

**PATRICK BEST**

**DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR AP-1  
ÜBERMITTELT  $\alpha$ - ABER NICHT  $\beta$ -ADRENERGE  
HYPERTROPHE WACHSTUMSREGULATION  
ADULTER KARDIOMYOZYTEN**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Der Transkriptionsfaktor AP-1 übermittelt  $\alpha$ - aber nicht  
 $\beta$ -adrenerge hypertrophe Wachstumsregulation adulter  
Kardiomyozyten**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Patrick Gerhard Best**

aus Düsseldorf

Gießen 2006

Aus dem Physiologischen Institut

Leiter: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Fr. Prof. G. Euler

Gutachter: Hr. Prof. L. Schmitz

Tag der Disputation: 14.05.2007

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter Wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Worms, den 17. September 2006



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Verzeichnis der Abkürzungen.....	6
1 Einleitung .....	9
1.1 Myokardiale Hypertrophie .....	9
1.1.1 Pathophysiologie der Hypertrophie .....	9
1.1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie.....	10
1.1.3 Katecholamine induzieren Hypertrophie .....	11
1.1.4 Signaltransduktion bei adrenerg induzierter Hypertrophie .....	12
1.1.5 Hinweise auf die Beteiligung von AP-1 an der durch Katecholamine induzierten Hypertrophie .....	14
1.2 Myokardiale Apoptose.....	14
1.2.1 Physiologie der Apoptose .....	14
1.2.2 Apoptose in Herzmuskelzellen.....	16
1.2.3 Stickstoffmonoxid induziert AP-1 abhängige Apoptose.....	16
1.3 Beteiligung von AP-1 an Apoptose und Hypertrophie .....	17
1.4 Fragestellung .....	20
2 Material .....	21
2.1 Chemikalien .....	21
2.2 Antikörper.....	22
2.3 Decoy-Oligonukleotide .....	23
2.4 Allgemein verwendete Geräte.....	23
2.5 Spezielle Geräte .....	23
2.5.1 Zellkultur .....	23
2.5.2 Retardation Assay.....	24
2.5.3 EDV .....	24
2.6 Verbrauchsmaterialien .....	24
3 Methoden .....	26
3.1 Präparation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten (Piper et al., 1982) .....	26
3.1.1 Versuchstiere .....	26
3.1.2 Verwendete Lösungen .....	26
3.1.3 Durchführung .....	27

3.2	Zellkultur von isolierten Kardiomyozyten.....	28
3.2.1	Verwendete Media .....	28
3.2.2	Vor- und Ausplattierung .....	29
3.2.3	Kurzzeitkultivierung.....	29
3.2.4	Langzeitkultivierung .....	29
3.2.5	Transformation mittels Decoy-Oligonukleotiden.....	30
3.2.6	Stimulation und Ernte der Zellen.....	31
3.3	Kernextraktion .....	31
3.3.1	Verwendete Puffer .....	31
3.3.2	Versuchsablauf .....	32
3.4	Retardation Assay.....	33
3.4.1	Radioaktive 5'-Endmarkierung.....	33
3.4.2	Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide.....	34
3.4.3	G50-Sephadex-Schleudersäule (Gelfiltration) .....	35
3.4.4	Quantitative Bestimmung der Inkorporation von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP .....	35
3.4.5	Spezifische Bindung der Oligonukleotide an das Protein.....	35
3.4.6	Gelelektrophorese.....	36
3.4.7	Supershift Assay .....	38
3.5	Proteinsynthesemessung mittels Inkorporation von ( $^{14}\text{C}$ )-Phenylalanin.....	39
3.6	Zellmorphologie .....	41
3.7	Statistik .....	41
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Hypertrophie durch $\alpha$ -adrenerge Stimulation .....	42
4.1.1	Phenylephrin (PE) induziert AP-1 Bindungsaktivität .....	42
4.1.2	AP-1 ist entscheidend an der $\alpha$ -adrenergen Hypertrophie Entwicklung beteiligt .....	44
4.2	Hypertrophie durch $\beta$ -adrenerge Stimulation .....	49
4.2.1	Isoprenalalin (ISO) induziert AP-1 Bindungsaktivität .....	49
4.2.2	AP-1 ist nicht entscheidend an der durch ISO induzierten Hypertrophie beteiligt .....	50
4.3	Zusammensetzung von AP-1 .....	53
4.3.1	Zusammensetzung von AP-1 unter $\alpha$ -adrenerger Wachstumsstimulation .....	53
4.3.2	AP-1 unter $\beta$ -adrenerger Wachstumsstimulation durch ISO .....	54

4.3.3	AP-1 unter NO-Donor vermittelter Apoptose durch SNAP .....	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Die Rolle von AP-1 für die Hypertrophie und Apoptose .....	59
5.2	Variation in der Dimerzusammensetzung von AP-1 .....	60
5.2.1	Mögliche Ursachen für divergierende AP-1 Zusammensetzung .....	60
5.2.2	Folgen verschiedener AP-1 Zusammensetzungen .....	63
5.3	Wechselwirkung von AP-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren .....	64
6	Zusammenfassung.....	66
7	Summary.....	67
8	Literaturverzeichnis .....	68
9	Publikation.....	74
10	Lebenslauf .....	75
11	Danksagung .....	76

## Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
$\gamma^{32}\text{P-ATP}$	$\gamma^{32}\text{P-Adenosintriphospat}$
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Activator Protein-1
APS	Ammonium-Persulfat
Aqua bidest.	aqua bidestillata
Aqua demin.	aqua demineralisata
BNP	brain natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
cpm	counts per minute (Zählvorgänge pro Minute)
CRE	cAMP-responsive element
DNA	desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calve serum (fetales Kälberserum)
GSNO	S-Nitrosoglutathione

h	Stunden
HCL	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin
Hoe	Hoechst Farbstoff H33258
IE	internationale Einheiten
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISO	Isoprenalin
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
K	Kontrollbedingung
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
min	Minuten
n	Anzahl der Versuche
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

SCR	scrambled Decoy-Oligonukleotiden
SNAP	(±)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor β
TRE	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat responsive element (TPA)
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V	Volt
x g	x-fache Erdbeschleunigung
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokardiale Hypertrophie

### 1.1.1 Pathophysiologie der Hypertrophie

Eine myokardiale Hypertrophie ist in der Pathologie des Menschen eine häufige Ursache der Herzinsuffizienz. Die Hypertrophie des Myokards ist als adaptiver Prozess zu verstehen, der in erster Linie zur Kompensation der verminderten Herzauswurfleistung beiträgt. Die Herzinsuffizienz ist durch ein inadäquates Herzzeitvolumen, einen erhöhten linksventrikulären Füllungsdruck und eine Salz- und Wasserretention charakterisiert.

