hypertrophie resultiert aus der Grö-

Benzunahme der kardialen Myozyten (Olivetti, Melissari et al. 1991; Lakatta 2002), der von einer Zunahme interstitieller Kollagene begleitet wird. Grund dafür sind die im Alter zunehmende Verschlechterung der β -adrenergen Stimulierbarkeit und die Zunahme der Vor- und Nachlast am Herzen. So konnte gezeigt werden, dass beim alternden Herzen die Konzentrationen von einigen Wachstumsfaktoren (Angiotensins II, TGF β , FGF, IGF) stark erhöht sind. Die von ihnen induzierten Proteine könnten am Herzen und an den Gefäßen zu den „altersbedingten“ Veränderungen an den Zellen und auch zu einer veränderten extrazellulären Matrix führen. Sie könnten somit eine wichtige Rolle bei kardialen Alterungsprozessen spielen (Lakatta 2002). Die Zahl kardiovaskulärer Zellen mit einem veränderten Phänotyp erhöht sich im Alter. Der veränderte Phänotypus von Myozyten und Fibrozyten geht auch mit einer veränderten Funktion einher. Bei kardialen Myozyten sind die Veränderungen durch Größenzuwachs (Fraticelli, Josephson et al. 1989; Lakatta 2002), veränderte Kontraktilität (Capasso, Malhotra et al. 1983; Wei, Spurgeon et al. 1984; Lakatta 2002) und veränderte Sekretion von Botenstoffen, wie atrialer natriuretischer Faktor (ANF) und opioide Peptide, die mit einer Stressantwort vergleichbar sind, gekennzeichnet. Eine Sekretion von Wachstumsfaktoren wurde bei Myozyten und Fibroblasten beobachtet, die erhöhter mechanischer Dehnung ausgesetzt waren (Lakatta 2002). Diese entsteht in vivo am alternden Herzen unter anderem durch eine erhöhte Steifigkeit der Gefäßwände, welche eine erhöhte Nachlast zur Folge hat. Ebenso führt der Verlust benachbarter Herzmuskelzellen zu erhöhter Belastung (Dehnung) der noch verbleibenden Muskelzellen (Lakatta 2002).

Ähnliche Veränderungen des Phänotypus wie bei den Myozyten könnten ebenfalls bei den Fibroblasten zu einer Funktionsveränderung führen, in deren Folge eine veränderte sowie vermehrte EZM entstehen

könnte (Lakatta 2002). Weiterhin tragen altersbedingte Veränderungen an EZM-Proteinen infolge Glycosylierung und Oxidation wahrscheinlich zu den funktionellen Veränderungen bei.

Die Gesamtheit aller Veränderungen der kardialen EZM, seien sie nun physiologisch-kompensatorisch oder pathologisch bedingt, werden als „Myocardial Remodeling“ bezeichnet. Im weiteren Sinne ist es ein progressiver, über einen längeren Zeitraum andauernder Prozess mit multiplen strukturellen und funktionellen Veränderungen. Heute versteht man die Entstehung der Herzinsuffizienz als Resultierende genau dieser Veränderungen, die die Größe und Anzahl der Myozyten (Hypertrophie, Hyperplasie und Apoptose), den Energiestoffwechsel und auch eine veränderte Zusammensetzung des extrazellulären Proteinnetzwerkes betreffen (Schram and Sweeney 2008).

Hierbei stellt die Fibrose des Myokards einen wichtigen Aspekt dar. Sie ist durch eine Vermehrung des Bindegewebes bzw. der EZM gekennzeichnet. Eine myokardiale Fibrose findet man regelmäßig am alten Herzen sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen. Hierbei tritt eine dysproportionale Vermehrung des fibrillären Kollagens auf. Dadurch kommt es während der diastolischen Relaxationsphase zu einem Verlust an Energie durch entstehende Reibungswärme der vermehrt aneinander reibenden Kollagenfasern. Die Sogwirkung wird um den gleichen Betrag geschmälert.

Eine weitere Einschränkung der diastolischen Füllung wird durch die erhöhte passive Steifigkeit des Myokards aufgrund der Fibrose verursacht. Das pathologische Remodeling führt muskelmechanisch außerdem zu einer erhöhten viskoelastischen Belastung und zu einer erhöhten Erschlaffungsgeschwindigkeit. Pathophysiologisch kommt es zu einer Erhöhung des atrialen und des ventrikulären Füllungsdruckes und damit zu einer Verschlechterung der Anpassungsfähigkeit des

Herzens mit Hilfe des Frank-Starling-Mechanismus (Burlew and Weber 2002).

1.3.1.1 Effektorhormone des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und myokardiale Fibrose

In den vergangenen 20 Jahren wurde die Rolle des RAAS bei der Entstehung der Fibrose untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Aldosteron als auch Angiotensin II das ungünstige Remodeling im Sinne einer Myokardfibrose auslösen (Weber and Brilla 1991; Weber and Brilla 1992; Weber, Brilla et al. 1992). Die Entstehung der Myokardfibrose ist hierbei nicht primär von einer arteriellen oder pulmonalen Hypertonie oder einer Natrium-armen oder -reichen Diät abhängig. Fibrosen des Myokards infolge einer Aldosteronbehandlung konnten auch an normotensiven, nicht hypertrophierten Vorhöfen beobachtet werden (Burlew and Weber 2002).

1.3.1.2 Regression der myokardialen Fibrose und Folgen

Durch Brilla et al. konnte im Tierversuch eine Regression der myokardialen Fibrose infolge der Behandlung mit ACE-Hemmern demonstriert werden. Dadurch verbesserte sich die diastolische Funktion (Brilla, Janicki et al. 1991). Ähnliche Ergebnisse bei 78 Wochen alten Ratten belegen, dass selbst am seneszenten Herzen ein Rückgang der Fibrose infolge ACE-Hemmer-Gabe möglich ist. Eventuell ist eine Aktivierung der MMPs für die Degradation von Kollagenfasern und somit für den Rückgang der Fibrose mitverantwortlich (Brilla, Matsubara et al. 1996). Auch in klinischen Studien konnte bei Patienten mit arterieller Hypertonie, ventrikulärer Hypertrophie, bioptisch nachgewiesener Myokardfibrose und diastolischer Dysfunktion durch die Behandlung mit ACE-Hemmern ein Rückgang der myokardialen Fibrose und eine Verbesserung der diastolischen Funktion nachgewiesen werden (Brilla, Funck et al. 2000). Zusammengefasst belegen die

Ergebnisse einen starken Zusammenhang zwischen myokardialer Fibrose und diastolischer Dysfunktion (Burlew and Weber 2002).

1.4 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die Superfamilie der MMPs gehört zu den Endopeptidasen. Sie beinhaltet mindestens 28 sekretierte z.T. membranständige Enzyme. Viele von ihnen konnten in humanen Geweben nachgewiesen werden.

Enzym	MMP	Gen-Locus	EZM-Substrate
Kollagenase-1	MMP-1	11q22-q23	Kollagen (Type I, II, III, VII, VIII, X, und XI), Gelatin, Fibronectin, Vitronektin, Laminin, Entactin, Ttenascin, Aggrecan, link Protein, myelin basic, protein, Versican
Kollagenase-2	MMP-8	11q21-q22	Kollagen (Type I, II, und III), Aggrecan
Kollagenase 3	MMP-13	11q22.3	Kollagen (Type I, II, III, IV ₃ , VI, IX, X, und XIV), Kollagen-Telopeptide, Gelatin, Fibronectin, SPARC, Aggrecan, Perlecan, large Tenascin-C ₃
Kollagenase 4	MMP-18	Xenopus	Collagen type I (Ratte)
Gelatinase A	MMP-2	16q13	Kollagen (Typ I, II ₅ , III, IV, V, VII, X, und XI), Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Tenascin, SPARC, Aggrecan, link Protein, Galectin, Versican, Decorin, Myelin-basisches Protein
Gelatinase B	MMP-9	20q11.2-q13.1	Kollagen (Type IV, V, XI, und XIV), Gelatin, Elastin, Vitronectin, Laminin, SPARC, Aggrecan, Link Protein, Galectin, Versican, Decorin, Myelin-basisches Protein
Stromelysin-1	MMP-3	11q23	Kollagen (Type III, IV, V, VII, IX, X, und XI), Kollagen-

			Telopeptide, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Tenascin, SPARC, Aggrecan, Link Protein, Decorin, Myelin-basisches Protein, Perlecan, Versican ¹⁵ , Fibulin
Stromelysin-2	MMP-10	11q22.3-q23	Kollagen (Type III, IV, und V), Gelatin, Elastin, Fibronectin, Aggrecan, Link Protein
Stromelysin-3	MMP-11	22q11.2	Gelatin, Fibronectin, Kollagen Type IV, Laminin
Matrilysin-1	MMP-7	11q21-q22	Kollagen (Type I, und IV), Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Tenascin, SPARC, Aggrecan, Link Protein, Decorin, Myelin-basisches Protein, Fibulin, Versican
Matrilysin-2	MMP-26	11p15	Kollagen Typ IV, Gelatin, Fibronectin, Vitronectin
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Kollagen (Typ I, II, und III), Gelatin, Fibronectin, Tenascin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Aggrecan, Perlecan
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	Fibronectin, Tenascin, Entactin, Laminin, Aggrecan, Perlecan
MT3-MMP	MMP-16	8q21	Kollagen Typ III, Gelatin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	Gelatin
MT5-MMP	MMP24	20q11.2	Gelatin, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Proteoglycan
MT6-MMP	MMP-25	16q13.3	Kollagen Typ IV, Gelatin, Fibronectin, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat
Makrophagen Elastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	Kollagen (Typ I, V, und IV), Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Osteonectin, Aggrecan, Myelin-basisches Protein
	MMP-19	12q14	Kollagen Typ IV, Gelatin, Laminin, Entactin, large Tenascin-C, Fibronectin, Aggrecan,

Enamelysin	MMP-20	11q22.3	Amelogenin, Aggrecan
XMMP	MMP-21	Xenopus	Gelatin
CA-MMP	MMP-23	1q36.3	Gelatin
CMMP	MMP-27	11q24	Gelatin
Epilysin	MMP-28	17q21.1	

Tabelle 1: Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) modifiziert nach Nagase et al. (Visse and Nagase 2003).

Die Einteilung erfolgt u.a. nach der Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Elastasen sowie in membranständige MMPs (MT-MMPs). Die von den MMPs gespaltenen Substrate umfassen die Proteine der EZM und der Basalmembran.

Die MMPs werden als Zymogene ins Interstitium sekretiert. Eine Aktivierung, bei der es zur Abspaltung der Propeptidomäne kommt, ist zur Entfaltung der proteolytischen Aktivität notwendig. Die Regulation der enzymatischen Aktivität erfolgt durch endogene Inhibitoren, den TIMPs (engl.:tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases).

Die MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der EZM, so u.a. bei der embryonalen Entwicklung, Organogenese und Morphogenese, beim Gewebe-Remodeling und bei der Wundheilung. Große Bedeutung wird ihnen aber auch bei der Angio(neo)genese, bei der Tumorinvasion und Metastasierung zugeschrieben (Freije, Balbin et al. 2003).

1.4.1 Struktur der MMPs

Allen MMPs gemeinsam ist eine hoch konservierte und untereinander ähnliche Struktur mit hoher Sequenzhomologie und definierten Proteinuntereinheiten. Dazu gehören:

Die Signalpeptidsequenz: wichtig für den Transport am Endoplasmatischen Retikulum und für die Translokation ins Interstitium (Sekretion) (Sternlicht and Werb 2001)

Die Propeptiddomäne: das in der konservierten Sequenz enthaltene Cystein bindet das katalytische Zinkion und schützt somit das katalytische Zentrum und vermittelt die Inaktivität. des Enzyms. Die Propeptiddomäne geht bei der Zymogenaktivierung verloren.

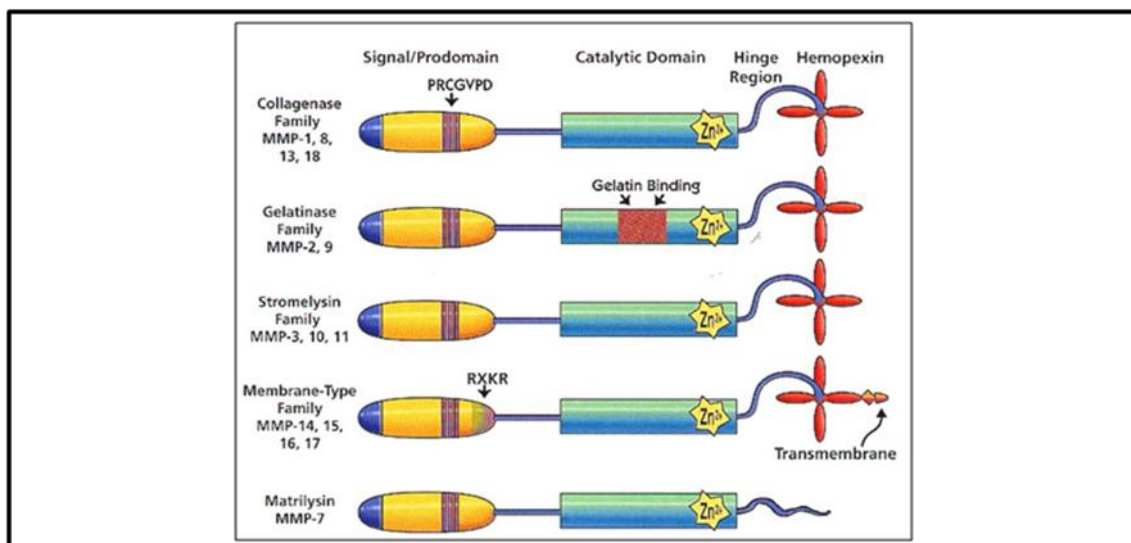


Abb. 4: Merkmale verschiedener MMP-Familien aus Akool et al. (Akool et al., Kleinert et al. 2003)

Die katalytische Domäne: das aktive Zentrum der MMPs ist hoch konserviert. Es existiert ein aus drei Histidin-Resten bestehendes Zinkbindendes Motiv (HEXXHXXGXXH), welches das zur proteolytischen Aktivität unabdingbare Zinkion bindet. Ein weiteres Merkmal ist der ebenfalls hoch konservierte Methionin-Turn, wobei die Methionin-Seitenkette ein hydrophobes Areal unterhalb der drei zinkbindenden Histidinseitenketten bildet. Zur Stabilisierung der strukturellen Integrität sind im Weiteren noch ein Zinkion und zwei bis drei Kalziumionen gebunden.

Bei den Gelatinasen (MMP-2/-9) existiert noch zusätzlich in der Nähe des katalytischen Zentrums eine Gelatin-bindende Domäne.

C-terminale Hämapexin-ähnliche Domäne

Sie ist über eine Scharnier-Region (engl.: hinge region) c-terminal an die katalytische Domäne angeschlossen und hat die Form einer elipsoiden Scheibe mit einer Vierblatt-Propeller-Struktur. Insbesondere bei den Kollagenasen ist sie von essentieller Bedeutung, damit diese tripel-helikales-Kolagen spalten können.

Bei den in der Zellmembran verankerten MMPs (MT-MMPs) folgt an der Hämapexindomäne noch der Transmembrananker.

1.4.2 Regulation der MMPs

Grundsätzlich ist eine Regulation der MMP-Aktivität auf Ebene der Transkription, Translation, der posttranslationalen Prozessierung, bei der Zymogenaktivierung und Inhibition durch endogene TIMPs und letztendlich durch deren Abbau möglich.

In der Literatur werden weiterhin noch mehrere komplexe Mechanismen beschrieben. Darunter fallen Regulation der m-RNS-Stabilität, Veränderungen der Translationseffizienz, der Enzym-Kompartimentierung, Sekretion sowie der Rekrutierung an die Zelloberfläche (siehe auch Abbildung 4) (Eberhardt, Akool el et al. 2002; Akool el, Kleinert et al. 2003).

Die meisten MMPs werden als Zymogene in das Interstitium sekretiert. Sie können durch Proteolyse oder durch chemische (nicht proteolytische) Agenzien wie organische Quecksilberverbindungen, SDS, Sauerstoffradikale sowie SH-reaktive Substanzen aktiviert werden (Visse and Nagase 2003). Die Enzymaktivierung der MMPs durch Proteasen basiert auf der Abspaltung der Propeptiddomäne. Die Autoaktivierung einiger MMPs stellt hierbei einen bedeutenden Weg dar. Die chemische Aktivierung basiert auf einer Störung der Cystein-Zink-Interaktion des Cystein-Schalters.

Dadurch geht die durch einen konservierten Cystinrest der Propeptiddomäne vermittelte Bindung des katalytischen Zinkions verloren (sogenannter Cystin-Schalter). Der Cysteinrest wird dabei durch ein Wassermolekül ersetzt und ermöglicht dadurch die nun einsetzende katalytische Aktivität. Ein mögliches Aktivierungsschema zeigt die Abbildung 6. Demgegenüber, erfolgt bei der MMP-11/-28 und MMP-14 (MT1-MMP) die Zymogenaktivierung intrazellulär im Golgi-Apparat durch Furin, welches zur Familie der Proprotein-Konvertasen gehört und mittels dem konservierten RXRXKR (furin-like-motif) erkannt wird (Egeblad and Werb 2002; Palosaari, Pennington et al. 2003).

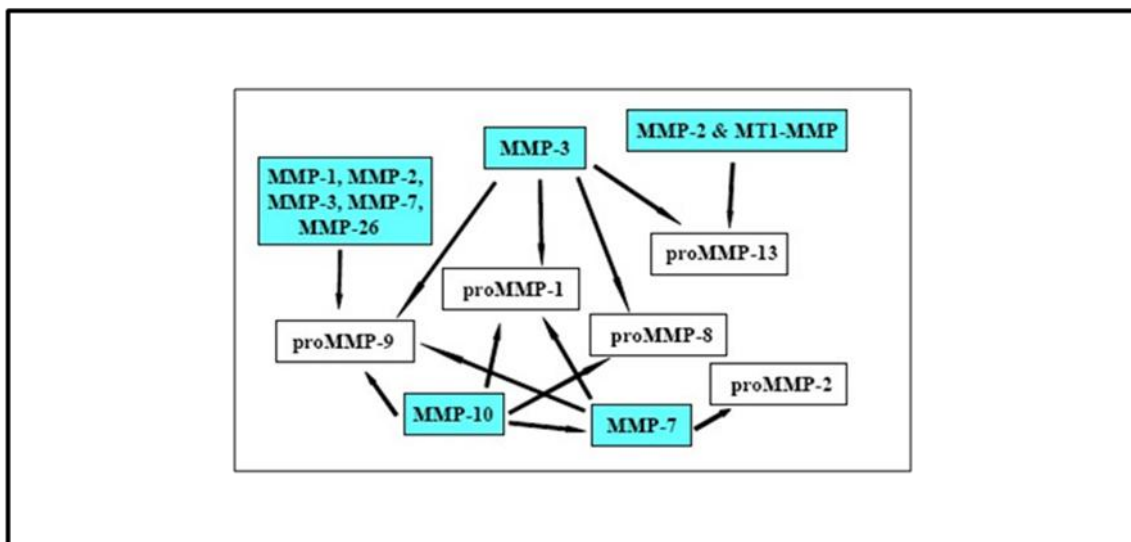


Abbildung 5 Einige Aktivierungswege latenter MMPs (Palosaari, Pennington et al. 2003)

Des Weiteren stellt die Aktivierung durch Plasmin in vivo einen relevanten Weg dar. Es konnte gezeigt werden, dass Plasmin pro-MMP-1/-2/-3/-9/-12/ und pro-MMP-13 aktivieren kann (Carmeliet, Moons et al. 1997; Mazzieri, Masiero et al. 1997).

1.4.3 Aktivitätsregulation durch TIMPs

Nach erfolgter Zymogenaktivierung wird die enzymatische Aktivität der MMPs in vivo hauptsächlich durch die inhibitorische Wirkung der TIMPs reguliert. Hierbei wirken die TIMPs als inhibitorische Substrat-

analoge. Der auf nichtkovalenter Bindung beruhende Komplex zwischen MMP und TIMP-Molekül blockiert das katalytische Zentrum für das Substrat irreversibel. Derzeit sind vier verschiedene TIMPs (TIMP 1-4) bekannt (Jeziarska and Motyl 2009).

1.4.4 Regulation der Genexpression der MMPs

Die Mechanismen der transkriptionalen Regulation der MMP-Expression sind komplex. Unter normalen physiologischen Bedingungen zeigt sich in der Regel eine schwache Expression der MMPs. Eine erhöhte Expression kann physiologischerseits bei den Prozessen der Wundheilung, Embryogenese, Uterusinvolution und der Angiogenese sowie pathologischerseits bei Arthritis, Tumorinvasion, Metastasierung vorkommen. Auch der pathologische Umbau von Geweben wie z.B. bei der Fibrose im Sinne eines „Tissue remodeling“ gehört dazu (Westermarck and Kahari 1999; Akool el, Kleinert et al. 2003; Jeziarska and Motyl 2009).

Für die intrazelluläre Regulation der MMP-Expression sind u.a. die drei MAP-Kinase-Wege mit der p38-MAP-Kinase, der JNK (Jun-N-terminale Kinase) und der ERK (extrazellulär regulierte Kinase) verantwortlich. Alle münden mehr oder weniger in die Aktivierung folgender Transkriptionsfaktoren wie:

NF-kappa-B: ist notwendig bei Expression der MMP-1,3,9,13 und 14 (Bond, Baker et al. 1999; Han, Tuan et al. 2001).

AP-1 hat Bindungsstelle bei den meisten induzierbaren MMPs.

STATS (engl.:signal Transducers and activators of transcription), durch sie werden hauptsächlich die Effekte der Interferone und anderer Zytokine vermittelt (Overall and Lopez-Otin 2002).

1.4.5 Die Gelatinasen

MMP-2 und MMP-9 bilden gemeinsam die Gruppe der Gelatinasen. Ihre Expression wird u.a. in einigen malignen Tumoren beschrieben und in Zusammenhang mit deren Invasivität und Metastasierungspotential gebracht. Ursache könnte die Fähigkeit der Gelatinasen, das Kollagen-IV der Basalmembran zu spalten, sein. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung zur zellulären Migration i.S. von Invasivität, Metastasierungspotential und Malignität dar (Roeb, Dietrich et al. 2001). Dabei korreliert die MMP-2-Aktivität z.B. beim Mammakarzinom mit einer schlechten Prognose (Jeziarska and Motyl 2009).