Als Beispiel für die Entstehung einer Herzinsuffizienz kann die ansteigende Druckbelastung im linken Ventrikel im Rahmen einer zunehmenden Aortenklappenstenose gelten. Die erhöhte Druckbelastung lässt die Wandspannung des linken Ventrikels ansteigen, diese wird jedoch durch die kompensatorische Hypertrophie der Wandmuskulatur zunächst im Normbereich gehalten. Bei einer weiterhin abnehmenden Aortenklappenöffnungsfläche dekompensiert aber dieser ursprünglich adaptive Prozess beim Überschreiten des kritischen Herzgewichtes, weil bei der deutlichen Zunahme der Wanddicke die Blutversorgung durch das Koronarsystem an seine Grenzen stößt. Die Eigenversorgung des Herzens ist dann nicht mehr gewährleistet. Zusätzlich kommt es zu strukturellen Veränderungen im Myokard (Collagen-/Fibroblasteneinlagerung, „ventricular remodeling“), was die Pumpfunktion des Herzens weiterhin beeinträchtigt. Dies führt im weiteren Verlauf zu einer funktionellen Dekompensation der Herzarbeit im Sinne einer Minderversorgung aller peripheren Organe. Weitere Beispiele für adaptive Wachstumsregulation des Herzmuskels sind eine Hypertrophie bei vermehrter Volumenbelastung und eine Hypertrophie des Restmyokards nach nekrotischem Zelltod bestimmter Areale als Folge eines Infarktes.

Die Myokardhypertrophie gilt als Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz und erhöhte Morbidität und Mortalität (Levy et al., 1990).

Die Hypertrophie der ventrikulären Muskelmasse beruht auf einer Zellvergrößerung der Myozyten bei gleich bleibender Zellzahl. Hierbei ist das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteindegradation zugunsten der Synthese verschoben. Die Hypertrophie ist anhand verschiedener Parameter messbar z.B.:

- Mittels der Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin lässt sich die vermehrte Proteinsyntheserate messen (Morgan et al., 1971).
- Die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Uridin gibt Aufschluss über einen Anstieg der RNA-Synthese und somit die Translationskapazität (Pinson et al., 1993)
- Das vermehrte Größenwachstum einer Zelle kann durch Vergleiche der Myozytenquerschnittsfläche aufgezeigt werden (Schlüter K.-D., 1998).
- Die Reexpression fötaler Gene „fetal shift“ wie z.B. Kreatinkinase (Isoform BB) geht mit der Hypertrophie einher (Schlüter et Piper, 1992).
- Zunahme der Herz- zu Körpergewichts-Rate

Die Hypertrophie des Herzmuskels kann zwar anfangs ein Defizit in der Versorgung des Körpers ausgleichen und stellt gewissermaßen einen helfenden Mechanismus dar, letztendlich muss sie aber doch als der Anfang vom Ende angesehen werden, da sie langfristig den Zusammenbruch der Herzarbeit mitverursacht.

### **1.1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie**

Um den Übergang zur Herzinsuffizienz in Zukunft vermeiden zu können, muss man Ursachen und Pathomechanismen der Myokardhypertrophie erforschen. Aufgrund der Schwierigkeit, in vivo neurohumorale von mechanischen Hypertrophie-Effekten zu unterscheiden, wurden in der vorliegenden Studie die Vorteile eines Zellkulturmodell genutzt. In der Zellkultur liegen drei wesentliche Vorteile:

- 1) Der Einfluss eines Wirkstoffs (z.B. Phenylephrin) kann unabhängig von anderen Stoffen und in genau definierten Konzentrationen untersucht werden.
- 2) Der Effekt ist unabhängig von hämodynamischen Faktoren ermittelbar.
- 3) Die ermittelte Reaktion kann direkt dem kultivierten Zelltyp zugeordnet werden.

Da die Hypertrophie des Herzmuskels klinisch in der Regel erst im Erwachsenenalter an terminal differenzierten Myozyten auftritt, wurden ausschließlich adulte

Kardiomyozyten als Versuchszellen verwendet. Unter physiologischen Bedingungen ist in diesen Zellen die Bilanz von Proteinsynthese und Proteinabbau ausgeglichen.

### 1.1.3 Katecholamine induzieren Hypertrophie

Die Anpassung des Myokards an einen gesteigerten Arbeitsbedarf wird in vivo von einer vermehrten Aktivierung des Sympathikus und einem daraus resultierenden Anstieg der Plasmaspiegel an Katecholaminen begleitet (Morgan et al., 1991; Bugaisky et al., 1992).

Diese Beobachtungen haben zu der Frage geführt, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen den erhöhten Katecholaminspiegeln und der Herzmuskelvergrößerung besteht. Einen wachstumsfördernden Effekt für  $\alpha$ - aber nicht für  $\beta$ -adrenerge Stimulation konnte in Kurzzeitkulturen (frisch isoliert oder nicht älter als 24 h) für adulte Kardiomyozyten von Ratten nachgewiesen werden (Fuller et al., 1990; Schlüter et al., 1992). In Zellen, die 6 Tage in Anwesenheit von 20% FCS kultiviert wurden (Langzeitkulturen), konnte sowohl durch  $\alpha$ - als auch durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation Hypertrophie erzeugt werden (Volz et al., 1991; Ikeda et al., 1991; Pinson A. et al, 1993).

Schlüter (1998) beschreibt die Effekte adrenerger Hypertrophie-Stimulation an isolierten adulten Rattenkardiomyozyten folgendermaßen:

In Kurzzeitkulturen (max. 24 h Kultivierung unter serumfreien Bedingungen):

- In Gegenwart von  $\alpha$ -Agonisten (Phenylephrin, Noradrenalin) kommt es zu einer Stimulation der Proteinsyntheserate, die mittels der Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin gemessen wurde.
- Die RNA-Syntheserate wird durch  $\alpha$ -Agonisten gesteigert.
- Die spezifische Aktivität der zytosolischen Creatinkinase (Isoform BB) wird durch die Aktivierung der  $\alpha$ -Rezeptoren erhöht. Die Reexpression solcher fötaler Proteine wird für viele Hypertrophiestimulie als charakteristisch angesehen.
- Keinen Hypertrophie-Stimulus stellt im Gegensatz dazu ein  $\beta$ -Agonist (Isoprenalin) dar.

In Langzeitkulturen (6 d Kultivierung in 20 % FCS):

- Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -adrenerge Stimuli können ein Hypertrophiesignal sein. Beide Agonisten steigern den Gesamt-Proteingehalt etwa gleich stark.
- Die Reexpression der Creatinkinase BB lässt sich bei der  $\alpha$ - nicht aber bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation nachweisen.
- Eine Steigerung der RNA-Synthese kann anhand des  $^{14}\text{C}$ -Uridin-Einbau nur für die Induktion der  $\alpha$ -Rezeptoren nachgewiesen werden.
- Der Gesamt-RNA-Gehalt erhöht sich bei beiden Stimuli.

Die Zunahme des RNA-Gehalts bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation kann folgendermaßen erklärt werden: In vivo (Bartolome et al., 1980, 1982) und an isolierten adulten Kardiomyozyten (Schlüter et al., 2000) konnte eine Aktivierung der Ornithindecarboxylase bei Isoprenalin vermittelter Myokardhypertrophie beobachtet werden. Die Ornithindecarboxylase ist das die Geschwindigkeit bestimmende Enzym des Polyaminstoffwechsel. Die Polyamine Spermin und Spermidin tragen aufgrund ihrer positiven Ladungen zur Stabilität von Nukleinsäuren bei. Als Hypothese kann deshalb vermutet werden, dass die  $\beta$ -adrenerg vermittelte RNA-Zunahme auf einer Verlängerung der Halbwertszeit bereits vorliegender RNA erfolgt und nicht, wie beim  $\alpha$ -adrenergen Stimulus durch Neusynthese ribosomaler RNA.

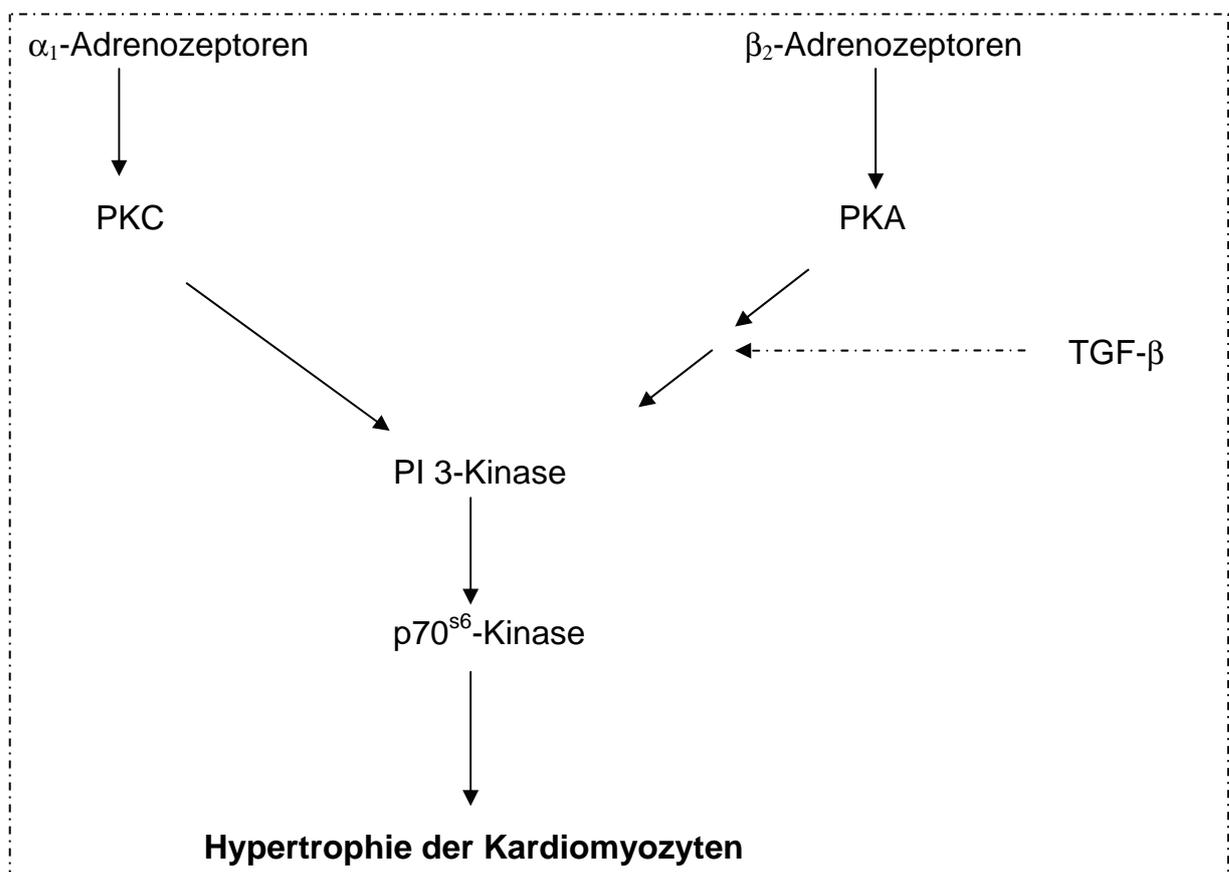
#### 1.1.4 Signaltransduktion bei adrenerg induzierter Hypertrophie

Die Signaltransduktion der  $\alpha$ -agonistischen Katecholaminwirkung auf die myokardiale Proteinsynthese konnte im Zellkulturmodell aufgeklärt werden. Die Stimulation der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren (Pinson et al., 1993) führt über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), PI 3-Kinase sowie der p70<sup>S6</sup>-Kinase zu einer vermehrten Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen (Pönicke et al., 2001)(s.Abb.1.1.4).