Oftmals können sowohl MMP-2 als auch MMP-9 in Tumorgeweben gleichzeitig nachgewiesen werden.

Dabei kommt es zur Interaktion zwischen MMP-2, MMP-9 und Kollagen IV und in dessen Folge zu einer verbesserten Spaltbarkeit des Kollagen IV durch die MMP-9, selbst bei Inaktivität der MMP-2 (Gioia, Monaco et al. 2008).

1.4.6 Die MMP-9

Die MMP9 (92kDa-Typ-IV-Kollagenase; Gelatinase-B) wird von humanen Leukozyten und Makrophagen produziert. Des Weiteren wird die MMP-9 von Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis exprimiert. MMP9 wird im normalen Knochen von Osteoklasten im Rahmen des ossären Remodelings exprimiert (Palosaari, Pennington et al. 2003).

Die Gelatinase-B konnte bei menschlichen Krebserkrankungen sowohl im neoplastischen Gewebe selbst als auch im umgebenden Stromagewebe nachgewiesen werden. Dabei wird sie überwiegend von Makrophagen an der „invasiven Front“ synthetisiert.

So war die MMP-9 beim Kolonkarzinom nachweisbar (Dornheim A 1997). Die MMP9 gehört mit der MMP2 zu den Gelatin-bindenden

MMPs. In der katalytischen Domäne existiert ein dreifach wiederholter, 19-kDa-fibronectin-ähnlicher Abschnitt (fibronectin-like-domain) mit Homologie zum Kollagen-bindendem Motiv (Typ II) des Fibronectins. Diese Region ist mit für die Substratspezifität der Gelatinasen verantwortlich.

Das MMP-9-Gen beinhaltet 13 Exons, befindet sich bei der Ratte auf Chromosom 3 (3q42) und hat eine Länge von 7961 Basen. Die prozessierte m-RNS hat eine Gesamtlänge von 2986 Basen. Die aus Exons bestehende, von Start- und Stop-Codon begrenzte Sequenz (coding-sequence; CDS) hat 2127 Basen. Es ergibt sich somit eine Aminosäurenkette von 708 AS.

Beim Menschen befindet sich das Gen auf Chromosom 20 bei Position q11.2-q13.1. Im Vergleich hat das Gen hier eine Länge von 7654 b. Die Prozessierte m-RNA hat mit ebenfalls 13 Exons eine Länge von 2336 bp. Die CDS beträgt 2124 Basen. Es ergibt sich eine Länge 707 Aminosäuren.

Bei Vergleich beider Proteine ergibt sich eine Identität von 74% (NCBI Protein-Protein-Blast).

1.4.6.1 Regulation der Genexpression der MMP 9

Die Expression der meisten MMPs ist transkriptional reguliert. Als potente Aktivatoren der MMP-9 Expression sind proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 β (IL-1) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bekannt.

Die Zytokin-vermittelte Expression der MMP-9 resultiert auf einer Aktivierung der stressinduzierten MAP-Kinasen (p38, c.Jun N-terminale Kinase) mit nachfolgender Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor kappa-B (NF- κ B).

Ein weiterer Mechanismus zur Modifikation der MMP-9 Expression besteht möglicherweise über die Regulation der m-RNA-Stabilität. Hierbei spielen A-U-reiche Sequenzen im 3` untranslatierten Abschnitt des MMP9 Gens eine Rolle, welche durch das sogenannte HuR-Protein erkannt werden. Nach dort erfolgter Bindung von HuR zeigt sich eine erhöhte m-RNA-Stabilität und somit eine erhöhte m-RNA-Menge.

Es zeigte sich, dass es abhängig von Stickstoffmonoxid (NO) via cGMP zur Downregulation des HuR-Proteins und damit letztendlich auch zur verminderten Expression der MMP9 kommt. Die diesbezüglich reduzierte EZM-Degradation kann letztendlich zur Fibrose-Entstehung beitragen. Der über NO vermittelte Mechanismus könnte einen generellen Regulationsweg darstellen (Eberhardt 2005).

Neuere Forschungen zeigten jedoch auch, dass sich die von NO vermittelte Downregulation der MMP-9 hauptsächlich über einen Angriff an der Promotorregion des MMP-9 Gens im Sinne eines Transkriptions-regulierenden Mechanismus darstellt (Jespersen, Doller et al. 2009). Für einen direkten Einfluss von NO auf den Cystein-Schalter ergeben sich derzeit keine Hinweise (McCarthy, Bove et al. 2008).

1.4.7 Die MMP-2

Die MMP-2 (Gelatinase A; 72kDa TypIV Kollagenase) gehört wie die MMP-9 zu den Gelatinasen. Das auf Chromosom 16 liegende Gen beherbergt die 3.536 Basen lange m-RNS der MMP-2 und kodiert für das 660 Aminosäuren enthaltende Protein.

Die MMP-2 beinhaltet drei „Fibronectin-type II-like“ Wiederholungen, die die Kollagen bindende Domäne (CBD) bilden. Während die CBD zur Spaltung von Kollagen unabdingbar ist, kann Gelatin auch ohne CBD gespalten werden (Jeziarska and Motyl 2009).

Wie bei den meisten MMPs wird das Zymogen in den Extrazellulärraum sekretiert. Zur vollständigen Aktivierung muss die Propeptiddomäne abgespalten werden. Dazu bindet die pro-MMP-2 an einen Komplex aus MT1-MMP (MMP-14) und TIMP-2, der gewissermaßen als Rezeptor dient und es einer weiteren MT1-MMP ermöglicht die pro-MMP-2 zu aktivieren (Palosaari, Pennington et al. 2003; Jezierska and Motyl 2009).

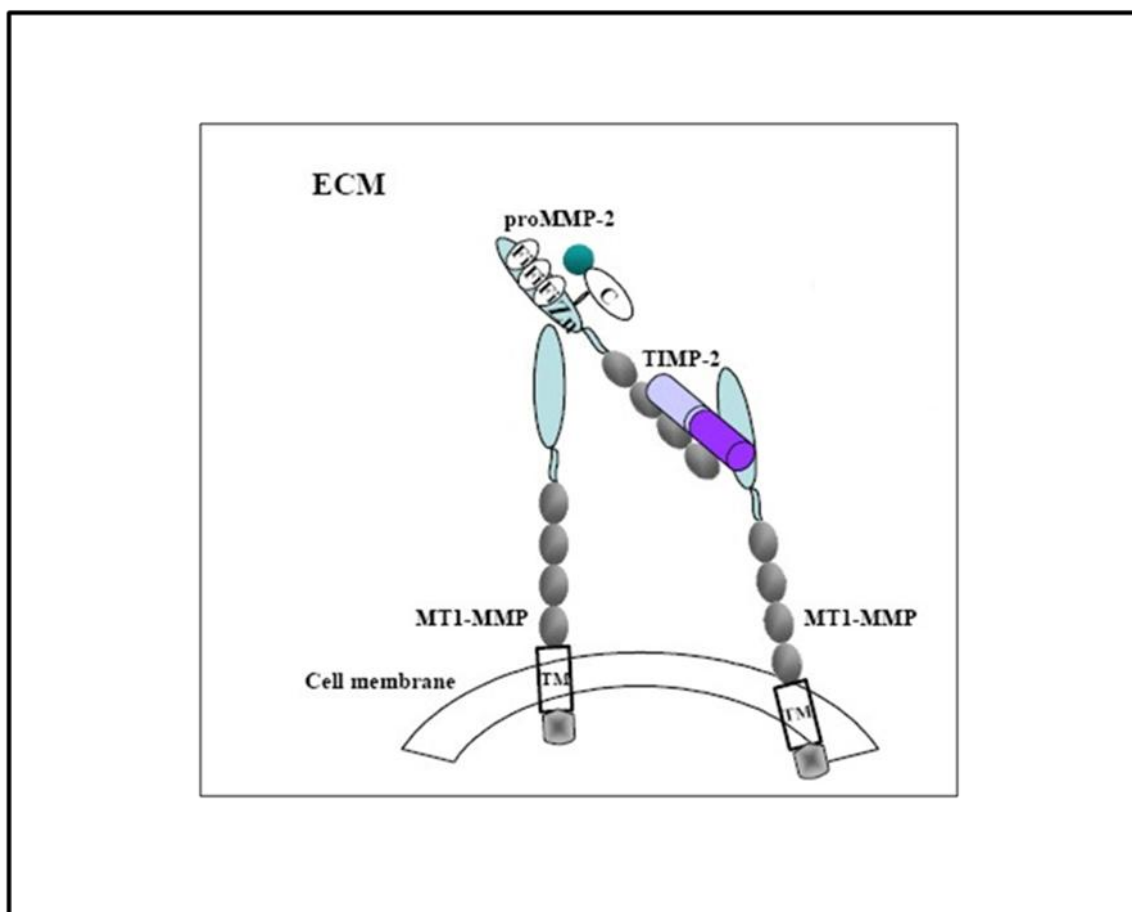


Abbildung 6: Aktivierungsprozess der pro MMP-2 (Palosaari, Pennington et al. 2003)

Die MMP-2 spaltet vorzugsweise Gelatin und Kollagen IV aber auch Kollagen V, VII und X sowie Fibronectin. Außerdem werden von der MMP-2 Knorpel-Proteoglykan und Elastin gespalten (Visse and Nagase 2003).

Wie schon o.g. spielt die MMP-2 eine wichtige Rolle bei der Tumoringression durch die Basalmembran, sowie bezüglich des Metastasierungspotentials. Sie ist ein prognostischer Faktor, insofern sie als Indikator für Metastasen dient.

1.4.7.1 Regulation der MMP-2

Wachstumshormone und Zytokine modulieren die Expression der MMP-2. Expressionssteigernd wirken IL-1, PDGF (platelet derived growth factor) und TNF- α , expressionsmindernd wirken Heparin, TGF- β (Tumor-Growth-Factor- β) (Jeziarska and Motyl 2009).

Der Promotor der MMP-2 enthält keine TATA-Box und kein TPA-RE (Response-Element). Nach der Analyse von Clark et al. beinhaltet der MMP-2 Promotor Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren STAT (signal transducer and activator of transcription), NF- κ B (Nukleärer Faktor- κ B), TCF/LEF (T Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor) sowie ein RE für Retinoinsäure (Clark, Swingler et al. 2008).

1.4.8 Die MMP-13

Das Gen der MMP-13 (Kollagenase III) befindet sich auf Chromosom 11 (11q22.3); die prozessierte m-RNS hat eine Länge von 2722 Basen. Das resultierende Protein hat eine Länge von 471 Aminosäuren.

Der Promotor der MMP-13 beinhaltet Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1, STAT sowie ein Retinoinsäure-RE (Response-Element) (Clark, Swingler et al. 2008).

Die MMP-13 spaltet interstitielles Kollagen I, II und III, sowie weitere EZM und nicht-EZM-Moleküle (Jeziarska and Motyl 2009).

1.5 Die Proteinkinase PKB / AKT

Vorkommen / Entdeckung

Aus dem Maus-Stamm AKR, welcher eine hohe Inzidenz von Lymphomen und Leukämien zeigt (Staal, Hartley et al. 1977), wurde ein Retrovirus isoliert, der als AKT-8 bezeichnet wurde. Die Reinokulation dieses Virus in junge Mäuse führte wieder zur Entstehung von Tumoren. In der Zellkultur konnte der Virus dagegen lediglich die Lungenzellen eines Nerz (CCL64) tumorigen transformieren (Staal and Hartley 1988). Die nichtvirale DNA-Komponente (v-Akt) wurde später identifiziert und zwei humane Homologa, AKT1 und AKT2 geklont (Staal 1987). Die Lokalisation des AKT1-Locus im Genom wurde auf die Region 14q32 festgestellt (Staal, Huebner et al. 1988), in welcher oft Veränderungen bei T-Zell-Leukämien/Lymphomen gefunden werden (Bertness, Felix et al. 1990). Im primären Adenokarzinom des Magens wurde beispielsweise eine 20-fache Erhöhung der AKT1 gefunden. AKT2 wurde auf dem Genlokus 19q31.1-q13.2 identifiziert. Eine Überexpression dieses Gens konnte in Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen bzw. in Pankreaskarzinom-Zelllinien festgestellt werden (Cheng, Godwin et al. 1992; Miwa, Yasuda et al. 1996; Yasuda, Kimura et al. 1996).

Das zelluläre Homolog von v-Akt wurde 15 Jahre nach der Entdeckung des AKT8 Retrovirus von mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig geklont. Das 57kDa Protein wurde als Serin-/Threonin-Kinase identifiziert und zeigte große Ähnlichkeit mit der PKC bzw. PKA und wurde deshalb auch als PKB oder RAC-Kinase (Related to A and C) bezeichnet (Coffer, Jin et al. 1998).

1.5.1 Aufbau der PKB

Bei Säugetieren existieren drei Gene für die PKB/AKT: PKB α /AKT1, PKB β /AKT2, PKB γ /AKT3. β - und γ - Isoformen sind zu 82% identisch mit der α -Isoform der PKB (Konishi, Kuroda et al. 1995). Die weite Verbreitung und Konservierung des PKB Gens in der Evolution konnte

durch die gefundenen Isoformen der PKB in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden (Waterston, Martin et al. 1992; Franke, Tartof et al. 1994). Das virale Gen v-Akt ist aus einer Fusion des virusspezifischen Gens GAG und der PKB/AKT1 hervorgegangen. Die Myristilierung des viralen GAG-Proteins führt zur Membranständigkeit des ansonsten im inaktiven Zustand meist zytosolischen zellulären Akt-Proteins [16]. Die Sequenzanalyse der PKB ergab einen Aufbau aus drei Domänen. N-terminal konnte eine Pleckstrin-homology (PH)-Domäne identifiziert werden. Darauf folgt die zentrale katalytische Einheit, die Ähnlichkeit mit PKC und PKA hat. C-terminal befindet sich dann eine regulatorische Domäne mit einem hydrophobischem Motiv (Coffer, Jin et al. 1998).

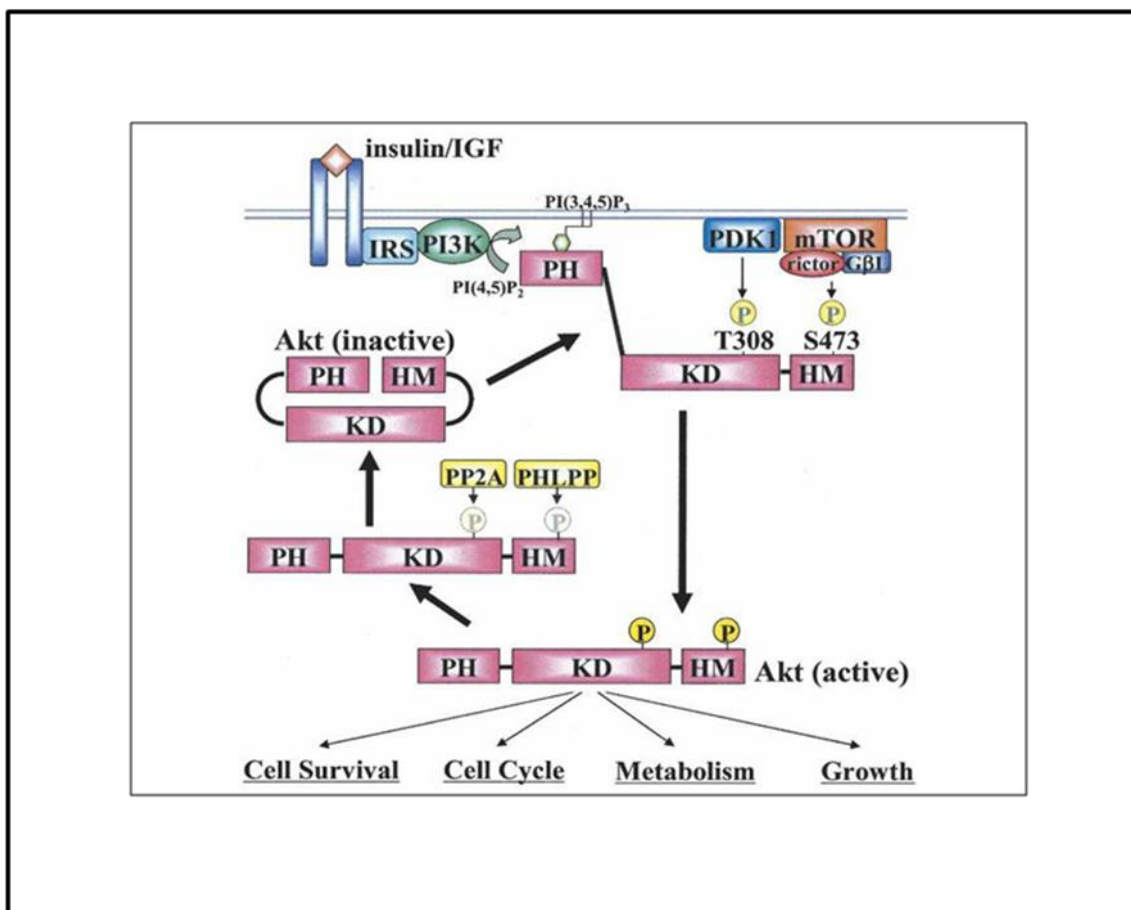


Abbildung 7: Schema des Aktivierungsvorgangs der PKB mit den zur Aktivierung erforderlichen Phosphorylierungsstellen T305 und S474 (Shiojima and Walsh 2006).

1.5.2 Synopsis des Aktivierungsprozesses

In unstimulierten Zellen befindet sich die inaktive PKB im Zytosol, dabei wird die katalytische Domäne von der hydrophobischen C-terminalen Domäne maskiert.

Bei Stimulation (z.B. durch IGF) entsteht ein aktivierter Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Komplex. Dieser führt über die Phosphorylierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die den aktivierten Rezeptor Tyrosin-Kinase-Komplex mittels der SH2 Domäne erkennt, zur Aktivierung der PI3K. Dabei sind die PI3K wie auch der Tyrosin-Rezeptorkomplex membranständig. Die von der PI3K produzierten Phosphoinositole werden an der Plasmamembran von den PH-Domänen der PDK1 (Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1) der PKB und des mTORC2-komplexes (mammalian target of rapamycin complex-2) erkannt. Dies sind insbesondere das $PI(3,4)P_2$ und das $PI(3,4,5)P_3$ (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Dies führt zur Rekrutierung der PKB, der PDK1 und des mTORC2 an die Zellmembran. Dort erfolgt die Aktivierung der PKB mittels Phosphorylierung an T308 durch die PDK1, während die Phosphorylierung an S473 durch den Komplex mTORC2 erfolgt (Sarbasov, Ali et al. 2005; Sarbasov, Guertin et al. 2005; Shiojima and Walsh 2006) .

Erst die Phosphorylierung an beiden Stellen führt zur vollen Aktivierung der PKB. Aktivierte PKB kann nun von der Zellmembran in andere Zellkompartimente translozieren und dort durch Phosphorylierung ihrer Substrate ihre biologischen Effekte ausüben.

Die Deaktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung durch die Protein-Phosphatase-2A an T308 und durch PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) an S473.

Auf der Ebene der PI3K wirkt die Lipidphosphatase PTEN antagonistisch durch Reduktion der PI(3,4,5)P₃-Menge an der Plasmamembran (Shiojima and Walsh 2006).

1.5.3 Phosphorylierung durch Akt/PKB

Die von der PKB/AKT katalysierte Phosphorylierung ist an die Erkennung eines Sequenzmotivs gebunden. Durch Forschungsarbeiten an dem zuerst identifiziertem Ziel-Protein, der GSK-3 β (Glykogensynthasekinase-3 β) konnte das Wiedererkennungsmotiv R-X-R-X-X-S/T-B durch Alessi et al. gefunden werden (Manning and Cantley 2007).

1.5.4 Biologische / physiologische Funktion der PKB

Die physiologische Funktion wird insbesondere im Zusammenhang mit der Wirkung von Insulin diskutiert. So scheint eine aktivierte PKB viele Effekte des Insulins an insulinsensitiven Zellen zu imitieren.

Die zurzeit bekannten Funktionen lassen sich daher in verschiedene Hauptgruppen gliedern.

Akt vermittelt antiapoptotische Signale über BAD, Caspase-9 und, FOXO-Transkriptionsfaktoren.

Die Progression des Zellzyklus (Proliferation) wird über Phosphorylierung u.a. von MDM2, p21, p27, und Myt1 vermittelt (Brazil, Yang et al. 2004).

Regulation des Glukosestoffwechsels durch Phosphorylierung der GSK-3 (Shiojima and Walsh 2006).

Die Liste der zurzeit bekannten Substrate der PKB ist vielfältig und wächst weiterhin.

1.5.4.1 Veränderungen bzw. Modulation des Kohlenhydratstoffwechsels

Als akute Antwort auf Insulin bewirkt die aktivierte PKB/Akt die Translokation von GLUT4 Transportern in die Zytoplasmamembran und führt damit zu einem erhöhten Glukosetransport in die Zellen (Calera, Martinez et al. 1998; Manning and Cantley 2007).

Die durch AKT/PKB vermittelte Inhibition der GSK-3 führt letztendlich zu einer Steigerung der Glykogensynthese und Glykolyse (Elstrom, Bauer et al. 2004; Manning and Cantley 2007).

Die Phosphorylierung der PFK2 durch die PKB bewirkt eine Zunahme an Fruktose (2,6)-Bisphosphaten, was wiederum zur Steigerung der Glykolyse führt (Coffer, Jin et al. 1998).

1.5.4.2 Einfluss auf die Proteinsynthese und das Zellwachstum

Der Hauptmechanismus der Einflussnahme auf die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum scheint die Aktivierung des mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin-Complex-1) durch AKT/PKB zu sein. mTORC1 spielt eine entwicklungsgeschichtlich hoch konservierte Rolle in der Wachstumskontrolle als Regulator der Translationsinitiation und Biogenese der Ribosomen (Wullschleger, Loewith et al. 2006). Zu einem gesteigerten Zellwachstum und einer vermehrten Proteinbiosynthese führt hierbei die Aktivierung der p70S6-Kinase und Inhibition des 4E-BP-1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) durch mTORC1 (Manning and Cantley 2007). AKT/PKB aktiviert mTORC indirekt durch Inhibition von TSC-2 (Tuberous sclerosis protein 2), wodurch es Rheb (ein Ras ähnliches Protein, Familie der kleinen GTPasen) möglich wird, mTORC zu aktivieren (Manning and Cantley 2007).