Die Signaltransduktion  $\beta$ -adrenerger Hypertrophie lässt sich aufgrund fehlender Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli in Kurzzeitkulturen nur in Langzeitkulturen (20%FCS) untersuchen (Pinson A. et al., 1993). Isoprenalin als  $\beta$ -adrenerger Stimulus aktiviert im Verlauf hypertropher Wachstumsregulation auch die PI 3-Kinase und die p70<sup>S6</sup>-Kinase. Die bei  $\alpha$ -Rezeptor vermittelter Stimulation initial beteiligte Proteinkinase C wird durch  $\beta$ -Rezeptoren nicht aktiviert. Stattdessen wird durch

Isoprenalin die cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Schlüter, 1998; Simm et al., 1998)(s.Abb.1.1.4). Zhou et al. (1996) konnten zeigen, dass die  $\beta$ -adrenerg induzierte Hypertrophie über  $\beta_2$ -Rezeptoren vermittelt wird.

Untersuchungen von Schlüter et al. (1995) zeigen, dass der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , der von Kardiomyozyten freigesetzt wird und im Serum durch Proteasen in seine aktive Form überführt wird (Taimor et al., 1999), ursächlich an der Vermittlung  $\beta$ -adrenerg vermittelter Hypertrophie in Langzeitkulturen beteiligt ist. TGF- $\beta$  bedingt dabei eine Anbindung der Proteinkinase A an die PI 3-Kinase gekoppelte hypertrophe Wachstumsregulation (s.Abb.1.1.4) (Schlüter et al., 1995, Simm et al. 1998).



**Abb.1.1.4: Signaltransduktion  $\alpha$ -und  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten.**

Der  $\alpha$ -adrenerge Stimulus führt über die PKC, PI 3-Kinase und weitere Schritte zum hypertrophen Wachstum. Die über  $\beta_2$ -Rezeptoren induzierte Hypertrophie wird über die PKA in Anwesenheit von TGF- $\beta$  an die Signaltransduktion angekoppelt.

### **1.1.5 Hinweise auf die Beteiligung von AP-1 an der durch Katecholamine induzierten Hypertrophie**

Durch eine Überexpression der dominant negativen Mutanten von c-Jun konnten Omura et al. (2002) die in neonatalen Kardiomyozyten durch Phenylephrin verursachten Anstiege der Hypertrophieparameter, Inkorporation von <sup>3</sup>H-Phenylalanin, Zellgröße, mRNA Expression von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) und brain natriuretischem Peptid (BNP), verhindern.

Da c-Jun ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (ein Dimer aus Bestandteilen der b-ZIP-Superproteinfamilie) sein kann, ist dies ein Hinweis auf eine entscheidende Beteiligung des Faktors AP-1 an der intrazellulären Signaltransduktion bei der durch Katecholamine induzierten Hypertrophie.

Die Rolle von AP-1 wurde in vivo mittels Isoprenalin Abgabe an Ratten untersucht (Takemoto Y. et al., 1999). Die Hypertrophie der Herzmuskelzellen als Antwort auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurde anhand morphologischer Kriterien wie z.B. Wanddicke, Ventrikeldurchmesser usw. gemessen. Die AP-1 Bindungsaktivität zeigte sich bei den mit Isoprenalin behandelten Tieren deutlich gesteigert gegenüber der Kontrollgruppe. Die Korrelation der Herzmuskelzellhypertrophie mit der vermehrten AP-1 Bindungsaktivität in diesen Tieren, gibt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von AP-1 an der hypertrophen Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli, kann sie aber nicht beweisen. Außerdem konnte bei diesem Modell nicht unterschieden werden, ob die festgestellten Effekte indirekt durch die veränderte Hämodynamik oder direkt durch die Stimulation der Kardiomyozyten verursacht wurden.

## **1.2 Myokardiale Apoptose**

### **1.2.1 Physiologie der Apoptose**

Der griechische Begriff „Apoptose“ („απο“gr. - von, aus, ab; „πτωσις“gr.- Senkung) bezeichnet ursprünglich das Abfallen welcher Blätter von einem Baum. Im physiologischen Sinne versteht man unter Apoptose einen programmierten Zelltod,

der einen gezielten Zelluntergang zur Folge hat und einen aktiven Prozess der Zelle selbst darstellt.

Die ursprüngliche Definition der Apoptose bezieht sich auf morphologische Kriterien, die im Zellkern in folgender Reihenfolge ablaufen:

- I. Chromatinkondensation
- II. Kernfragmentation
- III. Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran
- IV. Durch Abschnürung dieser Ausstülpungen bilden sich „apoptotic bodies“ (Ellies et al. 1991)
- V. Schrumpfung der Zelle
- VI. Lösung von ihrem Untergrund

Endonukleasen bewirken die internukleosomale Fragmentierung der DNA (Kerr et al. 1972). Die dabei entstehenden doppelsträngigen DNA-Fragmente weisen eine Länge von 180-200 Basenpaaren (Bp) auf (Wyllie 1980). Anhand von Membranveränderungen wie z.B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran werden die schrumpfenden Zellen und die „apoptotic bodies“ erkannt und phagozytiert. Die sterbenden Zellen pumpen Ionen, vor allem  $K^+$ , nach extrazellulär und kontrahieren ihr Zytoskelett, durch diese Volumenreduktion erleichtern sie den zur Phagozytose fähigen Zellen ihre Aufgabe. Auf diese Weise werden die Zellbestandteile im Organismus wieder recycelt. Der gesamte Ablauf ist zu keiner Zeit mit einer Entzündungsreaktion assoziiert (Kerr et al. 1972).

Eine der Hauptaufgaben der Apoptose liegt in der Beseitigung von geschädigten, infizierten oder transformierten Zellen im Organismus und in der Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen während der Wachstumsphase, sowie der Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen.

Der Organismus ist in vielerlei Hinsicht einerseits auf die Apoptose angewiesen, so kommt es z.B. bei Inaktivierung der Apoptose zu einer unkontrollierten Zellwucherung (Wyllie 1997), ein Überschuss an apoptotischen Zellen andererseits kann zu degenerativen Erkrankungen führen.

### **1.2.2 Apoptose in Herzmuskelzellen**

Zahlreiche Studien belegen das Auftreten von Apoptose in Herzmuskelzellen. So wurden apoptotische Kardiomyozyten in Autopsiematerial von Patienten mit der Diagnose Kardiomyopathie (Narula et al. 1996) und bei Status nach Herzinfarkt (Saraste et al. 1997) gefunden. Diese Befunde konnten in vivo an Ratten nach Myokardinfarkt (Kajstura et al. 1996) und Ischämie/Reperfusion (Fliss et Gattinger 1996) bestätigt werden.