1.5.4.3 Einfluss auf Zellüberleben / Apoptose

Durch Blockade proapoptotischer Proteine kann AKT/PKB zu einem vermehrten Zellüberleben führen, welche zur Entstehung von Tumoren beitragen könnte. Zum Beispiel wird durch direkte Phosphorylierung von BAD (einem proapoptotischen Protein aus der Bcl-2-Familie) an S136 die Bildung eines Homodimers, bestehend aus BAD und dem 14-3-3-Protein ausgelöst. Dadurch wird BCL-2 aus der vorbestehenden Bindung mit BAD entlassen und kann nun seinen antiapoptotischen Effekt ausüben (Manning and Cantley 2007).

Eine weitere antiapoptotische Wirkungsweise basiert auf der Akt-abhängigen Phosphorylierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren, in deren Folge diese aus dem Nukleus transportiert werden und somit nicht mehr durch entsprechende Transkriptionsinitiation (zum Beispiel des Fas-Liganden) apoptotisch wirksam sein können (Brunet, Bonni et al. 1999; Manning and Cantley 2007).

PKB kann durch eine Phosphorylierung die für die Apoptose wichtige Initiatorcaspase-9 hemmen (Cardone, Roy et al. 1998; Manning and Cantley 2007).

1.5.4.4 Einfluss der PKB/AKT auf die Zellproliferation

Die Akt/PKB-abhängige Phosphorylierung von p27^{Kip1} (einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen) führt zur 14-3-3 abhängigen Sequestrierung im Zytosol und somit zur Abschwächung des inhibitorischen Effekts auf den Zellzyklus am Kontrollpunkt zwischen G1 und S-Phase (Sekimoto, Fukumoto et al. 2004; Manning and Cantley 2007).

GSK-3 abhängige Phosphorylierung von Cyclin-E und D sowie der Transkriptionsfaktoren c-jun und c-myc führen zur proteasomalen Degradation. Wegen der Inhibition der GSK-3 durch AKT/PKB werden

diese für die Regulation des Zellzyklus wichtigen Proteine vor dem Abbau bewahrt und können proliferationssteigernd wirksam sein (Diehl, Cheng et al. 1998; Wei, Jin et al. 2005; Manning and Cantley 2007).

1.5.4.5 Einfluss von PKB/AKT auf die Angiogeneese

AKT/PKB spielt eine wichtige Rolle bezüglich der Angiogeneese in endothelialen Zellen und Tumorzellen, die angiogenetische Signale produzieren. In endothelialen Zellen ist der PI3K-AKT-Weg über VEGF (vascular endothelial growth factor) stark aktiviert (Olsson, Dimberg et al. 2006; Manning and Cantley 2007). Wie oben beschrieben führt Akt zum Überleben, Wachstum und Zellteilung der endothelialen Zellen. Weiterhin aktiviert AKT/PKB die eNOS (endotheliale NO-Synthetase). Freies Stickstoffmonoxid, welches durch die eNOS gebildet wurde, kann zu Vasodilatation, vaskulärem Umbau und zur Angiogeneese führen (Dimmeler, Fleming et al. 1999; Morbidelli, Donnini et al. 2003; Manning and Cantley 2007).

Zur Untersuchung der biologischen Funktion der PKB wurden Akt/PKB-Knockout (KO) und AKT/PKB transgene Mäuse untersucht.

1.5.4.6 Untersuchungen an PKB KnockOut (KO)-Mäusen

AKT1/PKB α KO: Ein Knock-Out der AKT1 bewirkte eine Wachstumsretardierung in utero, z.T. durch plazentare Insuffizienz als auch das Auftreten spontaner Apoptose im Thymus. AKT1 hat somit große Bedeutung im embryonalen Wachstum (Yang, Tschopp et al. 2004).

AKT2/PKB β KO

Dieser KO hat das Auftreten eines schweren Diabetes mellitus mit peripherer Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und hoher

Glukoseintoleranz sowie kompensatorischer Hypertrophie und Hyperplasie der β -Zellen des Pankreas zur Folge. Dies war eine der zu erwartenden Dysfunktionen bei bekannter Insulin-vermittelnder Funktion von AKT/PKB. Des Weiteren zeigen sich eine leichte Wachstumsretardierung und ein altersabhängiger Verlust des Fettgewebes (Yang, Tschopp et al. 2004).

Die PKB β /AKT2 spielt somit eine große Rolle im Glukosestoffwechsel, der Lipogenese und der β -Zellfunktion. Wie die PKB α /AKT1 ist auch sie, wenngleich auch in geringerem Ausmaß, an der Regulation des Zellwachstums beteiligt. Die PKB β /AKT2 stellt in den insulin sensitiven Geweben die hauptsächlichst exprimierte Isoform der PKB dar (Yang, Tschopp et al. 2004).

AKT3/PKB γ KO

Im Gegensatz zu 1) und 2) konnte keine Wachstumsretardierung der KO Mäuse verzeichnet werden, stattdessen findet man eine deutliche Reduktion von Größe und Gewicht des Gehirns bei adulten Tieren, die histologisch hauptsächlich durch Reduktion von Zellzahl und Zellgröße gekennzeichnet sind. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle bei der postnatalen Gehirnentwicklung hin (Yang, Tschopp et al. 2004).

Doppelt-KO (DKO)-Mäuse bezüglich PKB α /PKB γ (AKT1/3) sterben in der Embryonalphase, wahrscheinlich durch massive plazentare Insuffizienz (Wachstumsregulation!). DKO bezüglich PKB α / β (AKT1/2) zeigt eine hohe postnatale Mortalität bei massiver Wachstumsretardierung mit Muskelatrophie sowie Entwicklungsstörungen der Haut, des Knochengewebes (Yang, Tschopp et al. 2004).

1.5.4.7 Untersuchungen an transgenen Mäusen

Zur Untersuchung einer PKB/AKT Überexpression in vivo wurden mehrere transgene Mausmodelle erstellt. Verwendung als konstitutiv aktive PKB fanden u.a. eine myristoylierte, sowie eine durch Aminosäureaustausch an T306 und S473 durch Asparaginsäure mutierte PKB. Die Expression der mutierten PKB-Gene wurde durch Benutzung gewebespezifischer Promotorsequenzen ermöglicht (Yang, Tschopp et al. 2004). Bei AKT/PKB Überexpression zeigte sich meistens ein plötzlicher postnataler Tod durch Herzinsuffizienz mit massiver kardialer Dilatation. Überlebende Tiere waren durch eine kardialen Hypertrophie durch Zellwachstum der Kardiomyozyten mit Zunahme der Kontraktilität gekennzeichnet. Parallel dazu fand man eine Verringerung der Größe des Infarktareals nach experimentell induziertem Myokardinfarkt mit folgender Ischämie und Reperfusion (Yang, Tschopp et al. 2004).

Überexpression der PKB im Thymus zeigte eine frühzeitige Entstehung von Lymphomen und einen Einfluss auf Selektion, Überleben und Metabolismus von T-Zellen mit Auftreten von Auto-Immunität.

Überexpression der PKB/AKT im Brustdrüsengewebe zeigte ein deutlich verspätetes Einsetzen der Involution des Brustdrüsengewebes durch Inhibition der durch Apoptose gekennzeichneten Mamma-Involution. Außerdem fand man einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, da laktierende Tiere mit PKB Überexpression einen massiv gesteigerten Fettanteil in der produzierten Milch aufwiesen (Yang, Tschopp et al. 2004)

Überexpression der PKB/AKT im Pankreasgewebe zeigte eine Hypertrophie und Hyperplasie der Langerhans-Inselzellen mit nachfolgender Hyperinsulinämie (Yang, Tschopp et al. 2004).

Nach Überexpression der PKB in der Prostata fand man die Entstehung von Prostatakarzinomen als Folge der PKB-Aktivierung (Yang, Tschopp et al. 2004).

Im Gesamtbild zeigt sich dass die PKB Zellwachstum und Proliferation, sowie antiapoptotische und metabolische Effekte vermittelt. In einigen Geweben kann sie als alleiniger Faktor eine Tumorgenese auslösen, in anderen Geweben gelingt dies nur unter synergistischer Wirkung mit anderen Onkogenen (Yang, Tschopp et al. 2004).

1.5.4.8 Rolle von PKB/AKT am Herzen

AKT/PKB kommt eine tragende Rolle bei der Organogenese und des Herzwachstums zu. So wird durch den PI3K-PKB/AKT Signalweg die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu embryonalen Kardiomyozyten durch selektives Zellüberleben (cell-survival) der differenzierten Kardiomyozyten unterstützt (Fujio, Nguyen et al. 2000; Shiojima and Walsh 2006). Die Regulation der sich anschließende Proliferation der embryonalen Kardiomyozyten erfolgt u.a. durch den PI3K-PKB/AKT Weg (McDevitt, Laflamme et al. 2005). Postnatales Herzwachstum ist in der Regel mehr durch Hypertrophie einzelner Herzmuskelzellen als durch Hyperplasie gekennzeichnet (Olson and Schneider 2003). In transgenen- und KnockOut-Studien konnte bewiesen werden, dass das postnatale Herzwachstum, die physiologische Hypertrophie (z.B. bei Athleten), als auch die pathologische Hypertrophie (z.B. durch Nachlasterhöhung) durch den PKB/AKT-Signalweg positiv reguliert werden. Dabei wird die Hypertrophie als „physiologische“ Hypertrophie bezeichnet, wenn sie keine pathologischen Strukturveränderungen (z.B. Fibrose) trägt, keine Dysfunktion zeigt und sie nach Absetzen des Stimulus komplett reversibel ist. Dem gegenüber zeichnet sich die sogenannte „pathologische“ Hypertrophie durch Strukturveränderungen wie linksventrikuläre Dilatation,

einer interstitielle Fibrose und durch eine kontraktile Dysfunktion sowie durch ihre Irreversibilität aus.

Dabei scheint das Auftreten der durch AKT/PKB-Aktivierung vermittelten kardialen Veränderungen abhängig von Grad und Art der Aktivierung des PKB/AKT-Signalweges zu sein. So zeigte sich die Entstehung einer physiologischen Hypertrophie nach relativ kurzzeitiger, das Auftreten einer pathologischen Hypertrophie jedoch erst nach längerfristiger Aktivierung der PKB/AKT in einem transgenen Mausmodell (Schiekofer, Shiojima et al. 2006).

Akt/PKB vermittelt auch Angiogenese. So ist die physiologische Hypertrophie, einer kurzfristigen AKT-Aktivierung folgend, durch eine erhaltene Kapillardichte gekennzeichnet (Shiojima, Sato et al. 2005).

Insulin (Insulin und IGF i.e.S.) ist einer der potentesten Aktivatoren des PKB/AKT Signalweges und Mediator des Glukosestoffwechsels am Herzen. Diesbezüglich kommt es durch die Insulinwirkung zur vermehrter Glukoseaufnahme, -oxidation und Glykogenspeicherung unter gleichzeitiger Inhibition der β -Oxidation von Fettsäuren. Neben dem gut bekannten metabolischen Effekt, reguliert der Insulin-PKB/AKT-Weg das o.g. postnatale Herzwachstum. Konkludent hierzu ist die bekannte Korrelation zwischen Herzgröße/Herzgewicht zum Ernährungsstatus (An and Rodrigues 2006; Shiojima and Walsh 2006).

1.6 Replikative Seneszenz (RS)

Die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen nimmt mit dem Alter deutlich zu. In der Zellkultur mit Fibroblasten kann gezeigt werden, dass ab einer bestimmten Anzahl von Passagen und der damit verbundenen Zellteilungen, die Teilungsfähigkeit der Fibroblasten stark abnimmt. Es entstehen sich nicht mehr teilende Zellen, die sich im

Stadium der sogenannten replikativen Seneszenz befinden (Campisi 1997). Es scheint erwiesen, dass replikative Seneszenz mit dem Altern eines Organismus im engen Zusammenhang steht (Campisi 1996). Diese Aussage wird gestützt durch die Erkenntnis, dass kultivierte Zellen von jungen Individuen mehr Populationsverdopplungen benötigen als Zellen von alten Individuen, um in das Stadium der RS einzutreten. Auch zeigen Zellen von Patienten mit Krankheiten, bei denen vorzeitiges Altern eine Rolle spielt, ebenfalls nur eine reduzierte Replikationsfähigkeit im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Individuen. Einige Zellen in der replikativen Seneszenz sind andererseits durch Serumstimulation teilungsfähig, die Stimulierbarkeit durch singuläre Wachstumsfaktoren nimmt jedoch stark ab (Bauer, Silverman et al. 1986; Simm, Halle et al. 1994). In der RS ändert sich das Profil an exprimierten Genen. Betroffen sind u.a. Gene des Zellzyklus wie cdk-1/2, Cyklin A/B, c-fos und pol α . Dies passt zu der Annahme, dass die RS einen wichtigen Tumor-Unterdrückungsmechanismus darstellt. Diez et al. (Diez, Nestler et al. 2001) zeigten bei alternden Fibroblasten der Ratte in vitro eine differenzielle Expression der PKB α /AKT-1. Im Stadium der replikativen Seneszenz war die Expression der PKB α auf Protein-Ebene wie deren Aktivität ebenfalls reduziert. Die Ergebnisse wurden unterstützt durch die Tatsache, dass bei Myokard-Biopsaten von jungen und alten Patienten (ohne Myokardpathologie) die Expressionsstärke der AKT-1/PKB α mit dem Alter abnahm. Andererseits zeigen sich eine hohe Expressionsrate von AKT/PKB während der Zelldifferenzierung, z.B.: wenn multipotente Fibroblasten (10T1/2) durch Myo-D sich zu Myozyten entwickeln (Diez, Nestler et al. 2001).

Fragestellung

Die vorgelegte Arbeit sollte die Frage klären ob AKT/PKB zu einer veränderten Expression von extrazellulären Matrix-Proteinen, denen sie abbauenden Matrixmetalloproteinasen bzw. deren Inhibitoren führt und damit zu einer Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix im Sinne einer Fibrose beitragen könnte?

Folgende zu untersuchende Gene wurden zur Beantwortung dieser Fragen ausgewählt:

MMPs	TIMPs	EZM-Proteine	TGF- β
MMP-2	TIMP-1	Kollagen 3	TGF β 1
MMP-9	TIMP-2	Kollagen 4	TGF β 2
MMP-13	TIMP-3	Kollagen 1	TGF β -3
MMP-14		Fibronectin	

Tabelle 2: Liste der mit der RT-PCR untersuchten Gene.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 RNA Präparation:

- RNA Präparationsreagenz:

Trizol, (Life Technologies, USA), Katalog Nr.: 15596

- Säulenaufreinigungssystem:

Rneasy mini Kit, (Quiagen, Hilden), Kat Nr.: 74104

DNase (Sigma, München, D), Produkt-Nr.: AMP-D1

2.1.2 Reverse Transkription

- Random Primers:

(Invitrogen), Kat.-Nr.: 48190-011, 3 μ g/ μ l in 3 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2 mM EDTA.

- DEPC H₂O: (wurde im Labor selbst hergestellt)

Dazu wurde eine 0,1 % (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) Lösung hergestellt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte durch 15 minütiges Autoklavieren die Inaktivierung des DEPC.

2.1.3 Reverse Transkription:

- Reaktionspuffer 5x:

(im Set mit M-MLV RT), 50mM Tris-HCl (pH 8.3 bei 25°C), 75mM KCl, 3mM MgCl₂ and 10mM DTT

- dNTP Mix:

(Invitrogen, Karlsruhe,D), Kat.-Nr.: 18427-088, 10 mM jeweils dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 0.6 mM Tris-HCl (pH 7.5)

- M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus

(Promega, Madison, USA Kat.-Nr.: M5301) in Storage Buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 200mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% Nonidet® P-40 and 50% Glyzerol)

2.1.4 PCR

- Primer:

(Sigma ARK, Darmstadt, D) als Lyophilisat: Länge 20 Basen, Maßstab 0,05

- PCR Master Mix Set:

(Promega), Kat.-Nr.: M7505, enthält:

2x PCR Master Mix (50units/ml TaqDNA Polymerase in entsprechendem Reaktionspuffer (pH 8.5), 400µM jeweils: dATP, dGTP, dCTP, dTTP

3mM MgCl₂,

Nuklease-freies Wasser

2.1.5 Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer10x:	
108g	Base(SERVA, Heidelberg,D), Kat Nr.: 37186
55g	Borsäure (SERVA) Kat Nr.: 15165.02
20ml	500mmol EDTA (SERVA) Kat Nr.: 39761.02 (auf einen Liter bidestilliertem Wasser)

Ethidiumbromid:	Ethidium bromide solution (SIGMA) Kat Nr.: E1385)
Ladepuffer:	50% Glycerin (SERVA), Kat Nr.: 23177.01und und einige Körnchen Bromthymolblau (SERVA) KatNr.:15375
DNS Leiter:	100bp DNA Ladder (Promega, Cat.Nr.:g2101)

2.1.6 Zymographie

➤ Probenpuffer:

ddH ₂ O	2,15 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
Glyzerol	2,5 ml
10% SDS	4,0 ml
1% Bromphenolblaul	0,1 ml
Gesamt	10 ml

Die Proben aus den Zellkulturüberständen werden im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt und dann aufgetragen.

2.1.6.1 SDS-Protein-PAGE:

➤ Laufpuffer für SDS-PAGE:

Tris base (Merck Darmstadt ,D))	15,0g
---------------------------------	-------

Glycine (Sigma)	72,0 g
SDS (Sigma Kat.Nr.: L3771)	5,0g
Volumen mit ddH2O auf 500 ml aufgefüllt.	pH 8,3

➤ SDS-Acrylamidgel:

	Laufgel 10%:	Sammel- Gel
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	3,3ml	0,815ml
4x Tris-HCL/SDS	2,5ml	1,55ml
ddH2O (selbst)	4,2ml	3,8ml
APS 10% (Sigma Taufkirchen, D)	33,3µl	31,3µl
TEMED (Sigma)	6,68µl	6,25µl
Kollagen Ia/Gelatin (Sigma)	1mg	
Gesamt	10ml	

➤ Gefärbter Proteingrößenmarker:

4-250kDa bei Tris-Glyzine SDS	See Blue Plus2 (Invitrogen), KatNr.: LC5925,
-------------------------------	--

➤ Renaturierungspuffer:

Triton X-100 (Sigma, Kat.Nr.: 234729-100ML)	25g
Aufgefüllt mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml	

➤ Entwicklungspuffer:

Tris Base (Merck)	6,06g
NaCl (Sigma)	11,7g
CaCl ₂ (Sigma)	0,56g
30%Brij-35 (Sigma, Kat.Nr.: B4184)	0,67ml

Alles o.g. wurde in 900 ml ddH₂O aufgelöst, der pH mit 6N HCL auf 7,5 eingestellt und zu 1000ml mit ddH₂O ergänzt.

➤ Färbelösung:

Methanol (Sigma, M1775-1GA)	Kat.Nr.:	40 ml
Eisessig (Sigma, 380121)	Kat.Nr.:	10ml
ddH ₂ O		50ml
Coomassie Brilliant Blue (BioRad)		0,5g

➤ Entfärbelösung:

Methanol (Sigma, M1775-1GA)	Kat.Nr.:	40 ml
Eisessig (Sigma, 380121)	Kat.Nr.:	10ml
ddH ₂ O		50ml

2.1.7 Geräte

Elektrophoreseeinheit:	Ready SubCell GT ,(BioRad, München,D)
PCR-Gerät:	Master-Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg D)
Zentrifuge:	Biofuge, fresco (Heraeus, Hanau, Deutschland)
PAGE-Kammer:	System Mini Protean 3 (BioRad)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Eine Fibroblastenzelllinie der Maus, beschrieben unter anderem bei (Garcia Arguinzonis, Galler et al. 2002), wurde auf 6-Well Platten der Firma Falcon in DMEM Medium (Invitrogen, Ort, D) mit Zusatz von

10% Hyclone Kalbsserum kultiviert. Untersucht wurden diese Zellen in 3 Wachstumsphasen:

Logarithmisches Wachstum (niedrige Zelldichte), im Weiteren als Versuch-1 (V1) bezeichnet.

Kontaktinhibition (hohe Zelldichte, Serumentzug für 2 Tage), im Weiteren als Versuch-2 (V2) bezeichnet.

Re-Stimulation (Stimulation der ruhenden Zellen aus V2 mit 10% Kalbsserum für 24 Stunden), im Weiteren als Versuch-3 (V3) bezeichnet.

2.2.2 Adenovirale Transfektion

Diese Zellen wurden mit adenoviralen Vektoren für 24 Stunden transfiziert. Diese Vektoren wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Walter unter Verwendung des Transfektionsvektors pCMVI/deltaE1A Vektors (Micobix Biosystem Inc.) hergestellt. Dabei wurden uns folgende Konstrukte von Brian Hemmings zur Verfügung gestellt:

HA-PKB α -T308D/S473D - konstant aktive PKB,

HA-PKB α -K179A – inaktive Form der PKB

Diese Klone waren als ca. 1,5 kB große Bgl-II / Xba-I Fragmente in pCMV5 einkloniert. Alle Konstrukte wurden über Bgl-II / EcoR-I ausgeschnitten und in pCMVI/IRES einkloniert. Der Leervektor wurde auch als Transfektionskontrolle verwendet. Diese Shuttle-Vektoren wurde gemeinsam mit dem genomischen Plasmid pBHGfrtdeltaE1,3FLP in 293 Zellen mittels Ca-Phosphatpräzipitation transfiziert und entsprechende Adenoviren (GFP als Kontrollgen) aufgereinigt. Diese Konstrukte wurden von Frau Petra Thalheimer im Labor des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie hergestellt.

Nicht transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet.

2.2.3 RNS-Präparation

Zur RNS Präparation wurde die Trizol Methode (Life Technologies) verwendet. Die Lyse der Zellen wurde direkt auf der Platte durch Zugabe von 2ml Trizol-Lösung durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und die Suspension mit Hilfe einer Pipette in ein Eppendorf Gefäß überführt und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ l Chloroform und Schütteln per Hand für 15 Sekunden wurde nochmals für 3 Minuten inkubiert und anschließend mittels Zentrifugation (Herareus Biofuge fresco) für 15 min bei 12000g / 4°C die Phasentrennung erreicht. Die in der oberen wässrigen Phase befindliche RNS wurde in ein neues Gefäß pipettiert und durch Zugabe von 1 ml 75 % Isopropylalkohol für 15 Minuten bei RT präzipitiert. Nach Zentrifugation mit 12000 g bei 4°C für 10 Minuten wurde das Pellet mit 2 ml EtOH gewaschen (Zugabe und abzentrifugieren bei 7500 g für 5 min bei 4°C). Nach Trocknen des Pellets an der Luft für 10min wurde die RNA in 60 μ l RNase freiem Wasser aufgelöst. Dazu erfolgte eine Inkubation bei 55 °C.