### **1.2.3 Stickstoffmonoxid induziert AP-1 abhängige Apoptose**

Die Auswirkungen des Stickstoffmonoxid (NO) hängen von der lokalen Konzentration und der zellulären Umgebung ab (Gonzales-Zulueta 1997). NO kann seine Wirkung sowohl über die von zyklischem-Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP)-abhängige Signaltransduktion durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase als auch über das DNA-schädigende Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) vermitteln.

In vivo Studien geben Hinweise auf die Beteiligung von NO an der Apoptoseinduktion nach Ischämie/Reperfusion. In adulten Kardiomyozyten von Kaninchen konnte 48 h nach Ischämie/Reperfusion eine durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) verstärkte Bildung von NO festgestellt werden (Wildhirt et al., 1999). Ein signifikanter Anstieg der iNOS konnte auch nach experimentellem Koronarverschluss bei adulten Kaninchen gemessen werden (Suzuki et al., 1996). Wildhirt et al. (1995) zeigten, dass es durch infiltrierende Makrophagen zu einer vermehrten iNOS-Expression nach Myokardinfarkt kommt. Parallel zur erhöhten iNOS-Konzentration konnte ein Ansteigen der Apoptoserate beobachtet werden.

Apoptose konnte durch NO-Donoren wie (±)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) oder GSNO an isolierten adulten Kardiomyozyten ausgelöst werden (Taimor et al. 1999; Andreka et al. 2001). Dies zeigt, dass die erhöhten NO-Konzentrationen nach einem Infarkt zur Apoptoseinduktion im reperfundierten Herzen beitragen können. Des Weiteren bewiesen Taimor et al. (2000) die cGMP-Abhängigkeit dieser Apoptoseinduktion. In weiteren Studien wurde eine notwendige Beteiligung der „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) und „c-Jun-N-terminal kinase“ (JNK), beides Mitglieder der MAPK-Familie, für die Apoptose-Induktion unter NO

nachgewiesen (Taimor et al., 2001). Die Aktivierung dieser beiden Kinasen ist für die Aktivierung des Transkriptions-Aktivator Proteins (AP-1) notwendig.

Die zentrale Rolle von AP-1 wurde durch Abfangen der AP-1-Bindungsaktivität mittels CRE-Decoy-Oligonukleotiden gezeigt. Dies reduzierte die durch SNAP induzierte Apoptoserate deutlich (Taimor et al. 2001). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 einen bedeutenden Anteil an der intrazellulären Signalkaskade der NO induzierten Apoptose darstellt.

### **1.3 Beteiligung von AP-1 an Apoptose und Hypertrophie**

Der Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt Apoptose (s.1.2.3) in Kardiomyozyten und scheint auch an der Hypertrophie dieser Zellen beteiligt zu sein (s. 1.1.5). Diese Tatsache deutet auf die zentrale Rolle von AP-1 in zwei wichtigen Prozessen, die im kranken Herzen stattfinden, hin.

Es gibt im Körper auch andere Beispiele für unterschiedliche Prozesse, die durch AP-1 vermittelt werden. So lässt sich der AP-1 Komplex unter physiologischen Bedingungen im Zentralen Nervensystem (ZNS) nachweisen (Takeuchi et al. 1993, Kaminska et al. 1995, 1996, Francois-Bellan et al. 1999, Herdegen and Leah 1999). Die Regenerations- und Überlebensfähigkeit korreliert in Neuronen mit der Expression von c-Jun, einem Baustein des AP-1-Dimers (Herdegen et al. 1997). Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein ansteigender Level von c-Jun und eine Induktion von AP-1 mit der Apoptose im ZNS in vivo einhergeht (Sonnenberg et al. 1989, Pennypacker et al. 1993, Kaminska et al. 1994, Dragunow et al. 1995, Kasof et al. 1995, Pennypacker 1998, Huges et al. 1999). Diese Korrelation wurde ebenso an PC 12 Zellen (Neurone des Sympathikus) gezeigt und es gelang, die Zellen durch Expression dominantnegativer c-Jun Mutanten oder durch Mikroinjektion von c-Jun Antikörpern vor Apoptose zu schützen (Estus et al. 1994, Ham et al. 1995).

Für die verschiedenen Auswirkungen der AP-1-Aktivierung auf Apoptose und Hypertrophie im Herzen könnten sowohl andere mit AP-1 interagierende

Transkriptionsfaktoren als auch Variationen in der Komposition des AP-1 Komplexes (s. unten) verantwortlich sein.

Schneiders et al. (2005) konnten zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren AP-1/SMAD(SMAD3/4) eine gemeinsame Signalkaskade bei der NO induzierten Apoptose darstellen. Im Gegensatz dazu sind SMAD Proteine nicht notwendig für die durch AP-1 vermittelte Hypertrophie. Diese Resultate lassen die SMAD Proteine als mögliche Signale erscheinen, welche die Auswirkungen des AP-1 Signals von Hypertrophie zur Apoptose schieben.

Weiteren Einfluss auf die Wirkung von AP-1 könnte auch seine Zusammensetzung haben. Denn das Transkriptions-Aktivator Protein AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der nicht aus einem einzelnen Protein besteht, sondern aus zwei Untereinheiten, demnach ist es ein Dimer. Die Bestandteile des AP-1 rekrutieren sich hauptsächlich aus Mitgliedern der b-ZIP-Super-Proteinfamilie (Jun, Fos, Maf, Nrl). Viele Studien haben in den letzten Jahren eine Aktivierung unterschiedlicher AP-1 Komplexe durch eine große Anzahl von verschiedenen Stimuli z.B. Wachstumsfaktoren, Antigen Bindung durch B- und T- Lymphozyten, Neurotransmitter, zellulärem Stress, Ionisierung, ultraviolette Bestrahlung, Cytoskelettveränderungen und diversen Cytokinen nachgewiesen (Angel and Karin 1991, Curran and Morgan 1995, Kaczmarek and Chaudhuri 1997, Herdegen and Leah 1999, Kasibhatla et al. 1998).

Die molekulare Zusammensetzung des AP-1 ist heterogen. Es kann als Homo- oder als Heterodimer aus der b-ZIP-Super-Proteinfamilie gebildet werden. Unterschiedliche Heterodimere regulieren die Expression von verschiedenen Target-Genen (Hiroi et al. 1998, Angel and Karin 1991, Morgan and Curran 1995).

Die b-ZIP-Super-Proteinfamilie besteht aus den Proteinfamilien Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB,  $\Delta$ FosB, Fra1, Fra2), Maf (v-Maf, c-Maf, MafB, MafG, MafK, MafF) und Nrl (Nrl, Nrf1, Nrf2). Jun-Proteine können im Unterschied zu Fos-Proteinen Homo- und Heterodimere bilden, Fos-Proteine bilden nur Heterodimere. Fos- und Jun- Proteine sind zusätzlich dazu in der Lage, Heterodimere mit Maf- oder mit Nrl-Proteinen zu bilden (Kaminiska et al. 2000; Kataoka et al. 1994). Die verschiedenen AP-1 Komplexe binden mit unterschiedlicher Affinität an TRE-ähnliche Promotorsequenzen. Ihre Wirkungen können transkriptionaktivierend oder – hemmend sein. Yoshika et al. (1995) zeigten, dass Fra/Jun Dimere zwar bindungs-, aber nicht transkriptionsaktiv sind.

Neben der Dimerisierung der bZIP-Super-Proteine gibt es noch eine weitere Klasse von Proteinen, die durch Dimerisierung von Jun und ATF entsteht (Van Dam et al. 1995). Auch die Jun/ATF-Dimere unterscheiden sich in ihrer Affinität zu verschiedenen Promotersequenzen, so binden sie bevorzugt an cAMP-responsive Elemente (CRE). Unter der Einwirkung von zellulärem Stress ist häufig ATF induziert, während c-Jun stärker durch Phorbol ester reguliert wird (van Dam et al., 1995). Durch die Herstellung von Mutanten, die sich nur auf einen Bindungspartner beschränken, konnte ein funktioneller Unterschied der verschiedenen AP-1 Dimere in der Onkogenese nachgewiesen werden (van Dam et al., 2001).

In Bezug auf die Wirkung von AP-1 an Herzmuskelzellen ist offen, ob AP-1 an  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie in Kardiomyozyten essentiell beteiligt ist und falls ja, ob neben den mit AP-1 interagierenden Transkriptionsfaktoren, die Dimer Zusammensetzung von AP-1 die unterschiedlichen Effekte von AP-1 als Hypertrophie- und Apoptose-Stimulus erklären kann.

## 1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde an isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten auf zellulärer Ebene die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der Hypertrophie und Apoptose untersucht.

Ziel der Untersuchungen war es,

1. nach  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine Hypertrophie der Zellen zu erzeugen.
2. in den hypertrophierten Zellen eine erhöhte Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 nachzuweisen.
3. durch Abfangen des AP-1 Komplexes seine Wichtigkeit für die adrenerg induzierte Hypertrophie zu beweisen.
4. die Komposition des AP-1 Komplexes unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu analysieren.
5. die Komposition des AP-1 Komplexes unter NO induzierter Apoptose zu bestimmen.
6. zu untersuchen, inwiefern sich die AP-1 Komplexe bei Hypertrophie und Apoptose unterscheiden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammonium-Persulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cy3-dcTP-Farbstoff	Amersham Bioscience, Freiburg
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Fetal calve serum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
$\gamma^{32}$ P-ATP	Amersham, Braunschweig
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
L-(U <sup>14</sup> C)-Phenylalanin	Amersham, Mannheim
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
poly-(dIdC)	Roche Diagnostics, Mannheim

Sephadex-G50	Calbiochem, Bad Soden
Shrimps alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
SNAP	Calbiochem, Bad Soden
Szintillationslösung: Ultima Gold®	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, Sankt Leon-Rot
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Terminale Transferase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle übrigen Chemikalien wurden in der höchsten, bei den Firmen Calbiochem (Bad Soden), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) erhältlichen Qualität bezogen und verwendet. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde Aqua demin. als Lösungsmittel verwendet, falls nichts anderes angegeben wurde.

## 2.2 Antikörper

Jun	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fos	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Jun	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
JunB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
JunD	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Fos	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FosB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fra1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

## 2.3 Decoy-Oligonukleotide

CRE	Invitrogen, Karlsruhe
SCR	Invitrogen, Karlsruhe
TRE	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Allgemein verwendete Geräte

Anlage zur Herstellung von Aqua d. Flüssig-Szintillationszähler	Millipore, Eschborn Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Glasware	Schott, Mainz
Hoefler-Glasplatte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefler-Spacer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefler-Kamm	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefler-Plattenklemme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnet-Heizrührer	Jahnke&Kunkel, Staufen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Phosphor-Imager	Molecular Dynamics, Krefeld
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Krefeld
Vortexer (Schüttler)	Heidolph, Kelheim
Wasserbad (Typ: Julobo U3)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Zentrifugenröhrchen	Kendro, Hanau
Fluoreszenzmikroskop, IX 70	Olympus, Hamburg

## 2.5 Spezielle Geräte

### 2.5.1 Zellkultur

Brutschrank (Typ: Cytoperm)	Kendro, Hanau
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten

Langendorff-Apparatur	Universität Göttingen
Mikroskop (Typ: TMS-F)	Nikon, Düsseldorf
Nylonnetz (Porengröße 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Sterilbank (Typ: Lamin Air <sup>®</sup> HBB 2472)	Kendro, Hanau

### 2.5.2 Retardation Assay

Fluoreszenz-Molecular-Imager	BioRad, München
Glasmörser	B. Braun; Melsungen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefer-Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid

### 2.5.3 EDV

Corel Photo Paint <sup>®</sup>	Corel Inc., USA
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Excel 2000 <sup>®</sup>	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows ME <sup>®</sup>	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2000 <sup>®</sup>	Microsoft Corp., USA
Analysis <sup>®</sup>	SIS
SPSS <sup>®</sup> (Version 11.5.1)	SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA

### 2.6 Verbrauchsmaterialien

Frischhaltefolie	Aldi-Süd, Mülheim
Kulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen

Szintillationsgefäße  
Zellschaber

Canberra-Packard, Frankfurt am Main  
Becton Dickinson, Heidelberg

### 3 Methoden

#### 3.1 Präparation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten (Piper et al., 1982)

##### 3.1.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus 3-4 Monate alten männlichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 300-400 g isoliert. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie wurden im institutseigenen Tierstall aufgezogen und bekamen Trinkwasser und Altromin<sup>®</sup>-Standardfutter ad libitum.