Zur Sicherheit wurde noch ein DNA Verdau durchgeführt und RNS mit Hilfe des Rneasy Kits (Quiagen, Hilden, D) aufgereinigt.

2.2.3.1 DNA Verdau

Zu 53 μ l RNA Probe wurden 6 μ l 10-fach Reaktionspuffer und 1 μ l DNase I (Sigma München D) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.2 Säulenaufreinigung

Die RNA Proben wurden laut den Anweisungen für das Aufreinigungsprotokoll des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden D) behandelt und zum Schluss mit 2x 50 μ l DEPC Wasser eluiert.

Die Reinheit der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidanfärbung gezeigt.

2.2.3.3 Nukleinsäurebestimmung

Die Absorption von DNA, RNA, Oligonukleotiden oder auch Mononukleotiden wurde in gepufferter Lösung (pH 7-8, z.B. TE-Puffer) bei 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 OD (E) entspricht ca. 40 μ g/ml RNA. Anhand dieser Faktoren wird über die gemessene Extinktion und den Verdünnungsfaktor die Konzentration einer unbekannt Probe errechnet.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde auf 100 ng/ μ l RNA eingestellt.

2.2.3.4 Reinheit der RNS-Präparation

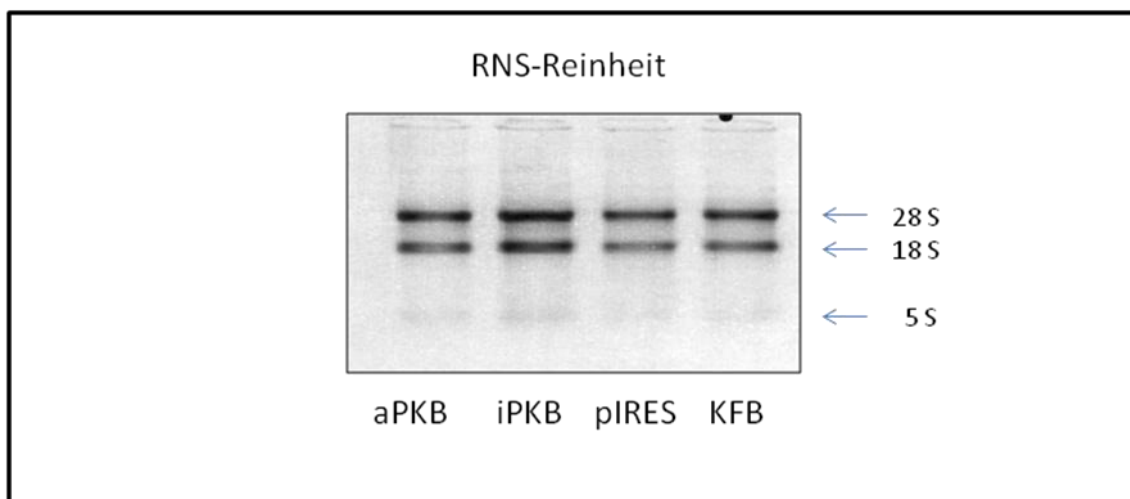


Abbildung 8: aPKB: aktive AKT/PKB Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten

Die Abbildung zeigt die Kontrolle der RNA Präparation mittels Elektrophorese im 1%igen Agarose Gel. Hierbei zeigten sich die zwei scharf begrenzte Banden der 28S

und 18S RNS. Im Originalbild waren die 5S Banden ebenfalls sichtbar. Gezeigt wurde ein Protokoll der RNS Aufreinigung mit Hilfe der oben genannten RNAeasy Methode. Zu erkennen ist, dass das Verhältnis zwischen 28S und 18S RNS etwa 2:1 ergibt. Dieses Verhältnis und die scharfe Bandenabgrenzung ist ein gutes Indiz für die Integrität der RNS.

Die Reinheit der RNS bezüglich nach der Präparation verbliebener DNS Anteile wurde durch eine PCR, mit der RNA-Präparation als Probe, überprüft. Es konnte kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden.

2.2.4 Reverse Transkription

10 μ l (100 ng/ μ l) RNA Probe wurden mit 1 μ l Random-Primer (Invitrogen), 50 ng/ μ l) und 4 μ l DEPC Wasser versetzt, und für 5min bei 70 Grad inkubiert. Nach 10-minütigem Abkühlen auf 10 °C erfolgte die Zugabe von 5 μ l Reaktionspuffer 5x, 5 μ l dNTP (Invitrogen, je1,25 μ l 10mM (dATP, dCGP, dGTP, dTTP) und 1 μ l M-MLV Reverse-Transkriptase, RNase H Minus (Promega, 200 Einheiten/ μ l). Die Reverse Transkription wurde dann durch Erhitzen auf 42°C gestartet und für 60 min beibehalten, um den vollständigen Ablauf der cDNS-Synthese zu gewährleisten. Die thermische Inaktivierung erfolgte anschließend bei 70°C für 10min. Die Reaktionsprodukte konnten direkt in die PCR eingesetzt werden.

2.2.5 Erstellung der Primer

Bei der Erstellung der Primer für die PCR wurden auf folgende Kriterien geachtet: Die Schmelztemperatur der Primer sollten alle zwischen 50 und 60 °C, die Dimerbildung gering, die Länge ca. 20 \pm 2 Basen sein.

Dabei sollte das PCR-Produkt ca. 200 Basenpaare lang sein und nur ausschließlich im codierenden Bereich der DNS des gewünschten Proteins liegen. Als Artenspezifität wurde ausschließlich Ratte und Maus festgelegt.

Die Gensequenz wurde in den Datenbanken des NCBI gefunden und die Primer-Sequenz mit dem frei zugänglichen Programm Primer3Output (<http://frodo.wi.mit.edu/>) erstellt. Danach wurde die Spezifität durch Suche nach zufälligen Übereinstimmungen mit anderen Genen mittels Megablast (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) überprüft.

2.2.5.1 Primerliste

Primer-Name	AC Nr.	Primer-Sequenz	CDS	PL	Ta	Zy
mo-TGF- β -1-se	aj009862	TGGAAATCAACGGGATCA G	868-2040	344	58	35
mo-TGF- β -1-as		CGGGTTGTGTTGGTTGTA GA				
mo-TGF- β -2-se	nm009367	TGGATCAGTTTATGCGCAA G	1218-2462	308	58	35
mo-TGF- β -2-as		GCGGACGATTCTGAAGTA GG				
mo-TGF- β -3-se	nm009368	TTCGACATGATCCAGGGAC T	611-1843	226	55	35
mo-TGF- β -3-as		GCTTGGCTATGTGCTCATC C				
mo-MMP-13-se	nm008607	GGCCACCTTCTTCTTGTTG A	11-1429	247	60	40-45
mo-MMP-13-as		GGTGGGATCATCAAGTTTG				
mo-Col-III-se	x52046	GAGGAAACAGAGGTGAAA GA	118-4512	269	55	40
mo-Col-III-as		TTTTCGAGAACCATCAGG				
mo-Col-IV-as	j04694	AGGCACACCTTTTTCTCCA G	132-5141	255	58	45
mo-Fibronectin-se	x82402	CATTCCTGGCCACCTTAAC T	1-821	297	61	25-35
mo-Fibronectin-as		TCGCTCAGCTCATACTCCA C				
mo-Laminin-a3-se	x84013	CCACCTCTGAACACCAAGG C	255-199	389		

mo-Laminin-a3-as		TGTTCTCTGGGGCTGATG GT				
mo-MMP2-se	nm0086 10	CCCTCAAGAAGATGCAGA AGTT	44-2032	340	58	42
mo-MMP2-as		CCATCAAACGGGTATCCAT C				
mo-MMP7-se	nm0108 10	CTAGGCGGAGATGCTCAC TT	50-844	212		
mo-MMP7-as		TTCTGAATGCCTGCAATGT C				
mo-MMP9-se	nm0135 99	AGACGACATAGACGGCAT CC	Komplett	298	61	45
mo-MMP9-as		ATTGTCTGCCGGACTCAAA G				
mo-MMP14-se	nm0086 08	CTCCGAGAAGTGCCCTAT G	173-1921	291	55	35
mo-MMP14-as		TCGGAGGGATCGTTAGAA TG				
mo-TIMP-1-se	nm0115 93	CGAATCAACGAGACCACCT T	Komplett	243		
mo-TIMP-1-as		AGTACGCCAGGGGAACCAA G				
mo-TIMP-2-se	nm0115 94	CTGGACGTTGGAGGAAAG AA	227-889	285	58	30- 35
mo-TIMP-2-as		TCTCTTGATGCAGGCGAAG				
mo-TIMP-3-se	Nm01159 5.2	CCACGTGCAGTACATTCAC AC		194	61	30
mo-TIMP-3-as		CCAGGTGGTAGCGGTAAT TG				
mo-Col-la2-se	nm0077 43	GAGTTAATGGTGCCCCTG GT	80-4201	195	61	30
mo-Col-la2-as		GTTCACCTCGGTTTCCATG T				

Tabelle 3: Primerliste

CDS: für das entsprechende Protein kodierender Bereich der DNS, PL: PCR-Produktlänge (Basen-Anzahl), Ta: Annealing-Temperatur des Primerpaares, AC-Nummer: Zugriffsnummer auf der Website: www.ncbi.nlm.nih.gov, Zy: In der PCR genutzte Zyklenzahl. Die Primersequenzen wurden von Sigma-Ark (Darmstadt, D) bezogen; Col: Kollagen. Die Lyophilisate wurden in DEPC-Wasser aufgelöst und auf 100 pmol/µl eingestellt.

2.2.6 Mengen und Konzentrationen für 1 PCR Ansatz.

10 μ l	PCR Master Mix (PROMEGA)
8 μ l	Nuklease freies Wasser (PROMEGA)
1 μ l	Produkt der Reversen-Transkriptase-Reaktion
1 μ l	Primer (je 0,5 μ l von se.- und as.- Primer)

Tabelle 4: Komponenten und entsprechende Mengen eines PCR-Ansatzes.

2.2.7 Vorabtests und Optimierung der PCR

Die optimale Annealing-Temperatur jedes Primer-Paares wurde mittels eines Gradienten-Cyclers (Eppendorf Mastercycler Gradient) ermittelt. Danach wurde die optimale Zyklenzahl wie folgt ermittelt: Die PCR Reaktion wurde mit steigender Zyklenzahl bei der optimalen Annealingtemperatur durchgeführt und die Menge des Produktes mittels Gelelektrophorese und digitaler Auswertung ermittelt. Es wurde nun für jedes Primerpaar die entsprechende Zyklenzahl ausgewählt, die sich bezüglich der Produktmenge mitten im linearen Bereich befand.

2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

1 g Agarose wurde mit 100 ml 1x TBE-Puffer versetzt, danach in der Mikrowelle bei 1000 W aufgeköcht. Anschließend erfolgte das Gießen des Gels nach Zugabe von 1 μ l Ethidiumbromid.

Probenvorbereitung: 20 μ l PCR Produkt wurden mit 20 μ l Loadingbuffer versetzt und gemischt. Zwecks Zuordnung der Fragmentlänge der Proben wurde in der Mitte der Probenreihe eine DNA-Leiter (100bp DNA Ladder Promega) aufgetragen. Zum Starten des Elektrophoresevorgangs in einer ReadySubCell GT-Kammer (BioRad) wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgt die Auswertung mit Hilfe eines digitalphotographischen Dokumentationssystems.

2.2.9 Beispiele für Primer-Einstellung

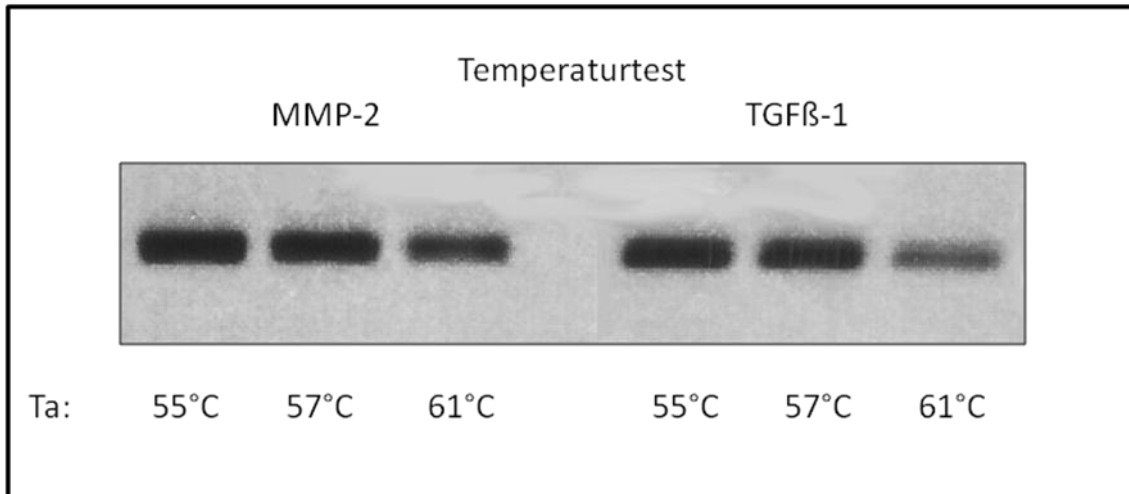


Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese. Ta: Annealing-Temperatur

Die Abb. zeigt einen beispielhaften Temperaturtest mit einem Gradienten von 55 bis 61 °C. Der zu testende Temperaturbereich orientierte sich um die errechnete Annealingtemperatur. In typischer Weise zeigt sich eine abnehmende PCR-Produktmenge bei ansteigender Annealing-Temperatur.

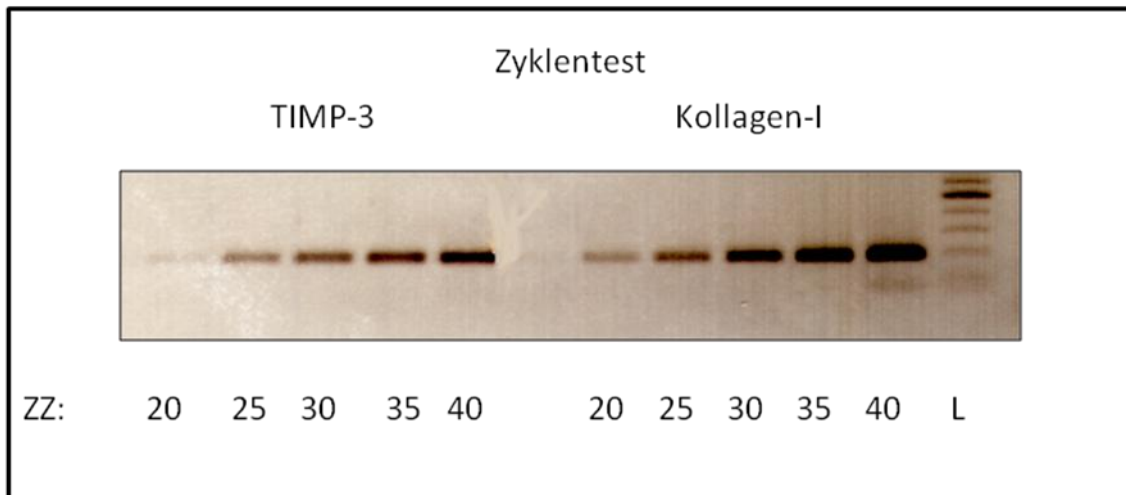


Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese. ZZ: Zyklenzahl, L: Größenstandard

Die Abb. zeigt einen Zyklentest in 6 Stufen zwischen 20 und 45 Zyklen in 5er Schritten. Hierbei wurden die zuvor im Temperaturtest ermittelten Annealingtemperaturen verwendet. Typischerweise zeigt sich eine Zunahme der PCR-Produktmenge mit ansteigender Zyklenzahl.

2.3 Zymographie

Die Zymographie wurde als Methode zur Darstellung enzymatischer Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen, die eine Zuordnung des Enzyms hinsichtlich seines Molekulargewichtes und seiner Substratspezifität zulässt, benutzt. Dazu wurde der Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen als Probe genommen, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Probenvorbereitung:

Herstellung einer Verdünnungsreihe und mischen der Probe mit Probenpuffer (2x SDS Laufpuffer mit 50% Glycerin und Bromphenolblau).

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein 10%-Laufgel mit Proteinzusatz sowie ein 5%-Sammelgel gegossen.

Beim Herstellen des Laufgels wurde anfangs das doppelt destillierte Wasser (ddH₂O) auf 37°C erwärmt und 1mg Collagen (Promega) bzw. 1mg Gelatin (Sigma) darin aufgelöst. Die gegossenen Laufgele wurden mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgesaugt und das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden auf die in der Elektrophoresekammer vorbereiteten Protein-Gele aufgebracht. Als Größenstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker-Mix (SeeBluePlus II, Invitrogen) aufgetragen und anschließend die Elektrophorese durch Anlegen eines Stromes von 15mA gestartet.

Das Gel wird kurz mit dd H₂O abgespült und danach für ca. 1h in 100 ml Triton-X-100-Lösung (25g/1000ml ddH₂O) mit Wechsel nach 30 Minuten inkubiert.

Danach wird 1x mit Development-Puffer gespült und für 12 h im Rüttler bei 37°C inkubiert.

2.3.1 Färben:

Das Gel wurde für 10min mit ddH₂O gewaschen und danach für 45 min bei 37°C in einer frisch angesetzten Lösung aus 40ml Methanol, 0,5g Comassie Blue, 10ml Eisessig und 50ml ddH₂O inkubiert.

2.3.2 Entfärben

Eine Lösung aus 40ml Methanol, 10ml Eisessig, 50ml bidestilliertes Wasser wurde hergestellt, und das Gel darin inkubiert. Dabei wurde die Lösung anfangs öfters gewechselt. Der Waschvorgang wurde so lange durchgeführt, bis die durch die enzymatische Reaktion verursachten Matrixläsionen als Banden deutlich sichtbar wurden.

2.4 Datenanalyse

2.5 PCR

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines digitaloptischen Aufzeichnungsgerätes im TIF-Format aufgenommen und gespeichert. Anschließend wurden die Bilder in die Auswertungssoftware AIDA (<http://www.raytest.com>) importiert. Mit dem Programm konnte anhand des importierten Bildes eine Densitometrie-Kurve jeder zu vermessenden Bande erstellt werden. Der nun von der Software gelieferte Rohwert stellt das Integral der Densitometrie-Kurve einer Bande abzüglich des Hintergrundrauschens dar. Diese Werte sind innerhalb eines ausgewerteten Agarosegels der Menge an PCR-Produkt proportional und entsprechen somit relativ der jeweiligen Expressionsstärke. Nach Import aller Rohdaten in Excel erfolgte eine innere Normierung auf die mittlere Expressionsstärke aller Rohwerte eines vermessenen Gens inklusive der zugehörigen GAPDH Doppelbestimmungen. Diese innere Normierung erfolgte innerhalb der o.g. Versuchsanordnungen entsprechend V1, V2 und V3 getrennt.

PKB/AKT, 3) Leervektor gegen die Kontrolle mit nativen Kardiofibroblasten getestet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. Zur weiteren Absicherung der Testergebnisse wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Seine Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse der t-Tests.

2.7 Zymographie

Die Zymographie-Gele wurden mit Hilfe eines digitaloptischen Aufzeichnungssystems fotografiert und im TIF-Format gespeichert. Mit o.g. Software wurde die densitometrischen Rohdaten unter Subtraktion des Hintergrundrauschens erstellt, anschließend wie oben beschrieben intern normiert und zur Leervektorkontrolle ins Verhältnis gesetzt.

3 Ergebnisse

Für die Analyse der PKB induzierten Genexpression war es wichtig, Artefakte durch die Transfektion auszuschließen. Dazu wurde die Genexpression (mittels PCR gemessen) zwischen untransfizierten Zellen und nach Transfektion mit einem Kontroll-Vektor enthaltenden Adenovirus verglichen.

3.1.1 Einfluss des Leervektors auf die Expression der untersuchten EZM-Proteine

Gen	Relative Genexpression (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
MMP 2	0,89±0,21	0,55	1,07±0,19	0,62	0,94±0,26	0,74	LV
	0,82±0,18		1,15±0,33		0,90±0,19		KFB
MMP 9	0,94±0,30	0,49	1,09±0,14	0,06	0,93±0,16	0,51	LV
	0,82±0,18		0,90±0,08		0,84±0,26		KFB
MMP 13	0,70±0,13	0,95	0,69±0,19	0,07	0,81±0,15	0,68	LV
	0,69±0,25		0,95±0,24		0,86±0,27		KFB
MMP 14	0,96±0,12	0,93	1,00±0,12	0,54	1,03±0,07	0,57	LV
	0,95±0,08		1,04±0,12		1,07±0,14		KFB
Col I	1,05±0,07	0,64	0,97±0,06	0,12	0,96±0,10	0,12	LV
	1,03±0,08		1,06±0,10		1,04±0,05		KFB

Col III	1,05+0,21	0,87	1,07+0,18	0,64	1,05+0,11	0,61	LV
	1,07+0,14		1,12+0,13		1,02+0,10		KFB
Col IV	k.D.		k.D.		k.D.		LV
							KFB
TGFB 1	0,95+0,12	0,51	0,99+0,13	0,97	0,96+0,08	0,49	LV
	0,90+0,13		0,99+0,15		1,01+0,13		KFB
TGFB 2	0,89+0,10	0,18	0,95+0,14	0,23	0,92+0,06	0,04	LV
	0,98+0,06		1,04+0,06		1,01+0,06		-9%
TGFB 3	0,91+0,10	0,06	1,07+0,19	0,83	1,03+0,14	0,32	LV
	1,02+0,07		1,09+1,02		1,11+0,15		KFB
TIMP 2	0,94+0,08	0,13	1,05+0,18	0,69	0,94+0,11	0,37	LV
	1,09+0,17		1,08+0,06		1,04+0,21		KFB
TIMP III	0,99+0,12	0,83	1,03+0,1	0,91	0,96+0,10	0,04	LV
	1,01+0,11		1,04+0,03		1,13+0,11		-15%
Fibro	0,97+0,15	0,92	1,01+0,14	0,18	1,05+0,13	0,70	LV
	0,98+0,09		1,13+0,14		1,07+0,07		KFB

Tabelle 5: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR. Einfluss des Leervektors auf die Transkription.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, LV: Leer-Vektor, KBF: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich

beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ : Veränderung in der relativen Genexpression in %, dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100% (nur bei $p \leq 0,05$ angegeben).