##### 3.1.2 Verwendete Lösungen

###### Kalzium-Stammlösung

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
-------------------	--------

###### Powell-Medium (Carbogen begast)

NaCl	110 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Glucose	11 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,2 mM

###### Kollagenase-Puffer

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 ng
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

### 3.1.3 Durchführung

Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde zu Beginn mit Powell-Medium gespült, luftblasenfrei mit 80 ml des gleichen Mediums befüllt und auf 37°C erwärmt. Während der gesamten Präparation wurde das Powell-Medium, um den pH-Wert konstant zu halten, mit Carbogen begast.

Nach kurzer Diethylethernarkose (ca. 1-2 Minuten) wurde den Ratten durch einen kräftigen Zug das Rückenmark durchtrennt, danach der Thorax eröffnet, das Zwerchfell entfernt, Lunge und Herz entnommen und in eine bereitstehende Petrischale mit Kochsalzlösung (4°C, 0,9%ig) gelegt. Dort wurde das dem Herzen noch anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt und die Aorta ascendens freipräpariert, um das Herz anschließend mit der Aorta an die Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur anzuhängen.

Das angehängte Herz wurde zuerst mit 40 ml Powell-Medium blutfrei gespült und danach mit 50 ml Kollagenase-Puffer für 25 min rezirkulierend, retrograd mit einer Flussrate von ca. 1 Tropfen/s perfundiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Aorta und die Vorhöfe vom Herzen entfernt und das Ventrikelgewebe mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Der so entstandene Gewebebrei wurde anschließend für 5 min in 30 ml Kollagenase-Puffer bei 37°C und ständiger Carbogen-Begasung nachverdaut. Dabei wurde er mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um die Trennung in Einzelzellen zu unterstützen.

Die so gewonnene Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und zentrifugiert (3 min, 25 x g). Anschließend wurde der Überstand von Kollagenase-Puffer, der noch kleinere Zellen und Zelltrümmer enthielt, abgesaugt. Die im Pellet enthaltenen Kardiomyozyten wurden in Powell-Medium, das zusätzlich 200 µM CaCl<sub>2</sub> enthielt, aufgenommen. Dadurch gewöhnten sich die Herzmuskelzellen langsam an das Kalzium. Nach nochmaliger Zentrifugation (25 x g, 2 min) und Überstandabsaugung wurde das Pellet erneut in Powell-Medium mit einem gesteigertem CaCl<sub>2</sub> Anteil von 400 µM aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt.

Diese Suspension wurde auf eine Flüssigkeitssäule (ca.10 cm hoch, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung) in Reagenzgläsern geschichtet. Ihre Anzahl richtete sich nach der Zahl der präparierten Herzen (pro Herz 1 Reagenzglas). Nach letztmaliger Zentrifugation (25 x g, 1 min) und Absaugen des Überstandes erhielt man eine Zellpopulation, die zu 40-60 % aus intakten, stäbchenförmigen Zellen bestand.

### 3.2 Zellkultur von isolierten Kardiomyozyten

#### 3.2.1 Verwendete Media

##### M199/4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin (HEPES) (sterilfiltriert, pH 7,4)

Medium199/Earl's Salts	9, 8 g/l
HEPES	15 mM

##### CCT-Medium (sterilfiltriert, pH 7,4)

M199/HEPES	x ml
Creatin	5 mM
Taurin	5 mM
Carnitin	2 mM
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 μM

##### Vorinkubationsmedium

CCT-Medium	x ml
Fetal calve serum (FCS)	4 %
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 μg/ml

##### CCT-Kulturmedium

CCT-Medium	x ml
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 μg/ml

### 10 x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	150mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	4mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	16mM

Auf pH 7,3 titriert

### **3.2.2 Vor- und Ausplattierung**

Um ein Anheften der Kardiomyozyten an die Kulturschalen zu ermöglichen, wurden die Schalen für mindestens 4 h bei 37°C mit Vorinkubationsmedium beschichtet. Das Vorinkubationsmedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen abgesaugt.

Die isolierten adulten Kardiomyozyten wurden in CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer Dichte von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die Kulturschalen vom Typ Falcon 3004 wurden mit je 2 ml und die Kulturschalen vom Typ Falcon 3001 mit je 1 ml der Zell-Suspension gefüllt. Dabei lag der Anteil der stäbchenförmigen und damit lebendigen Zellen auf der Schale bei 40-60 %.

### **3.2.3 Kurzzeitkultivierung**

Zum Anheften der intakten Zellen auf dem Boden der Kulturschalen wurden diese für 2-4 h bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-freien Bedingungen inkubiert und anschließend zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Dadurch wurden Zelltrümmer und nicht angeheftete Zellen entfernt. Auf die Schalen Falcon 3004 wurden je 2 ml und auf die Falcon 3001 je 1 ml Medium als Endvolumen gegeben.

So lag der Anteil von lebenden Zellen anschließend bei ca. 90 %. Diese konnten nun zu nachfolgenden Versuchen verwendet werden.

### **3.2.4 Langzeitkultivierung**

Nach einer Anheftungsphase von 2-4 h wurden die Langzeitkulturen mit CCT-Kulturmedium gewaschen und für weitere 6 Tage mit einem CCT-Kulturmedium

inkubiert, das zusätzlich 20% fötales Kälberserum (vol / vol) enthielt. Innerhalb dieser Zeit war kein weiterer Wechsel des Mediums notwendig.

Die Morphologie der Kardiomyozyten wandelte sich während der Serumkultivierung zu einer polygonalen, flächig ausgebreiteten Struktur, in der die Myofibrillen nicht mehr parallel angeordnet waren.

Vor Beginn der Versuche wurden die Zellen mit serumfreiem CCT-Kulturmedium versetzt.

### 3.2.5 Transformation mittels Decoy-Oligonukleotiden

#### Decoy-Oligonukleotide

CRE	5'- <u>TGACGTCATGACGTCATGACGTCA</u> -3'
scrambeled	5'-TGACGATCTGCAGTACAGTCGTCA-3'

Die Sequenz des CRE-Decoy-Oligonukleotides ist der Literatur entnommen (Park et al. 1999). Die vier endständigen Basen der Oligonukleotide waren, um die Stabilität der Oligos gegen intrazelluläre Exonukleasen zu erhöhen, mit Phosphothioestern versehen.