Die Ergebnisse unter Tabelle 5 zeigen, dass die Transfektion des Kontrollvirus bei den meisten Fällen keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Gene hat. Lediglich bei TGF β 2 und TIMP-III konnte eine signifikante Änderung der Genexpression begrenzten Ausmaßes festgestellt werden. Auch scheint es im Falle der MMP-9 bei den konfluenten ruhenden Zellen (V2) einen nicht signifikanten Trend (Induktion der Expression nach Infektion) zu geben.

Zur Analyse der differentiellen Genexpression ausgewählter fibroserelevanter Gene in Abhängigkeit der PKB/AKT, wurden kardiale Fibroblasten der Maus mit konstitutiv aktiven und inaktiven Varianten der PKB adenoviral transfiziert. Die Überexpression der PKB/AKT Mutanten wurde durch Verwendung einer im Vektorkonstrukt enthaltenen IRES-Sequenz (Internal Ribosome Entry Site) und mittels Fluoreszenz des verwendeten Reportergens EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sichergestellt. Die Überexpression der PKB/AKT Mutanten wurde von mir mittels Western-Blotting gegen das Hämagglutinin-Tag überprüft.

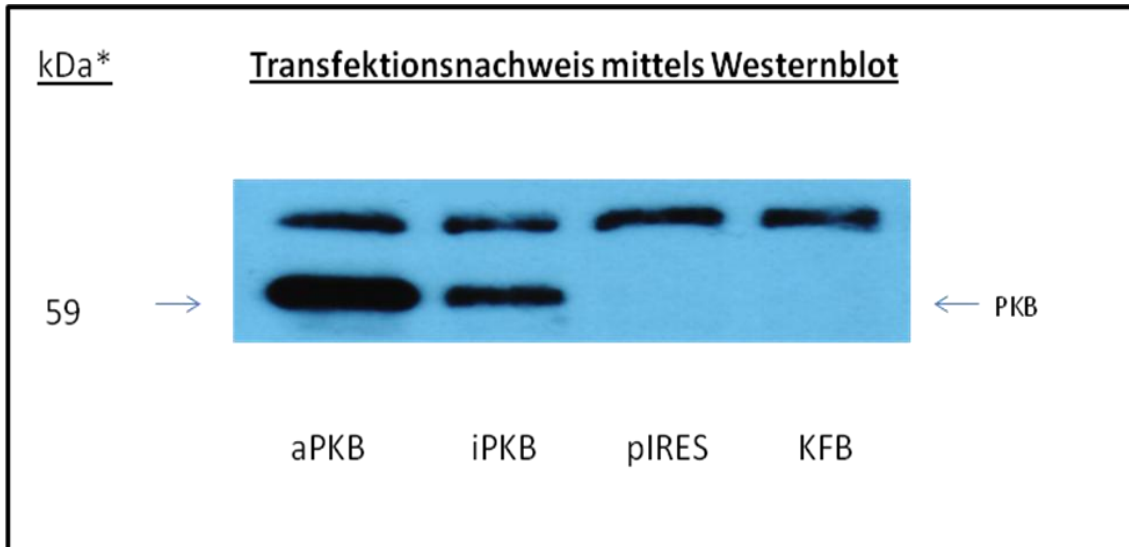


Abbildung 12: Western-Blot zum Nachweis des Transfektionserfolgs mit primärem Antikörper gegen das Hämagglutinin-Tag.

aPKB: aktive AKT/PKB Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, kDa: Molekulargewicht. Die Abbildung zeigt die bei ca. 59 kDa liegenden Banden der PKB, die durch den Antikörper gegen das HA-Tag detektiert wurden. Der Transfektionserfolg bei der aktiven PKB-Mutante (aPKB) war etwas besser als der bei der inaktiven PKB-Mutante.

Im Anschluss wurde die Expression relevanter Gene mittels RT-PCR überprüft. Unter 4.1.2 und 4.1.3 sind die Ergebnisse der Wirkung einer Überexpression einer aktiven bzw. inaktiven PKB auf die Expression der signifikant veränderten MMP-2, -9 und -13 zusammenfassend in Tabellenform dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse werden dann im Folgenden beschrieben.

3.1.2 Auswirkung einer aktiven PKB auf die Genexpression der MMP-2/-9/-13

MMP	Relative Genexpression (MW±SD)						2
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
2	1,32±0,26	0,001	0,79±0,11	0,03	0,76±0,35	0,36	aPKB

	0,82±0,18	+60%	1,15±0,33	-31%	0,90±0,19		KFB
9	0,96±0,52	0,63	0,75±0,18	0,19	0,73±0,12	0,43	aPKB
	0,82±0,18		0,90±0,08		0,84±0,26		KFB
13	1,02±0,47	0,21	0,52±0,28	0,02	0,88±0,40	0,91	aPKB
	0,69±0,25		0,95±0,24	-45%	0,86±0,27		KFB

Tabelle 6: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR. Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Genexpression.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, aPKB: konstitutiv aktive AKT/PKB-Mutante, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ: Veränderung in der relativen Genexpression in %, dabei gilt KFB ≙ 100% (nur bei p≤0,05 angegeben), (alle anderen, nicht aufgeführten Gene zeigen keine entsprechend hohe und signifikante AKT/PKB-abhängige Regulation ihrer Expression auf mRNA-Ebene)

3.1.3 Expression der MMP-2/-9/-13 nach transientscher Transfektion mit konstitutiv inaktiver PKB

MMP	Relative Genexpression (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
2	1,10±0,25	0,04	1,01±0,11	0,36	1,40±0,50	0,04	iPKB
	0,82±0,18	+33%	1,15±0,33		0,90±0,19	+56%	KFB
9	1,38±0,31	0,03	1,27±0,11	0,00	1,55±0,47	0,02	iPKB
	0,82±0,18	+70%	0,90±0,08	+42%	0,84±0,26	+86%	KFB
13	2,00±0,65	0,01	1,76±0,30	0,00	1,40±0,14	0,00	iPKB
	0,69±0,25	189%	0,95±0,24	+85%	0,86±0,27	+63%	KFB

Tabelle 7: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR. Einfluss der konstitutiv inaktiven AKT/PKB-Mutante auf die Genexpression.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, iPKB: konstitutiv inaktive AKT/PKB-Mutante, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ : Veränderung in der relativen Genexpression in %, dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100% (nur bei $p \leq 0,05$ angegeben), (alle anderen, nicht aufgeführten Gene zeigen keine entsprechend hohe und signifikante AKT/PKB-abhängige Regulation ihrer Expression auf mRNA-Ebene)

3.1.4 Ergebnisse der untersuchten Gene, bei denen sich keine entsprechend hohen und signifikanten Abhängigkeiten der Genexpression bezüglich der PKB/Akt-Funktion darstellte

3.1.4.1 Auswirkung einer aktiven PKB auf die Genexpression der verschiedenen EZM-Proteine

Gen	Relative Genexpression (MW \pm SD)						
	V1	P/ Δ	V2	P/ Δ	V3	p/ Δ	
MMP 14	1,04+0,17	0,35	1,00+0,09	0,48	0,89+0,18	0,13	aPKB
	0,95+0,08		1,04+0,12		1,07+0,14		KFB
Col I	1,04+0,20	0,90	0,92+0,10	0,04 -13%	0,91+0,12	0,052	aPKB
	1,03+0,08		1,06+0,10		1,04+0,05		KFB
Col III	0,65+0,52	0,11	0,76+0,36	0,06	0,88+0,09	0,03 -13%	aPKB
	1,07+0,14		1,12+0,13		1,02+0,10		KFB
Col IV	k.D.		k.D.		k.D.		aPKB
							KFB

TGFB β 1	0,90+0,49	0,99	0,97+0,19	0,84	1,04+0,11	0,63	aPKB
	0,90+0,13		0,99+0,15		1,01+0,13		KFB
TGFB β 2	0,68+0,53	0,22	1,10+0,08	0,21	0,98+0,04	0,48	aPKB
	0,98+0,06		1,04+0,06		1,01+0,06		KFB
TGFB β 3	0,96+0,49	0,75	0,99+0,10	0,13	0,90+0,01	0,02	aPKB
	1,02+0,07		1,09+1,02		1,11+0,15		-19%
TIMP 2	0,89+0,45	0,33	1,02+0,10	0,25	0,95+0,07	0,55	aPKB
	1,09+0,17		1,08+0,06		1,04+0,21		KFB
TIMP III	1,12+0,23	0,32	1,04+0,07	0,91	0,91+0,13	0,02	aPKB
	1,01+0,11		1,04+0,03		1,13+0,11		-20%
Fibro	1,10+0,10	0,06	0,94+0,22	0,12	0,94+0,03	0,01	aPKB
	0,98+0,09		1,13+0,14		1,07+0,07		-12%

Tabelle 8: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR. Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Genexpression. Gezeigt werden hier die Ergebnisse ohne Signifikanz bzw. die ergebnisse mit Signifikanz, die jedoch im entsprechenden Vergleich der Mittelwerte eine Veränderung der relativen Genexpression von unter 30% aufwiesen.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, iPKB: konstitutiv inaktive AKT/PKB-Mutante, KBF: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ : Veränderung in der relativen Genexpression in %, dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100% (nur bei $p \leq 0,05$ angegeben)

3.1.4.2 Expression extrazellulärer Matrixproteine nach transienter Transfektion mit konstitutiv inaktiver PKB

Gen	Relative Genexpression (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
MMP 14	1,05+0,10	0,12	0,91+0,11	0,07	1,02+0,04	0,47	iPKB
	0,95+0,08		1,04+0,12		1,07+0,14		KFB
Col I	0,82+0,22	0,06	0,90+0,11	0,03	0,99+0,12	0,34	iPKB
	1,03+0,08		1,06+0,10	-14%	1,04+0,05		KFB
Col III	0,92+0,19	0,24	0,89+0,14	0,02	1,01+0,08	0,97	iPKB
	1,07+0,14		1,12+0,13	-20%	1,02+0,10		KFB
Col IV	k.D.		k.D.		k.D.		iPKB
							KFB
TGFB 1	0,91+0,45	0,94	1,01+0,12	0,83	0,97+0,18	0,64	iPKB
	0,90+0,13		0,99+0,15		1,01+0,13		KFB
TGFB 2	0,85+0,48	0,57	0,91+0,04	0,01	1,07+0,09	0,25	iPKB
	0,98+0,06		1,04+0,06	-13%	1,01+0,06		KFB
TGFB 3	0,94+0,15	0,28	0,92+0,12	0,04	0,94+0,12	0,05	iPKB
	1,02+0,07		1,09+1,02	-16%	1,11+0,15	-16%	KFB
TIMP	0,94+0,15	0,18	0,80+0,09	0,001	1,01+0,13	0,80	iPKB

2	1,09+0,17		1,08+0,06	-26%	1,04+0,21		KFB
TIMP III	0,86+0,10	0,04	0,86+0,04	0,001	0,96+0,08	0,03	iPKB
	1,01+0,11	-15%	1,04+0,03	-17%	1,13+0,11	-15%	KFB
Fibro	0,98+0,12	0,97	0,91+0,09	0,01	0,86+0,08	0,003	iPKB
	0,98+0,09		1,13+0,14	-20%	1,07+0,07	-17%	KFB

Tabelle 9: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR. Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Genexpression. Gezeigt werden hier die Ergebnisse ohne Signifikanz bzw. die Ergebnisse mit Signifikanz, die jedoch im entsprechenden Vergleich der Mittelwerte eine Veränderung der relativen Genexpression von unter 30% aufwiesen.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, iPKB: konstitutiv inaktive AKT/PKB-Mutante, KBF: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ : Veränderung in der relativen Genexpression in %, dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100% (nur bei $p \leq 0,05$ angegeben)

3.2 Ergebnisse der Analyse der differentielle Genexpression

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels PCR lassen sich wie folgt zusammenfassend beschreiben.

- ❖ Die Transfektionsmethode als auch der leere Vektor haben keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die weiter unten aufgezeigten Veränderung in der differentiellen Genexpression der untersuchten Gene auf die Überexpression der AKT Mutanten zurückzuführen ist.

Eine differentielle, vom Aktivitätsstatus der PKB/AKT abhängige Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene zeigte sich vor allem bei den Matrix-Metalloproteinasen -2; -9 und -13. Alle anderen

untersuchten Gene zeigten keine entsprechend hohe und signifikante Veränderung der transkribierten m-RNS-Menge.

➤ Die MMP-13 betreffend:

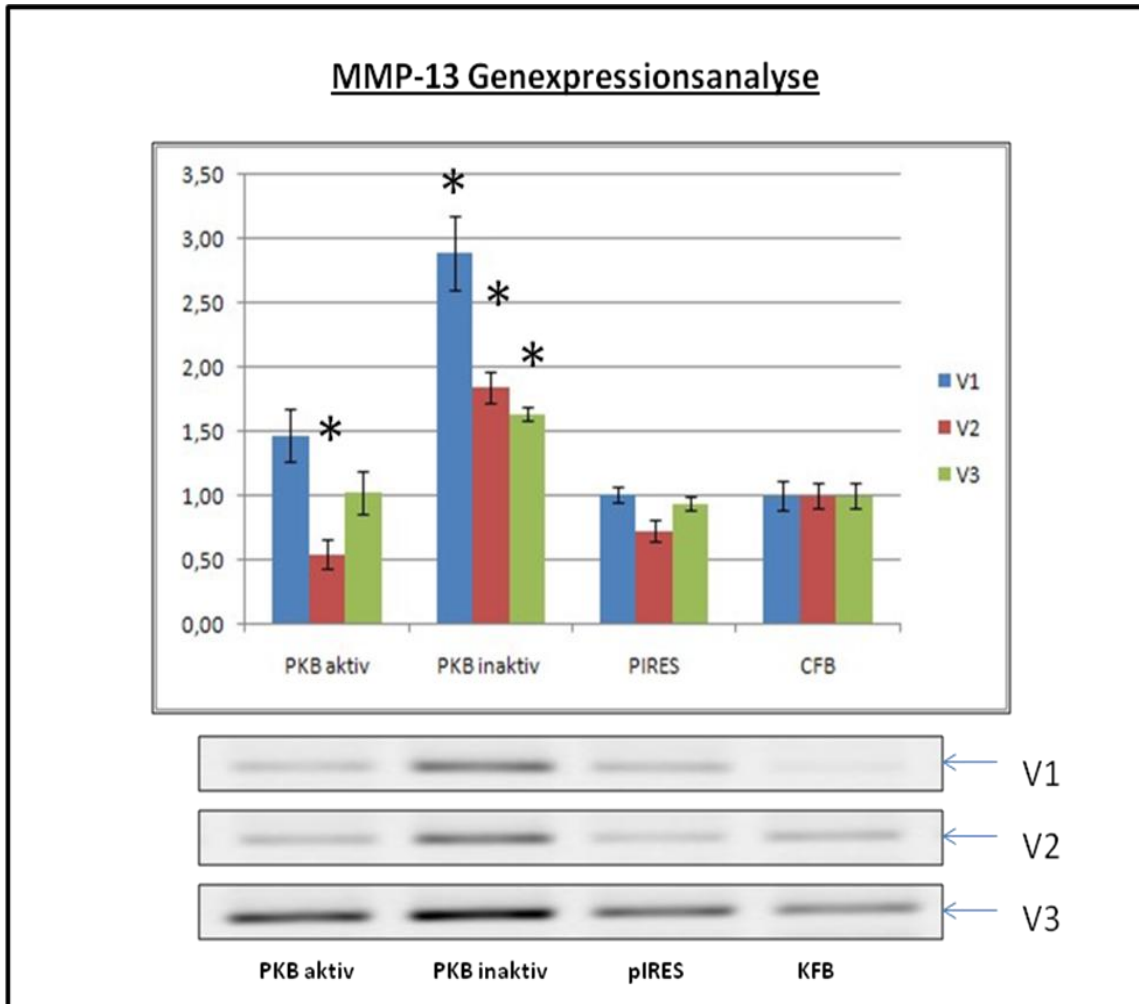


Abbildung 13: Balkendiagramm und Agarosegelelektrophorese. Ergebnisse der MMP-13 Genexpressionsanalyse.

PKB aktiv: aktive AKT/PKB-Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB-Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum. Die signifikanten Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet.

- zeigte sich ein hochsignifikanter ($p < 0,01$) Anstieg der transkribierten m-RNS-Menge bei Überexpression der konstitutiv negativen Mutante der PKB/AKT. Im Vergleich mit nativen Kardiofibroblasten war der Anstieg um ca. 189% bei

proliferierenden Kardiofibroblasten (V1) am größten und bei Serum-Restimulation konfluenter Kardiofibroblasten (V3) mit 63% am kleinsten. Bei ruhenden Kardiofibroblasten unter Serumdeprivation (V2) betrug der Anstieg rund 85% und lag somit knapp über dem Anstieg von V3.

- Des Weiteren zeigen die gewonnenen Expressionsdaten eine Reduktion der Expression im Setting V2, bei Zellen mit überexprimierter konstitutiv aktiver PKB/AKT Mutante. Der Abfall beträgt etwa 45% bei einem Signifikanzniveau von unter 0,05.

-

➤ Die MMP-9 betreffend:

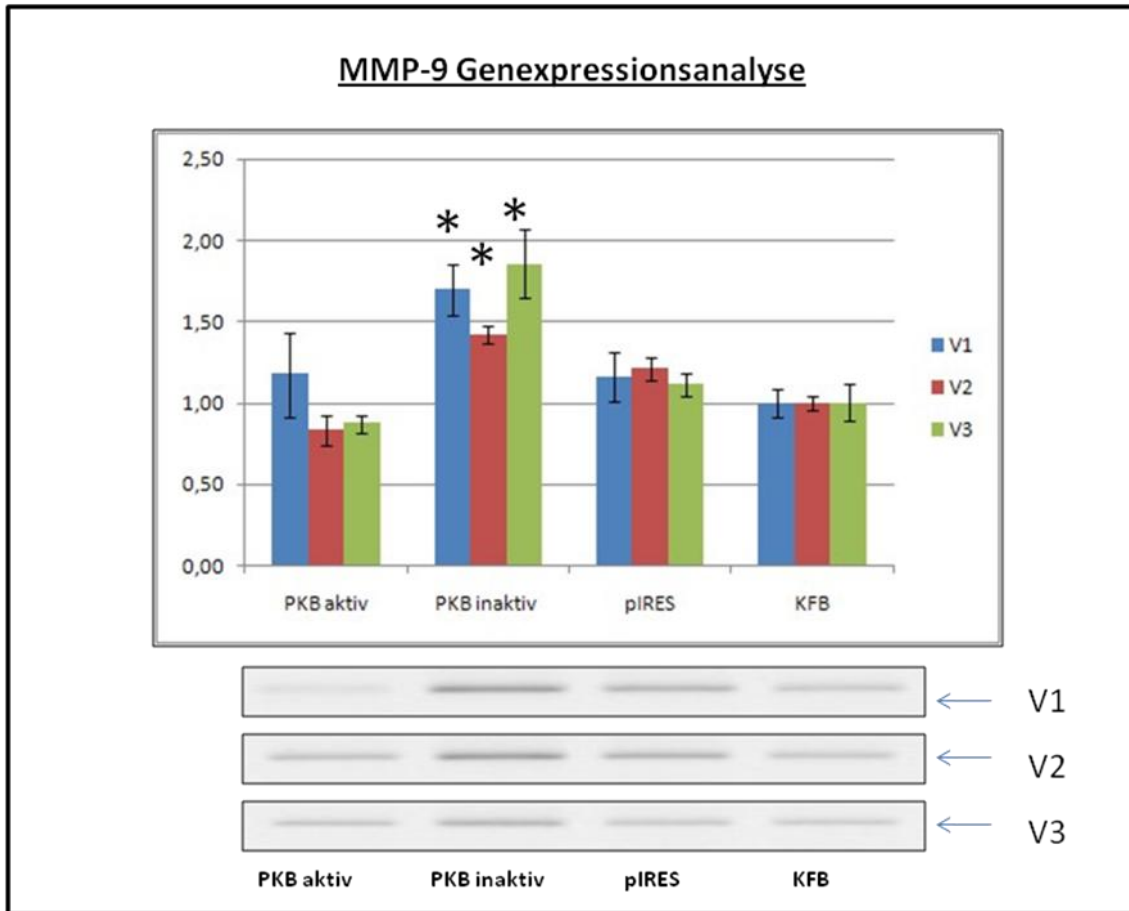


Abbildung 14: Balkendiagramm und Agarosegelelektrophorese. Ergebnisse der MMP-9 Genexpressionsanalyse.

PKB aktiv: aktive AKT/PKB-Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB-Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum. Die signifikanten Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet.

- Ähnlich wie bei der MMP-13 kommt es bei Überexpression von konstitutiv inaktiver PKB/AKT in Kardiofibroblasten zu einer Steigerung der Genexpression auf m-RNS-Ebene. Der Zuwachs bei Kardiofibroblasten in V1 und V3 beträgt ca. 70% bzw. ca. 85% und liegt somit etwa in derselben Größenordnung. Bei KFB in Ruhe (V2) besteht immer noch eine

Steigerung von ca. 40 %. Auf der anderen Seite hat die Überexpression der aktive PKB keinen signifikanten Effekt.

Die MMP-2 betreffend:

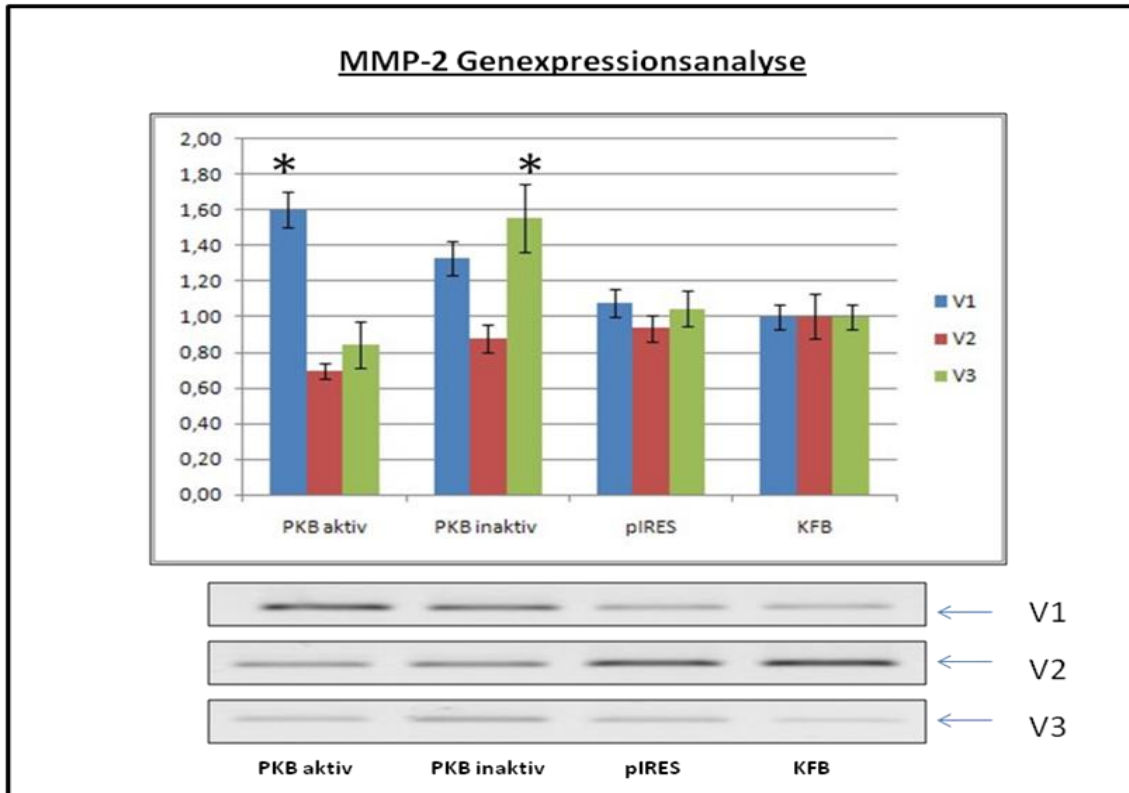


Abbildung 15: Balkendiagramm und Agarosegelelektrophorese. Ergebnisse der MMP-2 Genexpressionsanalyse.

PKB aktiv: aktive AKT/PKB-Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB-Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum. Die signifikanten Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet.

- Hier stellt sich das Ergebnis etwas komplexer dar. Bei proliferierenden, nicht konfluenten Kardiofibroblasten (V1) kommt es durch Überexpression sowohl einer konstitutiv aktiven als auch inaktiven PKB/AKT Mutante zur deutlichen Steigerung der transkribierten m-RNS Menge. Bei der akti-

ven AKT/PKB-Mutante ist dabei die signifikante Steigerung um ca. 60% etwa doppelt so hoch wie bei der inaktiven PKB/AKT-Form. Abweichend hiervon kommt es in Übereinstimmung mit den Versuchen mit der MMP-9 bzw. -13 bei Serum-Restimulation konfluenter Kardiofibroblasten (V3) zu einer Steigerung der Genexpression nur bei Überexpression der konstitutiv inaktiven PKB/AKT von ca. 60%. Im Gegensatz zu Setting V1 bewirkt die überexprimierte aktive Akt/PKB Mutante in V2 einen signifikanten Abfall der transkribierten m-RNS-Menge von ca. 30%.

- Alle anderen o.g. untersuchten Gene zeigen keine Veränderungen der Genexpression auf m-RNS-Ebene.

3.3 Ergebnisse der zymographischen Untersuchungen

Bei den vorhergehenden Untersuchungen waren Akt-abhängig vor allem Effekte auf die MMPs zu finden; daher sollten diese Effekte mit den MMPs auf Proteinebene verifiziert werden. Leider waren mit verschiedenen getesteten Antikörpern im Westernblot keine spezifischen Banden zu detektieren (viele unspezifische Banden), so wurden die Versuche auf Aktivitätsebene mittels Zymografie weitergeführt. Dabei wird die Art und Menge der von den Kardiofibroblasten synthetisierten MMPs im Extrazellularraum dargestellt. Dazu wurden die Proteine in den Zellkulturüberständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend renaturiert und deren enzymatische Aktivität in einem Kollagen-(Type-I)-haltigem-Gel und einem Gelatin-haltigen Gel visualisiert.

Die Identifikation der zu den Aktivitätsbanden zugehörigen MMPs fiel aufgrund der nicht eindeutigen Zuordnungsfähigkeit zunächst schwer.

Hierfür können der „Smile-Effekt“ oder auch eine unzureichende SDS-Beladung der Proteine verantwortlich sein. Zur Darstellung auf den Gelatin- bzw. Kollagen-I-Gelen kamen Aktivitätsbanden bei 90-100 kDa und 70-75 kDa, die der MMP-9 bzw. MMP-2 entsprechen. Typischerweise stellen sich bei der Zymographie neben den aktiven Enzymen auch die latenten Formen dar, da auch diese während des Renaturierungsvorganges aktiviert werden (Leber and Balkwill 1997).

In Übereinstimmung mit den Expressionsdaten (Tabelle 5) zeigt sich auch hier, dass keine der untersuchten MMPs bezüglich der Aktivität im Zellkulturüberstand durch die Transfektion per se signifikant beeinflusst wird (Tabelle 8).

3.3.1 Einfluss des Vektorkonstrukt auf die Aktivität der MMP-2/-9

MMP	Relative MMP-Aktivität (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
2	1,18±0,25	0,49	11,55±0,17	0,46	1,12±0,26	0,69	LV
	102±0,33		1,02±0,68		1,04±0,25		KFB
9	0,70±0,37	0,68	0,85±0,41	0,96	0,92±0,17	0,98	LV
	0,60±0,30		0,88±0,54		0,91±20		KFB

Tabelle 10: Ergebnisse der Zymographie-Analyse / Einfluss des Leervektors auf die Proteinbiosynthese.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, LV: Leer-Vektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ: Veränderung in der relativen Genexpression in % (Wert nur bei Signifikanz angegeben), dabei gilt KFB ≙ 100%. Alle anderen, nicht aufgeführten Gene zeigten keine signifikante AKT/PKB-abhängige Regulation ihrer Expression auf Proteinebene.

3.3.2 Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Aktivität der MMP-2/-9

MMP	Relative MMP-Aktivität (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
2	0,95±0,25	0,74	0,53±0,39	0,49	0,89±0,42	0,55	aPKB
	102±0,33		1,02±0,68		1,04±0,25		KFB
9	0,71±0,36	0,69	0,53±0,31	0,53	1,15±0,26	0,20	aPKB
	0,60±0,30		0,88±0,54		0,91±20		KFB

Tabelle 11: Ergebnisse der Zymographie-Analyse / Einfluss der konstitutiv aktiven AKT/PKB-Mutante auf die Proteinbiosynthese.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, aPKB: konstitutiv aktive AKT/PKB-Mutante, KBF: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ: Veränderung in der relativen Genexpression in % (Wert nur bei Signifikanz angegeben), dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100%. Alle anderen, nicht aufgeführten Gene zeigten keine signifikante AKT/PKB-abhängige Regulation ihrer Expression auf Proteinebene.

Die Daten zur Überexpression der aktiven Akt-Kinase zeigen, dass diese auf keine der untersuchten MMPs einen signifikanten Einfluss hat. Andererseits zeigt sich bei MMP-9 und MMP-2 in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten ein Trend zu niedrigeren Werten nach Transfektion. Durch die große Streuung der Werte und durch die niedrige n-Zahl der Versuche sind die Unterschiede nicht signifikant.

3.3.3 Einfluss der konstitutiv inaktiven AKT/PKB-Mutante auf die Proteinsynthese der MMP-2/-9

MMP	Relative MMP-Aktivität (MW±SD)						
	V1	P/Δ	V2	P/Δ	V3	p/Δ	
2	1,01±0,25	0,93	0,90±0,61	0,87	0,95±0,34	0,67	iPKB
	1,02±0,33		1,02±0,68		1,04±0,25		KFB
9	2,41±0,97	0,03	2,01±0,40	0,15	1,09±0,25	0,32	iPKB
	0,60±0,30	305%	0,88±0,54		0,91±20		KFB

Tabelle 12 Ergebnisse der Zymographie-Analyse / Einfluss der konstitutiv inaktiven AKT/PKB-Mutante auf die Proteinbiosynthese.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, aPKB: konstitutiv inaktive AKT/PKB-Mutante, KBF: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum, p: aus dem Vergleich beider Mittelwerte im t-Test resultierender p-Wert, Δ: Veränderung in der relativen Genexpression in % (Wert nur bei Signifikanz angegeben), dabei gilt KFB $\hat{=}$ 100%. Alle anderen, nicht aufgeführten Gene zeigten keine signifikante AKT/PKB-abhängige Regulation ihrer Expression auf Proteinebene.

Schon prima-vista zeigten sich in den meisten Versuchen deutliche Aktivitätsunterschiede der MMP9 mit höherer enzymatischer Aktivität bei inaktiver PKB/AKT im Vergleich zu aktiver PKB/AKT. Dagegen findet man bei der MMP-2 keine Unterschiede bezüglich der Aktivität.

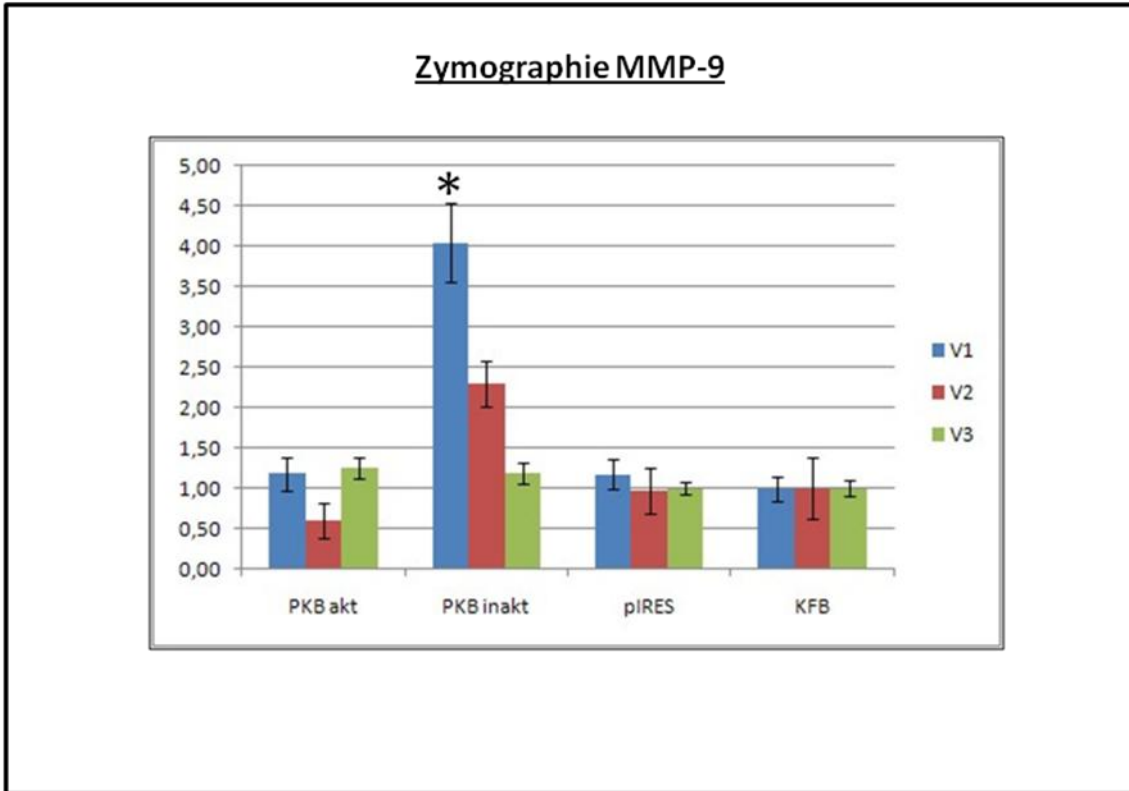


Abbildung 16: Balkendiagramm: Zymographie-Ergebnisse der MMP-9.

PKB aktiv: aktive AKT/PKB-Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB-Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum. Die signifikanten Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet.

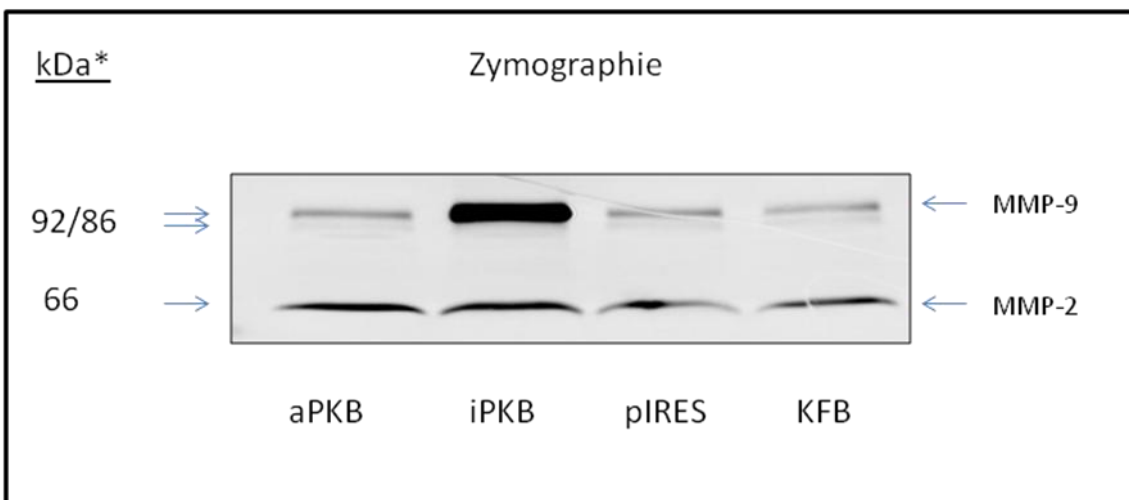


Abbildung 17: Gelatin-SDS-PAGE-Zymographie im Setting V1.

aPKB: aktive AKT/PKB Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, kDa*: Molekulargewicht idealisiert aus Akool et al. 2003.

Zusammengefasst zeigen die Daten (Abb. 16 / 17) bei Kardiofibroblasten mit transient überexprimierter konstitutiv inaktiver PKB/AKT einen deutlichen Anstieg der Aktivität von in den Extrazellularraum sekretierter MMP-9. Wegen des relativ hohen Molekulargewichts handelt es sich dabei wahrscheinlich größtenteils um die latente pro-MMP-9. Dieser Effekt ist bei proliferierenden nicht konfluenten KFB (V1) am deutlichsten, bei ruhenden KFB im Stadium der Konfluenz (V2) am niedrigsten, und nach Serum-Restimulation nicht mehr ausgeprägt. Der Vergleich zwischen KFB mit konstitutiv aktiver PKB/AKT, KFB mit Leervektor und nativen KFB zeigt keine Unterschiede auf dem Niveau einer relativ niedrigen Enzymsekretion (Abb. 15).

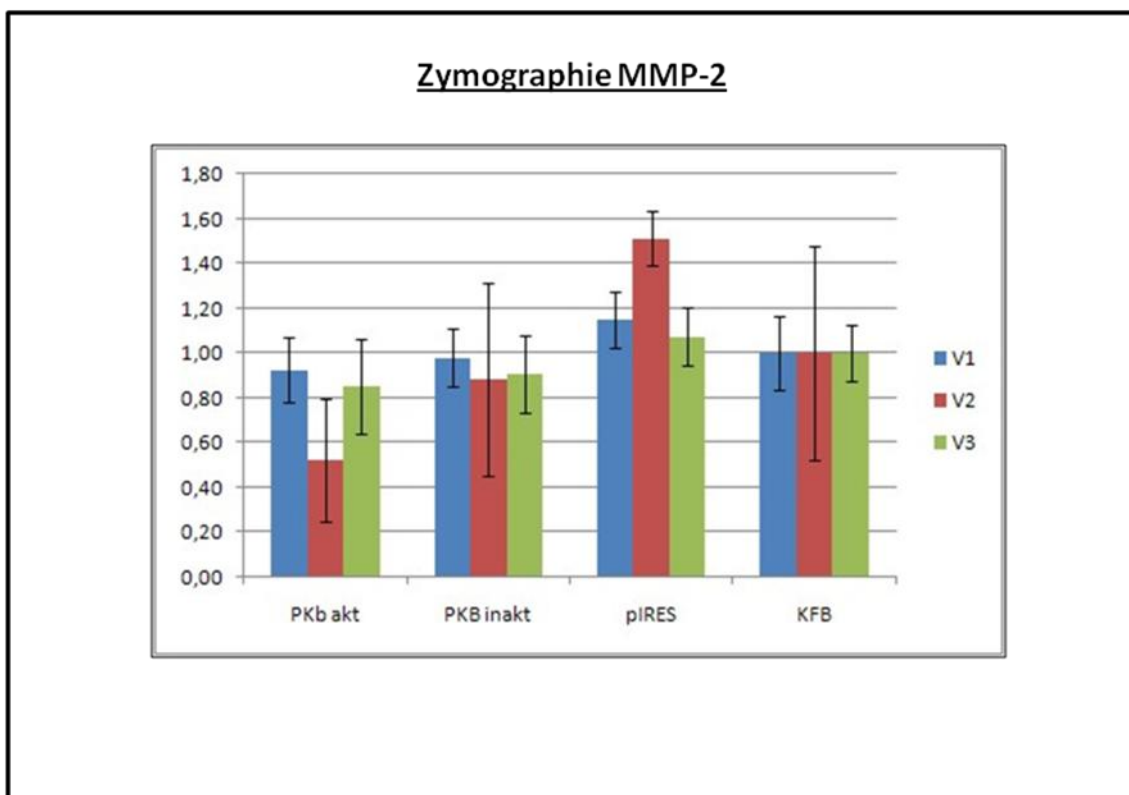


Abbildung 18: Balkendiagramm: Zymographie-Ergebnisse der MMP-2.

PKB aktiv: aktive AKT/PKB-Mutante, iPKB: inaktive AKT/PKB-Mutante, pIRES: Leervektor, KFB: native Kardiofibroblasten, V1: Zellen proliferierend ohne Kontakthemmung, Stimulation mit Hyclone-Kalbsserum, V2: Zellen in Ruhe unter Serumentzug, Kontaktinhibition, V3: Restimulation von Zellen in V2 mit Hyclone Kalbsserum. Die signifikanten Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet.

Bei der MMP2 zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede in der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der PKB/AKT-Aktivität. Beim rein visuellen Vergleich der durchschnittlichen Enzymaktivitäten in den Zellzuständen entsprechend V1/V2 und V3, zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit vom Zellzustand.

Bei proliferierenden, nicht konfluenten KFB (V1) besteht die höchste basal produzierte Enzymmenge, bei ruhenden Zellen unter Serumentzug (V2) die niedrigste. Dabei stellt sich die MMP-2 bei ruhenden Kardiofibroblasten (V2) nicht mehr im für die Gelatinase sensitiven Gelatin-Gel dar. Nach erfolgter Serum-Restimulation in Konfluenz ist sie dann wieder nachweisbar, jedoch schwächer als bei primär stimulierten Zellen (V1). Dies korreliert mit der allgemeinen Aktivität der Zellen in diesen drei Zellzuständen.

3.3.4 Ergebnisse bezüglich der MMP-13 in der Zymographie

Auch bei der MMP-13 kann keine Beziehung zwischen m-RNS Menge und entsprechendem Zymographie-Ergebnis gezeigt werden. Obwohl es zu einer Steigerung der relativen m-RNS Menge um 180 % kam, war die MMP-13 in der entsprechenden und allen anderen Proben zymographisch nicht nachweisbar, wohl aber in der MMP-13-Positiv-Kontrolle.

4 Diskussion

4.1.1 Beziehung zwischen messenger-RNS und Protein

Versucht man die Ergebnisse der PCR-Analyse und der Zymographie in Zusammenhang zu bringen, zeigt sich unter den untersuchten Genen lediglich bei der MMP-9 eine zumindest teilweise entsprechende Korrelation zwischen dem in der RT-PCR gemessenen relativen m-RNS-Menge und der in der Zymographie sich darstellenden Aktivität (Proteinmenge). Hierbei zeigt sich ein deutlicher Anstieg der MMP-9-m-RNS-Menge bei überexprimierter inaktiver PKB/AKT. Korrespondierend dazu stellt sich in der Zymographie ein massiver Zuwachs in der der MMP-9 entsprechenden Enzymaktivität bei proliferierenden KFB unter Serumstimulation dar. Auch bei konfluenten sich nicht teilenden KFB unter Serumentzug (V2) ist diese Konstellation noch deutlich erkennbar. Im Gegensatz dazu, existiert bei den Zellen in V3 (Restimulation bei Konfluenz) nur noch eine der MMP-9-entsprechende Enzymaktivität auf der Ebene der verwendeten Kontrolle, obwohl die dazugehörige m-RNS-Menge im Vergleich mit den zwei zuvor genannten die Höchste war.

Bezüglich der MMP-2 und MMP-13 besteht keine Korrelation zwischen gemessener m-RNS-Menge und Enzymaktivität in der Zymographie. Die MMP-2 Proteinmenge stellt sich in der Zymographie innerhalb der verschiedenen Zellzustände (V1; V2; V3) bezüglich der PKB-Aktivität als wenig oder nicht reguliertes Gen dar. In glatten Muskelzellen konnte dies ebenfalls beobachtet werden (Jin, Suh et al. 2008). Es zeigt sich jedoch eine Abhängigkeit vom Zellzustand mit größter Proteinmenge der MMP-2 bei primärer Stimulation (V1) und kleiner Menge bei Restimulation (V3) bis dahin, dass im Setting V2 (ohne Serumstimulation) in der Zymographie die MMP-2 nicht mehr nachweisbar ist.

Zur Korrelation zwischen der Menge an m-RNS- und tatsächlich synthetisiertem Protein existieren zurzeit nur wenige systematische Studien. Die meisten Arbeiten beziehen sich auf humane Krebszellen und auf Hefen. Größtenteils konnten hier nur geringe und/oder eingeschränkte Korrelationen aufgezeigt werden. Bei der Untersuchung von 19 Leber-Proteinen wurde eine positive Korrelation von rund 0,5 gefunden (Anderson and Seilhamer 1997). Insbesondere eine Analyse der MMP-2, MMP-9, und TIMP-1 in Zellen eines humanen Prostata-Karzinoms zeigte keine signifikante Beziehung (Lichtinghagen, Musholt et al. 2002). Andere Studien an humanen Krebszellen konnten dagegen signifikante und sogar hochsignifikante Beziehungen zwischen messenger-RNS- und Proteinmenge feststellen (Chen, Gharib et al. 2002; Orntoft, Thykjaer et al. 2002).

Ergebnisse eines mathematischen Modells der Beziehung zwischen m-RNS und synthetisiertem Protein erklären weiterhin, dass es nicht gerechtfertigt ist, wenn man von Veränderungen auf m-RNS-Ebene auf Veränderungen in Proteinebene schlussfolgert. Vielmehr sollten die Informationen über Veränderungen auf m-RNS-Ebene nur mit Vorsicht in Bezug auf Hypothesen der entsprechenden Genfunktion und des Genproduktes angewendet werden (Mehra, Lee et al. 2003).

Die Ergebnisse der angefertigten Genexpressionsanalyse müssen deshalb ebenfalls unter diesen Gesichtspunkten bewertet werden und spiegeln daher zunächst nur die Veränderungen des Verhältnisses zwischen RNS Synthese (Transkription) und RNS Abbau des untersuchten Gens wider.

4.2 Regulation der Genexpression der MMP-2/-9/ und 13

Abbildung 18 zeigt die für die MMP-2, -9 und -13 verantwortlichen Promotorbereiche auf der DNS. Es zeigt sich dass eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren die Expression dieser Gene beeinflussen. In der Literatur wird die Expression der MMPs als gewebe- und entwicklungsabhängig dargestellt. Diesbezüglich zeigen einige Zelltypen eine Signal-abhängige Induktion oder Repression der MMP Transkription. Unter den hierbei involvierten Signaltransduktionswegen sind die MAP-Kinase-Wege (Mitogen Activated Protein-Kinasen), die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der WNT-Signalweg sowie der JAK-STAT-Signalweg.

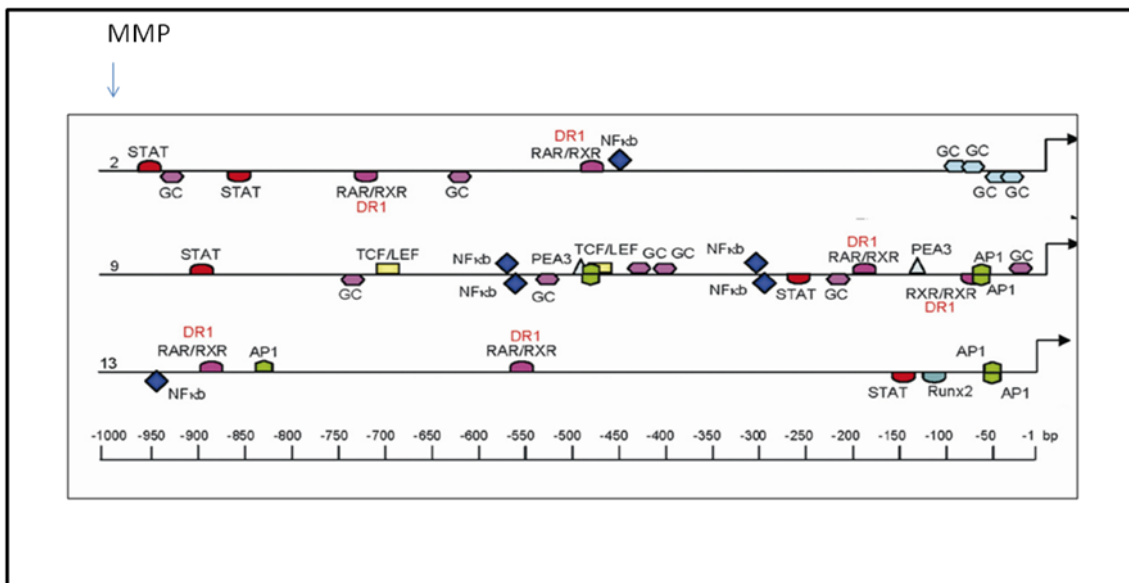


Abbildung 19: Promotorbereiche der MMP-2, MMP-9, MMP-13 aus Clark et al. 2008.

Activator protein 1 (AP-1), activator protein 2 (AP-2), erythroblastosis twenty-six (Ets), polyoma enhancer element A3 (PEA3), GC box, nuclear factor kappa B (NF- κ B), retinoic acid response element (RAR/RXR), retinoid X response element (RXRE/RXR), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), signal transducer and activator of transcription (STAT) and T-cell factor/lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef) (Clark, Swingler et al. 2008).

4.2.1 Die MAP-Kinase Signaltransduktionswege

Die Transkription der meisten MMPs wird nach Stimulation schnell - im Stunden-Bereich - erhöht. Damit gehören die MMPs zu den Immediate-Early Response Genes (IEs). Dies weist darauf hin, dass die signalvermittelnden Proteine zum Stimulationszeitpunkt nicht neu synthetisiert werden müssen (Sampieri, Nuttall et al. 2008). Dazu gehören auch die Transkriptionsfaktoren der Fos- und Jun- Familie. Die von ihnen gebildeten heterodimeren Proteine stellen den Transkriptionsfaktor AP-1 (Activator-Protein-1) dar. Er beinhaltet einen Leucine-Zipper, welcher an den TRE's (TPA (Phorbol-Diester) Response Elements) mit der Sequenz TGAC/GTCA) in der Promotorregion bindet. Die Bedeutung einer AP-1 bindenden Promotorregion wird auch dadurch unterstrichen, dass sich die von Yan und Boyd et al. erarbeitete Einteilung der MMP-Promotoren auf das Vorhandensein einer TATA-Box und einer AP-1 Site stützt (Yan and Boyd 2007).

Entsprechend dieser Einteilung gehört die MMP-9 und -13 zur ersten Gruppe, die eine TATA-Box und eine proximale AP-1-Site beinhalten. Der MMP-2-Promotor beinhaltet im Gegensatz dazu keine TATA-Box und keine AP-1 Bindungsstelle. Im Review von Clark et al. wird die AP-1-Site in den sie enthaltenen Promotoren als Hauptmediator der Transkriptionsregulation angesehen (Clark, Swingler et al. 2008). Zur Bildung von AP-1 ist sowohl aktiviertes c-Fos als auch aktiviertes c-Jun notwendig. Die Aktivierung von c-Fos und c-Jun erfolgt posttranskriptional über Phosphorylierung durch einige Endglieder der MAP-Kinasen-Wege. Dementsprechend wird c-Jun von der JNK (Jun-N-terminalem-Kinase) phosphoryliert. Dies entspricht dem durch Stress, Cytokine, aber auch durch Antigenbindung an B- und T-Zellen aktiviertem MAP-Kinasen-Weg. Dabei folgt die Aktivierung dieses We-

ges dem typischen Aktivierungsschema der MAP-Kinase-Wege: MAPKKK→MAPKK→MAPK.

Der Aktivierungsweg von c-Fos entspricht prinzipiell dem von c-Jun, verläuft jedoch zu diesen parallel über andere MAP-Kinasen. Im Falle von c-Fos handelt es sich um den sogenannten „klassischen“ MAP-Kinase-Weg. Er wird normalerweise über rezeptorgebundene Wachstumsfaktoren und Mitogene ausgelöst, und führt über die Aktivierung von RAS, einer kleinen GTPase zur kaskadeartigen Aktivierung von RAF, MEK und ERK, die der MAP3K, MAP2K und MAPK entsprechen (Monje, Marinissen et al. 2003; Weston and Davis 2007). Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit von c-Fos wurde von Tanos et al. und Marinissen et al. durch die p38 MAP-Kinase beschrieben. Die Phosphorylierung von c-Fos durch p38 α/β trat hier nach Stressapplikation durch UV-Licht auf (Tanos, Marinissen et al. 2005).

4.2.2 Einflussnahme von AKT/PKB auf MAP-Kinasen

Unsere Versuche zeigten dass eine Überexpression von inaktiver Akt Kinase die Expression der MMP 9 induziert. Dies könnte so erklärt werden, dass die PKB/Akt induzierende Signalwege hemmt. Ein Beispiel hierfür wären die MAP-Kinasen. Hier ist eine Verbindung zwischen der Akt und den MAP Kinasen an mehreren Stellen möglich (Siehe Abb. 20).

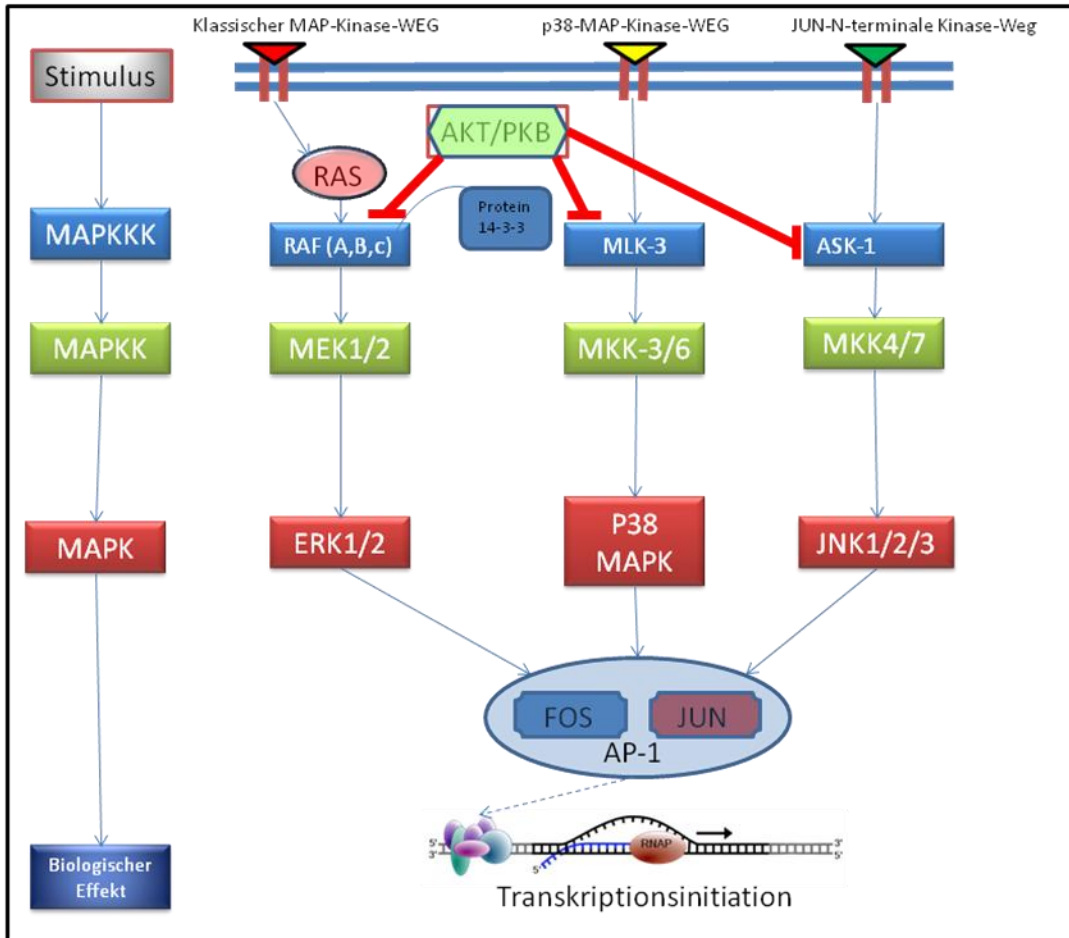


Abbildung 20: Indirekte Regulation von AP-1 durch AKT/PKB.

Dementsprechend führt eine inaktive PKB/AKT zur AP-1 abhängigen Transkriptionsinitiation. (Schema selbst gezeichnet)

Dabei zeigt es sich dass die AKT/PKB den RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg über indirekte Hemmung von RAF inhibieren kann. An der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte gezeigt werden, dass RAF-1 direkt durch PKB/AKT an Ser-259 phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung ausgelöst, bindet das inhibitorische Protein 14-3-3 in dessen Folge die Aktivität von RAF-1 deutlich absinkt (Zimmermann and Moelling 1999; Moelling, Schad et al. 2002). Auch in neonatalen Gefäßmuskelzellen (VSMC) konnte dieser Cross-Talk verifiziert werden (Reusch, Zimmermann et al. 2001; Moelling, Schad et al. 2002). Mit PDGF (platelet derived growth factor) behandelte Zellen zeigten erwar-

tungsgemäß eine deutliche Aktivierung der PKB/AKT. Wegen der repressiven Wirkung der aktiven AKT/PKB auf RAF konnte das Mitogen PDGF nur eine transiente Aktivitätssteigerung von RAF bewirken. Weitere Zelllinien in denen der PKB-RAF Cross-Talk nachgewiesen wurde sind C2C12 Zellen, HEK293-Zellen (Moelling, Schad et al. 2002).

Nach Moelling et al. ist das Vorhandensein dieses Cross-Talks zwischen AKT/PKB und RAF abhängig von Zelltyp, Differenzierungsgrad und Art der Ligandenbindung (Moelling, Schad et al. 2002).

AKT hemmt den JNK-Signalweg durch Inhibition der MAPKKK ASK-1 und verringert somit die Aktivierung von c-Jun. Als Folge dessen werden AP-1 abhängige Gene weniger induziert. Xu et al. konnte zeigen, dass eine Coaktivierung des GABA-A und GABA-B Rezeptors in Hirnzellen der Ratte durch Muscimol und Baclofen zur Neuroprotektion nach Ischämie führt. Als Mechanismus konnte die Hemmung der ASK-1 durch AKT1/PKB α identifiziert werden. ASK-1 entspricht einer MAPKKK des JNK-Signalwegs und wird an Ser83 phosphoryliert. Dies wurde als eine Erklärungsmöglichkeit der bekannten antiapoptotischen Wirkung von AKT/PKB (Hemmung des proapoptotischen JNK-Signalwegs) dargestellt (Xu, Li et al. 2008). Ähnliches wurde von Kim et al. berichtet. Akt/PKB verringerte die durch Stress und Überexpression stimulierte ASK-1 Aktivität in L929 Zellen in dessen Folge es zur Reduktion des JNK Signalweges kommt. Dies reduzierte in diesem Zellsystem die Apoptose (Kim, Khursigara et al. 2001). Wang et al. berichtete über eine Östrogen-induzierte Neuroprotektion nach transienter zerebraler Ischämie. Durch Interaktion des Östrogenrezeptors ER α mit der PI3K erfolgt die Aktivierung der PKB/AKT, die ihrerseits zur Hemmung der MAPKKK MLK-3 führt. MLK-3 entspricht einer MAPKKK des JNK Signalwegs. Die AKT/PKB Aktivie-

rung führt deshalb ähnlich wie bei der ASK-1 zur Inhibition des JNK-Signalweges (Wang, Zhang et al. 2006).

Zusammenfassend zeigt sich, dass unter bestimmten Bedingungen (Zelltyp, Differenzierungsgrad, Zellzustand) AKT/PKB zur Suppression von c-Fos und c-Jun und damit von AP-1 führen kann. Im Umkehrschluss könnte dann eine inaktive PKB/AKT zur Induktion AP-1 abhängiger Gene beitragen. Die MMP-9 und MMP-13 besitzen ein transkriptionsursprungsnahes AP-1-Response-Element (RE). Die MMP-13 hat zusätzlich noch ein transkriptionsursprungsfernes RE (Wester-marck and Kahari 1999; Clark, Swingler et al. 2008). Eine erhöhte AP-1 Aktivität könnte im Modell eines reduzierten Inhibitors des Signalweges die verstärkte Genexpression der MMP-9/-13 bei inaktiv überexprimierter PKB/AKT erklären.

4.3 Mögliche Transkriptionsregulation über NF- κ B

Eine weitere Einflussnahme auf die Expression von MMP-2 und MMP-9 ist über den von der PKB/AKT indirekt adressierten Transkriptionsfaktor NF- κ B möglich. Das NF- κ B Response Element (RE) liegt bei der MMP-9 ca. 500 BP und bei der MMP-2 ca. 450 BP vom Transkriptionsursprung entfernt (Clark, Swingler et al. 2008).

Die NF- κ B-Transkriptionsfaktorenfamilie reguliert Gene die in die Vorgänge des Zellwachstums, der Proliferation, der Antiapoptose, der Angiogenese und in Metastasierungsvorgänge involviert sind. In Säugtieren umfasst sie fünf verschiedene Proteine: c-Rel, RelA (p65) RelB, NF- κ B1 (p50/p105), und NF- κ B2 (p52/p100). Alle enthalten die sogenannte RHD (engl.: Rel homology domain), welche aus DNA-bindender Domäne, Dimerisationsdomäne und dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) besteht. In den meisten Zelltypen ist NF- κ B inaktiv im Zytoplasma retiniert. Hierbei ist NF- κ B an die Inhibitoren von NF- κ B den I κ Bs gebunden. Durch diese Bindung wird das nukleäre

Lokalisationssignal maskiert und eine Translokation von NF- κ B in den Nucleus kann nicht mehr erfolgen.

Während der Aktivierung von NF- κ B kommt es zur Phosphorylierung der I κ Bs an zwei konservierten Serinresten durch die I κ B-Kinase (I κ K). Die I κ Bs werden dann dem proteasomalen (26S) Abbau durch Polyubiquitination zugeführt. Freies NF- κ B, der in den meisten Zelltypen als Dimer von RelA (p65) und NF- κ B1 (p50) vorliegt, kann dann in den Nucleus translozieren und dort akkumulieren. Durch Bindung an das κ B-Motiv (RE) wird dann die genregulatorische Wirkung vermittelt (Suh and Rabson 2004).

Wie die von AKT/PKB vermittelte Aktivierung der I κ Ks auf molekularer Ebene funktioniert, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Neueste Studien an PC3-Zellen zeigten, dass aktive AKT/PKB die Bildung eines Komplexes aus I κ K α und TORC1 initiiert. Dabei konnten in vitro Kinase-Assays zeigen, dass mTOR und Raptor (TORC1 \rightarrow Target Of Rapamycin Complex-1) in Abhängigkeit einer aktiven AKT/PKB zur Induktion der I κ K-Aktivität führen, die letztendlich zur Aktivierung von NF- κ B führt (Dan, Cooper et al. 2008).

Dementsprechend müsste eine konstitutiv aktive Akt/PKB zur Induktion von MMPs führen, die das NF- κ B-Motiv in der Promotorregion enthalten. Die Expressionsdaten dieser Studie spiegeln dies jedoch nicht wieder. Bei MMP-2/-13/-14 existieren im Promotorbereich ein, bei der MMP-9 sogar zwei NF- κ B Erkennungssequenzen (Westermarck and Kahari 1999; Clark, Swingler et al. 2008). Eine Induktion der mRNA bei konstitutiv-aktiver PKB/AKT kann jedoch nur bei der MMP2 dargestellt werden. Ob dies eine NF- κ B vermittelte Induktion ist, bleibt offen.

4.4 Mögliche Genregulation über den WNT Signalweg

Ein weiteres Response-Element auf dem MMP-9 Promotor bindet den Transkriptionsfaktor TCF/LEF (engl.: T-Cell-Factor/Lymphoid Enhancer Factor). Er wird am Ende des WNT-Signalweges durch Bindung von freiem β -Catenin aktiviert. Der WNT-Signalweg ist von *Drosophila Melanogaster* bis zum Menschen hoch konserviert. Er reguliert Zell-Zell-Interaktionen u.a. während der Embryogenese und Morphogenese und ist an der Entstehung von einigen Krebsarten, z.B. des kolorektalen-Karzinoms durch Mutationen im APC-Gen, beteiligt. Ohne Bindung des WNT-Liganden, einem sekretiertem Glykoprotein, befindet sich der Signalweg im Off-Zustand. Hierbei ist β -Catenin komplexiert mit Axin und APC und kann von der GSK-3 β (Glykogensynthasekinase-3 β) phosphoryliert werden, in dessen Folge es dem proteosomalen Abbau zugeführt wird.

Im On-Zustand, als Folge der Bindung des Wnt-Liganden an den Rezeptor „Frizzled“ und den Co-Rezeptor LRP, kann das Protein Dvl (Disheveled) an den im Zytosol befindlichen Proteinkomplex aus β -Catenin, Axin und APC binden. Dadurch reduziert sich letztendlich der Phosphorylierungsgrad des β -Catenins. Akkumuliertes β -Catenin kann nun in den Nucleus translozieren und an TCF/LEF binden. Durch die Bindung von β -Catenin an TCF/LEF dissoziiert der Corepressor „Groncho“ von TCF/LEF und aktiviert somit den Transkriptionsfaktor (Wu, Crampton et al. 2007).

Akt/PKB inhibiert bekanntermaßen die GSK-3 β (Shiojima and Walsh 2006), so dass aktive Akt, nach dem oben Genannten über die Verringerung des proteosomalen Abbaus von β -Catenin letztendlich zur Steigerung TCF/LEF-anhängiger Gene beitragen könnte.

Umgekehrt müsste eine konstitutiv inaktive AKT/PKB zum Absinken der Transkriptionsinitiation führen.

Diesbezüglich können auch hier die Daten der Genexpressionsstudie nicht mit der Theorie in Einklang gebracht werden. Die MMP-9, deren Promotor nach Clark et al. zwei TCF/LEF Bindungsstellen beinhaltet, zeigt bei Überexpression einer aktiven AKT/PKB in KFB keine signifikante Veränderung der m-RNS-Synthese gegenüber der Kontrolle mit WT-PKB, jedoch einen Anstieg bei Überexpression einer konstitutiv inaktiven PKB/AKT.

Im Gegensatz zu unseren Daten konnte durch Wu et al. eine stark positive Abhängigkeit der MMP-2 und MMP-9 Genexpression vom WNT-Signalweg gezeigt werden. Eine Analyse des MMP-9 und MMP-2 Promotors ergab bei Wu et al. sogar zwei putative TCF/LEF-Bindungsstellen bei der MMP-2 und vier bei der MMP-9 (Wu, Crampton et al. 2007).

4.5 Mögliche Interaktion von AKT/PKB mit dem JAK-STAT-Signalweg über die Kinase mTOR

Nach der Promotoranalyse von Clark et al. beinhalten die MMPs-2/-9 und -13 eine Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor STAT (signal transducer and activator of transcription) (Clark, Swingler et al. 2008). Die Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren erfolgt normalerweise durch Phosphorylierung von STAT durch die JAK (Janus-Kinase oder Just Another Kinase). Ihre Aktivierung ist Folge der Ligandenbindung (z.B. von Interferonen) an Zytokinrezeptoren. Nach der Aktivierung der STATs erfolgt deren Translokation in den Nukleus mit nachfolgender Modulation der Genexpression (Murray 2007).

Eine mögliche Interaktion zwischen dem JAK-STAT-Signalweg und AKT/PKB könnte die Arbeit von Yokogami et al. aufzeigen. Er konnte nachweisen, dass in CNTF-(Ciliary Neurotrophic Faktor) stimulierten Neuroblastomzellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch Phosphorylierung an Ser727 durch die Kinase mTOR erfolgt

(Yokogami, Wakisaka et al. 2000). mTOR kann im Komplex TORC1 (Target Of Rapamycin Complex-1) indirekt durch Akt/PKB phosphoryliert werden. Der Mechanismus, durch den AKT/PKB mTORC1 aktiviert, führt über die Phosphorylierung von TSC2 durch Akt/PKB, welche den Komplex TSC1/2 inaktiviert. Der Komplex aus TSC1/2 inhibiert normalerweise Rheb (RAS homolog enriched in brain), eine RAS-ähnliche GTPase, die ihrerseits mTor (in TORC1) aktiviert. Die Inhibition des Komplexes TSC1/2 durch die Phosphorylierung von TSC2 durch AKT/PKB führt deshalb letztendlich über die Aktivierung von Rheb zur Aktivitätssteigerung der mTOR-Kinase (Shiojima and Walsh 2006).

Eine aktive Akt/PKB könnte somit über Aktivierung von STAT zur Transkriptionsinitiation STAT-abhängiger Gene führen. Bei der MMP-9 und MMP-13 würden die experimentell gewonnenen Expressionsdaten diesen theoretischen Weg nicht unterstützen. Die Erklärung der Expressionssteigerung der MMP-2 bei aktiver AKT/PKB wäre bei isolierter Betrachtung damit u.U. möglich.

Zusammengefasst lässt sich das o.g. AKT/PKB-abhängige m-RNS-Expressionsprofil der MMP-9 und MMP-13 am besten mit der AP-1 vermittelten Transkriptionsinitiation über den klassischen MAP-Kinasen-Weg und den JNK-Weg beschreiben. Die dabei von einer konstitutiv inaktiven AKT/PKB nicht mehr vermittelte Inhibition auf RAF, ASK-1 und MLK3 könnte letztendlich über eine gesteigerte Aktivierung von c-Fos und c-Jun zur Transkriptionssteigerung der MMP-9 und 13 führen.

Bei der MMP-2 erscheint die Situation weniger eindeutig. Bei isolierter Betrachtung könnte die Expressionssteigerung bei aktiver AKT/PKB durch NF- κ B, durch TCF/LEF oder STAT wie oben beschreiben vermit-

telt werden. Die Expressionssteigerung der MMP-2 bei inaktiver AKT/PKB könnte wie bei MMP-13 und -9 AP-1 vermittelt sein.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Transkriptionssteigerung der MMP-2 bei inaktiver als auch bei aktiver PKB wäre, dass eine überexprimierte AKT/PKB unabhängig vom ihrem Aktivitätszustand zur Steigerung der Transkriptionsrate beitragen könnte. Dies würde einer regulatorischen Funktion des Proteins AKT/PKB unabhängig vom katalytischen Zentrum entsprechen.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen im Alter führende Todesursachen in der westlichen Welt dar. Der Proteinkinase B, auch AKT genannt, kommt am Herzen eine zentrale Rolle bezüglich der Organogenese zu (Fujio, Nguyen et al. 2000). Ihre Funktion wird in Verbindung mit der Insulinwirkung, dem Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Steuerung von Entwicklung und Differenzierung von Geweben durch Modulation des Zellüberlebens, des Zellwachstum und der Zellteilung diskutiert. Auch das postnatale Herzwachstum in physiologischer sowie pathologischer Ausprägung wird durch den PKB/AKT-Signalweg reguliert (McDevitt, Laflamme et al. 2005).

Diez et al. (Diez, Nestler et al. 2001) zeigten bei seneszenten Kardiofibroblasten der Ratte *in vitro* eine reduzierte Expression der PKB α /AKT-1. Auch bei Myokard-Biopsaten von jungen und alten Patienten (ohne Myokardpathologie) konnte gezeigt werden, dass die Expressionstärke der AKT-1/PKB α mit dem Alter abnahm.

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage klären ob AKT/PKB zu einer veränderten Expression von extrazellulären Matrix-Proteinen, die sie abbauenden Matrixmetalloproteinasen bzw. deren Inhibitoren führt

und damit zu einer Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix im Sinne einer Fibrose des Myokards beitragen könnte.

Nach adenoviraler Transfektion von Kardiofibroblasten mit einer konstitutiv aktiven bzw. inaktiven PKB/AKT-Mutanten, erfolgte die Analyse der differentiellen Genexpression fibroserelevanter Gene mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese in drei verschiedenen Zellzuständen (V1/V2/V3). Die Auswertung der gewonnenen Daten zeigte, dass von den untersuchten Genen lediglich die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)-2/-9/-13 einer deutlichen Regulation unterworfen sind.

Die Darstellung auf Proteinebene gelang für die MMP-9 und MMP-2 letztendlich mittels Zymographie.

Bezugnehmend auf die Fragestellung zeigte sich bei der durchgeführten Genexpressionsanalyse fibroserelevanter Gene eine Regulation der MMP-2/-9 und -13 durch die PKB/AKT auf m-RNS-Ebene, mit deutlichem Anstieg der für die MMP-9 und MMP-13 kodierenden m-RNS bei Inaktivierung der PKB/AKT. Auf Proteinebene besteht lediglich bei der MMP-9 eine entsprechende Änderung der Proteinmenge. Die MMP-2-Enzymmenge zeigte sich auf basalem Expressionsniveau als nicht reguliert. Die MMP-13 konnte zymographisch nicht nachgewiesen werden. Bezugnehmend auf die durch Diez et al. gefundene Herabregulation der PKB-Akt in seneszenten Kardiofibroblasten der Ratte könnte die in der Arbeit gezeigte Steigerung der Genexpression der MMP-2/-9 und 13 die Voraussetzung eines zur Fibrose führenden Remodelings der kardialen extrazellulären Matrix im Sinne einer Degradation der EZM darstellen. Nach Schram und Sweeney et al. kann sich ein Remodeling der extrazellulären Matrix des Herzens schwerpunktmäßig sowohl als Veränderungen in der Synthese von matrixbil-

denden Proteinen als auch in Veränderungen der Expression und Aktivität von MMPs und TIMPs darstellen.

Neben der wichtigen Wirkung eines antiapoptotischen Zellschutzes könnte die Serin-Threonin-Kinase PKB/AKT mit an der Entstehung einer myokardialen Fibrose beteiligt sein. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, diese Frage eindeutig zu klären.

6 Literaturverzeichnis

- Akool el, S., H. Kleinert, et al. (2003). "Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR." Mol Cell Biol **23**(14): 4901-16.
- An, D. and B. Rodrigues (2006). "Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1489-506.
- Anderson, L. und J. Seilhamer (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." Electrophoresis **18**(3-4): 533-7.
- Barber, R. D., D. W. Harmer, et al. (2005). "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." Physiol Genomics **21**(3): 389-95.
- Bauer, E. A., N. Silverman, et al. (1986). "Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF." Science **234**(4781): 1240-3.
- Bertness, V. L., C. A. Felix, et al. (1990). "Characterization of the breakpoint of a t(14;14)(q11.2;q32) from the leukemic cells of a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia." Cancer Genet Cytogenet **44**(1): 47-54.
- Bond, M., A. H. Baker, et al. (1999). "Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **264**(2): 561-7.
- Bonnin und Sparrow (1978). "Collagen synthesis and content turnover in cardiac and skeletal muscles of the adult fowl and changes during stretch induced growth " Biochem J **176**: 419-429.
- Brazil, D. P., Z. Z. Yang, et al. (2004). "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts." Trends Biochem Sci **29**(5): 233-42.
- Brilla, C. G., R. C. Funck, et al. (2000). "Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease." Circulation **102**(12): 1388-93.
- Brilla, C. G., J. S. Janicki, et al. (1991). "Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries." Circ Res **69**(1): 107-15.

- Brilla, C. G., L. Matsubara, et al. (1996). "Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis." Hypertension **28**(2): 269-75.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-68.
- Burlew, B. S. und K. T. Weber (2002). "Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction." Herz **27**(2): 92-8.
- Calera, M. R., C. Martinez, et al. (1998). "Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles." J Biol Chem **273**(13): 7201-4.
- Campisi, J. (1996). "Control of replicative senescence, handbook of the biology of aging." new york academic press: 121-149.
- Campisi, J. (1997). "The biology of replicative senescence." Eur J Cancer **33**(5): 703-9.
- Capasso, J. M., A. Malhotra, et al. (1983). "Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium." Am J Physiol **245**(1): H72-81.
- Cardone, M. H., N. Roy, et al. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-21.
- Carmeliet, P., L. Moons, et al. (1997). "Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation." Nat Genet **17**(4): 439-44.
- Chancey, A. L., G. L. Brower, et al. (2002). "Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload." Circulation **105**(16): 1983-8.
- Chen, G., T. G. Gharib, et al. (2002). "Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas." Mol Cell Proteomics **1**(4): 304-13.
- Cheng, J. Q., A. K. Godwin, et al. (1992). "AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9267-71.
- Clark, I. M., T. E. Swingler, et al. (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1362-78.

- Coffer, P. J., J. Jin, et al. (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multi-functional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335** (Pt 1): 1-13.
- Dan, H. C., M. J. Cooper, et al. (2008). "Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK." Genes Dev **22**(11): 1490-500.
- de Souza, R. R. (2002). "Aging of myocardial collagen." Biogerontology **3**(6): 325-35.
- Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-511.
- Diez, C., M. Nestler, et al. (2001). "Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation." Cardiovasc Res **49**(4): 731-40.
- Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-5.
- Dornheim A, H.-V. C., Schwarz I, Lotz O, Dralle H (1997). "Expression of matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in human thyroid tissues: An immunohistochemical study." Exp Clin Endocrinol Diab **105 Suppl.1** (1997) 53.
- Eberhardt, W. (2005). "Posttranskriptionelle Regulation der glomerulären Matrixmetalloproteinase-9." BIOspektrum · 3/05 · 11. Jahrgang
- Eberhardt, W., S. Akool el, et al. (2002). "Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability." J Biol Chem **277**(36): 33518-28.
- Egeblad, M. und Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.
- Eghbali, M. und K. T. Weber (1990). "Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression." Mol Cell Biochem **96**(1): 1-14.
- Elstrom, R. L., D. E. Bauer, et al. (2004). "Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells." Cancer Res **64**(11): 3892-9.
- Franke, T. F., K. D. Tartof, et al. (1994). "The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the ge-

- nome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* c-akt homolog Dakt1." Oncogene **9**(1): 141-8.
- Fraticegli, A., R. Josephson, et al. (1989). "Morphological and contractile characteristics of rat cardiac myocytes from maturation to senescence." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): H259-65.
- Freije, J. M., M. Balbin, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases and tumor progression." Adv Exp Med Biol **532**: 91-107.
- Fujio, Y., T. Nguyen, et al. (2000). "Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart." Circulation **101**(6): 660-7.
- Garcia Arguinzonis, M. I., A. B. Galler, et al. (2002). "Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)." J Biol Chem **277**(47): 45604-10.
- Gioia, M., S. Monaco, et al. (2008). "The Collagen Binding Domain of Gelatinase A Modulates Degradation of Collagen IV by Gelatinase B." J Mol Biol.
- Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, et al. (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." Nature **389**(6646): 77-81.
- Han, Y. P., T. L. Tuan, et al. (2001). "TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP." J Cell Sci **114**(Pt 1): 131-139.
- Janicki, J. S. (1992). "Myocardial collagen remodeling and left ventricular diastolic function." Braz J Med Biol Res **25**(10): 975-82.
- Jespersen, C., A. Doller, et al. (2009). "Molecular mechanisms of nitric oxide-dependent inhibition of TPA-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MCF-7 cells." J Cell Physiol.
- Jeziarska, A. und T. Motyl (2009). "Matrix Metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review." Med Sci Monit **15**(2): RA32-40.
- Jin, U. H., S. J. Suh, et al. (2008). "Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE inhibits human aortic smooth muscle cell migration and MMP-9 activity through AKT signaling pathway." J Cell Biochem **104**(1): 15-26.
- Kim, A. H., G. Khursigara, et al. (2001). "Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1." Mol Cell Biol **21**(3): 893-901.

- Konishi, H., S. Kuroda, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins." Biochem Biophys Res Commun **216**(2): 526-34.
- Lakatta, E. G. (2002). "Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons." Heart Fail Rev **7**(1): 29-49.
- Leber, T. M. und F. R. Balkwill (1997). "Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels." Anal Biochem **249**(1): 24-8.
- Li, Y. Y., A. M. Feldman, et al. (1998). "Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart." Circulation **98**(17): 1728-34.
- Lichtinghagen, R., P. B. Musholt, et al. (2002). "Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue." Eur Urol **42**(4): 398-406.
- Liu, Y. E., M. Wang, et al. (1997). "Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4)." J Biol Chem **272**(33): 20479-83.
- Manning, B. D. und L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-74.
- Mazzieri, R., L. Masiero, et al. (1997). "Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants." Embo J **16**(9): 2319-32.
- McCarthy, S. M., P. F. Bove, et al. (2008). "Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of the cysteine switch." Biochemistry **47**(21): 5832-40.
- McDevitt, T. C., M. A. Laflamme, et al. (2005). "Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway." J Mol Cell Cardiol **39**(6): 865-73.
- Mehra, A., K. H. Lee, et al. (2003). "Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations." Biotechnol Bioeng **84**(7): 822-33.
- Miwa, W., J. Yasuda, et al. (1996). "Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus

- in human pancreatic cancer." Biochem Biophys Res Commun **225**(3): 968-74.
- Moelling, K., K. Schad, et al. (2002). "Regulation of Raf-Akt Cross-talk." J Biol Chem **277**(34): 31099-106.
- Monje, P., M. J. Marinissen, et al. (2003). "Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor." Mol Cell Biol **23**(19): 7030-43.
- Montes, G. S. und L. C. Junqueira (1982). "Biology of collagen." Rev Can Biol Exp **41**(2): 143-56.
- Morbidelli, L., S. Donnini, et al. (2003). "Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis." Curr Pharm Des **9**(7): 521-30.
- Murray, P. J. (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." J Immunol **178**(5): 2623-9.
- Olivetti, G., M. Melissari, et al. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy." Circ Res **68**(6): 1560-8.
- Olson, E. N. und M. D. Schneider (2003). "Sizing up the heart: development redux in disease." Genes Dev **17**(16): 1937-56.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 359-71.
- Orntoft, T. F., T. Thykjaer, et al. (2002). "Genome-wide study of gene copy numbers, transcripts, and protein levels in pairs of non-invasive and invasive human transitional cell carcinomas." Mol Cell Proteomics **1**(1): 37-45.
- Overall, C. M. und C. Lopez-Otin (2002). "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era." Nat Rev Cancer **2**(9): 657-72.
- Palosaari, H., C. J. Pennington, et al. (2003). "Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue." Eur J Oral Sci **111**(2): 117-27.
- Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, et al. (2002). "[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]." Herz **27**(7): 677-82.

- Pauschinger, M., D. Knopf, et al. (1999). "Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio." Circulation **99**(21): 2750-6.
- Reusch, H. P., S. Zimmermann, et al. (2001). "Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **276**(36): 33630-7.
- Robinson, T. F., L. Cohen-Gould, et al. (1983). "Skeletal framework of mammalian heart muscle. Arrangement of inter- and pericellular connective tissue structures." Lab Invest **49**(4): 482-98.
- Roeb, E., C. G. Dietrich, et al. (2001). "Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9." Cancer **92**(10): 2680-91.
- Sampieri, C. L., R. K. Nuttall, et al. (2008). "Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes." Matrix Biol **27**(2): 128-38.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2005). "Growing roles for the mTOR pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 596-603.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-101.
- Schiekofer, S., I. Shiojima, et al. (2006). "Microarray analysis of Akt1 activation in transgenic mouse hearts reveals transcript expression profiles associated with compensatory hypertrophy and failure." Physiol Genomics **27**(2): 156-70.
- Schram, K. and G. Sweeney (2008). "Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure." Trends Cardiovasc Med **18**(6): 199-205.
- Sekimoto, T., M. Fukumoto, et al. (2004). "14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1)." Embo J **23**(9): 1934-42.
- Shiojima, I., K. Sato, et al. (2005). "Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure." J Clin Invest **115**(8): 2108-18.
- Shiojima, I. und K. Walsh (2006). "Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway." Genes Dev **20**(24): 3347-65.
- Simm, A., J. P. Halle, et al. (1994). "Proliferative and metabolic capacity of rat embryo fibroblasts immortalized by c-myc depends

- on cellular age at oncogenic transfection." Eur J Cell Biol **65**(1): 121-31.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (2000). "A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure." Circulation **102**(16): 1944-9.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function." Circ Res **85**(4): 364-76.
- Staal, S. P. (1987). "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 5034-7.
- Staal, S. P. und J. W. Hartley (1988). "Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus." J Exp Med **167**(3): 1259-64.
- Staal, S. P., J. W. Hartley, et al. (1977). "Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(7): 3065-7.
- Staal, S. P., K. Huebner, et al. (1988). "The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32." Genomics **2**(1): 96-8.
- Sternlicht, M. D. und Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Suh, J. und A. B. Rabson (2004). "NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon?" J Cell Biochem **91**(1): 100-17.
- Tanos, T., M. J. Marinissen, et al. (2005). "Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light." J Biol Chem **280**(19): 18842-52.
- Vanhaesebroeck, B. und D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-76.
- Visse, R. und H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Wang, R., Q. G. Zhang, et al. (2006). "Inhibition of MLK3-MKK4/7-JNK1/2 pathway by Akt1 in exogenous estrogen-induced neu-

- roprotection against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats." J Neurochem **99**(6): 1543-54.
- Waterston, R., C. Martin, et al. (1992). "A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*." Nat Genet **1**(2): 114-23.
- Weber, K. T. und C. G. Brilla (1991). "Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system." Circulation **83**(6): 1849-65.
- Weber, K. T. und C. G. Brilla (1992). "Myocardial fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system." J Cardiovasc Pharmacol **20 Suppl 1**: S48-54.
- Weber, K. T., C. G. Brilla, et al. (1992). "Pathologic hypertrophy with fibrosis: the structural basis for myocardial failure." Blood Press **1**(2): 75-85.
- Weber, K. T., W. A. Clark, et al. (1987). "Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium." J Cardiovasc Pharmacol **10 Suppl 6**: S37-50.
- Wei, J. Y., H. A. Spurgeon, et al. (1984). "Excitation-contraction in rat myocardium: alterations with adult aging." Am J Physiol **246**(6 Pt 2): H784-91.
- Wei, W., J. Jin, et al. (2005). "The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase." Cancer Cell **8**(1): 25-33.
- Westermarck, J. und V. M. Kahari (1999). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." Faseb J **13**(8): 781-92.
- Weston, C. R. und R. J. Davis (2007). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 142-9.
- Wu, B., S. P. Crampton, et al. (2007). "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration." Immunity **26**(2): 227-39.
- Wullschleger, S., R. Loewith, et al. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-84.
- Xu, J., C. Li, et al. (2008). "Additive neuroprotection of GABA A and GABA B receptor agonists in cerebral ischemic injury via PI-3K/Akt pathway inhibiting the ASK1-JNK cascade." Neuropharmacology **54**(7): 1029-40.
- Yan, C. und D. D. Boyd (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." J Cell Physiol **211**(1): 19-26.

- Yang, Z. Z., O. Tschopp, et al. (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." Biochem Soc Trans **32**(Pt 2): 350-4.
- Yasuda, T., K. Kimura, et al. (1996). "Measurement of Interface-Induced Optical Anisotropies of a Semiconductor Heterostructure: ZnSe/GaAs(100)." Phys Rev Lett **77**(2): 326-329.
- Yokogami, K., S. Wakisaka, et al. (2000). "Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR." Curr Biol **10**(1): 47-50.
- Zimmermann, S. und K. Moelling (1999). "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." Science **286**(5445): 1741-4.

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildungs-Nr.	Publikationsstelle/Herkunft
1	(Burlew and Weber 2002)
2	(Burlew and Weber 2002)
3	Vom Autor selbst erstellt
4	(Akool el, Kleinert et al. 2003)
5	(Palosaari, Pennington et al. 2003)
6	(Palosaari, Pennington et al. 2003)
7	(Shiojima and Walsh 2006)
8-18	Vom Autor selbst erstellt
19	(Clark, Swingler et al. 2008)
20	Vom Autor selbst erstellt

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin(I)-konvertierendes-Enzym
AKT	Synonym für PKB
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
AP-1	Engl.: Activator-Protein-1
BAD	engl.: Bcl-2-associated death promoter
BCL-2	Regulatoren des programmierten Zelltodes
c-Fos/c-Jun	Proto-Onkogen; Transkriptionsfaktor
cGMP	Zyklisches Guanosidmonophosphat
c-jun N-terminale Kinase	Unterform der MAP-Kinasen
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	engl.: Fibroblast-Growth-Factor
GAG-Protein	engl.: Group-specific-AntiGen, Kern-Proteine eines Retrovirus
GLUT	Glukose-Transporter
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
IGF	engl.: Insulin-like-Growth-Factor
IL	Interleukin
LV	Linker Herzvenrikel
MAP-Kinase	engl.: Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
m-RNA	Messenger RNA/ Boten-RNA
mTORC	Engl.: Mammalian Target of Rapamycin-Complex

NCBI	National Center of Biologie Information
NF- κ B	engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
p38	Unterform der MAP-Kinasen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PDK	engl.: Phosphoinositide Dependent protein Kinase
PH-Domäne	engl.: Pleckstrin-homology-Domäne (bindet Phosphatidylinositol)
PKB	Protein-Kinase-B (auch AKT)
PKC	Protein-Kinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RE	engl: Response-Element
Rheb	Engl.:Ras Homolog enriched in brain
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
STAT	engl.: signal transducer and activator of transcription
TCF/LEF	engl.:T-Cell-Factor/Lymphoid-Enhancer-Factor
TGF	engl.:Tumor-Growth-Factor/Transforming-Growth-Factor
TIMP	engl.: tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TSC	engl.:Tuberous Sclerosis-Protein

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die gute Betreuung und seine lange und ausdauernde Unterstützung bei dieser Arbeit. Diesbezüglich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter.

Besonderer Dank gilt meinem Studienfreund Claudius Diez für seine wertvollen Ratschläge, Hinweise und Ermutigungen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Daniela Fraccarollo, die mich in die Geheimnisse der Zymographie einweihte und Frau Renate Donath, die mich bei meiner Arbeit im Labor tatkräftig unterstützte.