Das CRE-Decoy-Oligonukleotid hat eine palindrome Sequenz, die durch Selbst-Hybridisierung die AP-1 Bindungsstelle formt. Dadurch wurde eine Konsensus-Bindungssequenz des CRE-Decoy-Oligonucleotids für den Transkriptionfaktor AP-1 gebildet. Das CRE-Decoy-Oligonukleotid ist mit dieser Konsensus-Bindungssequenz in der Lage, den Transkriptionfaktor AP-1 spezifisch zu binden und damit intrazellulär abzufangen. Auf diese Weise wird die Bindung des AP-1 an seine spezifische Bindungssequenz auf der DNA in der Zelle vermindert.

Zur Transformation der Zellen wurden die Oligonukleotide (500 nM), jeweils direkt nach dem Waschen der Zellen mit CCT-Kulturmedium, in das Medium gegeben und über 5 h im Brutschrank bei 37°C, ca. 95 % Luftfeuchtigkeit und unter normoxen Bedingungen inkubiert.

Als Kontrolle wurden entsprechende scrambled Decoy-Oligonukleotide (SCR) verwendet, die keine AP-1 Bindungsstelle enthalten.

### 3.2.6 Stimulation und Ernte der Zellen

Nach dem Waschen mit CCT-Kulturmedium (3.2.3/3.2.4) und einer ca. zehnminütigen Ruhephase wurden die Kardiomyozyten entsprechend der jeweiligen Versuchsvorschriften behandelt.

Zur Hypertrophie-Stimulation wurden die Zellen der Kurzzeitkultur mit dem  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (10  $\mu$ M) und die der Langzeitkultur mit dem  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin (1  $\mu$ M) induziert. Zur Apoptose-Stimulation wurden sie mit dem NO-Donor ( $\pm$ )-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) (100  $\mu$ M) induziert. Nach der Induktion wurden die Stoffe durch leichtes Schwenken im Medium verteilt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet.

Anschließend wurden alle Schalen im Brutschrank bei 37°C, ca. 95 % Luftfeuchtigkeit und unter normoxen Bedingungen inkubiert. Die zugegebenen Substanzen wurden auf den Schalen belassen.

Zur Gewinnung von Kernextrakten (2-4 Schalen pro Versuchsbedingung) wurden die Zellen nach ansteigenden Inkubationszeiten (0,5, 1, 2, 4h) vom Schalenboden abgeschabt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation (2.000 x g, 3 min) sedimentierten die Zellen und der Überstand konnte abgesaugt werden. Nach der Resuspension in 1 ml 1 x Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und der Überführung in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß wurde erneut zentrifugiert (2.500 x g, 3 min) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde entweder bei -80°C tief gefroren oder sofort zur Kernextraktion verwendet.

## 3.3 Kernextraktion

### 3.3.1 Verwendete Puffer

#### 10 x Schwellungspuffer

Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)/HCl (pH 7,9)	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Dithiothreitol (DTT) (1:500)	1 mM

### 10 x Homogenisierungspuffer

Saccharose	300 mM
Tris/HCl (pH 7,9)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
DTT (1:500)	1 mM
Triton X-100	0,3 % (wt/vol)

### 10 x Storagepuffer

NaCl	300 mM
KCl	50 mM
HEPES (pH 7,5)	10 mM
DTT (1:500)	1 mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (1:100)	1 mM
Glycerol	20 % (wt/vol)

### **3.3.2 Versuchsablauf**

Das in der Zellernte aus 4 (2) Schalen erworbene Pellet wurde mit 800 (400) µl 1 x Schwellungspuffer versetzt, durch mehrmaliges Vortexen vollständig suspendiert und für 30 min auf Eis gestellt, bevor es bei 4°C für 10 min mit 900 x g zentrifugiert wurde. Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Zu dem verbliebenem Pellet wurden 800 (400) µl 1 x Homogenisierungspuffer gegeben. Dieses Gemisch wurde durch mehrmaliges Vortexen vollständig in Lösung gebracht und anschließend für 5-10 min auf Eis gestellt. Diese Suspension wurde im Anschluss mit acht Stößen in einem Glasmörser homogenisiert und bei 4°C für 10 min mit 900 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 80 (40) µl Storagepuffer aufgenommen, vollständig aufgelöst und für 30 min auf Eis gestellt. In den 30 min wurden die Ansätze alle 5 min geschüttelt. Die nicht benötigten restlichen Zellbestandteile wurden danach durch Zentrifugation mit 13.000 x g für 5 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand mit den darin enthaltenen Kernextrakten konnte entweder sofort oder nach Lagerung bei -80°C weiterverwendet werden.

### 3.4 Retardation Assay

#### 3.4.1 Radioaktive 5'-Endmarkierung

TRE Oligonukleotide mit der für AP-1 spezifischen Bindungsdomäne (5'-CATCCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') wurden radioaktiv markiert. Die Oligonukleotide wurden kommerziell erworben.

Zur Hybridisierung der beiden komplementären Oligonukleotidstränge wurden äquimolare Mengen miteinander versetzt, diese in TE-Puffer (Tris/HCl/EDTA) gelöst und im Techne-Cycler auf 95°C erhitzt. Danach wurde das Oligonukleotid über mehrere Stunden wieder langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei durchliefen die Oligonukleotide ihre Schmelz- und Hybridisierungstemperatur und fanden sich zu einem Doppelstrang zusammen. Dadurch bildete sich eine funktionelle AP-1 Bindungsstelle aus.

##### Reaktionsgemisch 1

Shrimps alkalische Phosphatase (4U/μl)	0,5 μl
10 x Puffer (Tris/HCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM; pH 8,0)	2,0 μl
Oligonukleotide (1:100)	4,0 μl
Aqua bidest.	13,5 μl

##### Reaktionsgemisch 2

T4-Polynukleotidkinase (10U/μl)	1,0 μl
Tris/HCL (1M, pH 8, 0)	0,5 μl
γ <sup>32</sup> P-ATP (7000 Ci/mM)	2,0 μl

Um die Oligonukleotide zu dephosphorylieren, wurden das Reaktionsgemisch 1 angesetzt und über 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei 65°C.

Zur radioaktiven Markierung wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase die gammaständige Phosphatgruppe von γ<sup>32</sup>P-ATP auf die 5'OH-Gruppe des dephosphorylierten DNA-Oligonukleotides übertragen. Dazu wurde dem Reaktionsansatz das Reaktionsgemisch 2 beigefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Das radioaktiv markierte Oligonukleotid konnte nun im RA-Assay sichtbar gemacht werden.

Um freie, nicht gebundene Nukleotide von den radioaktivmarkierten Oligonukleotiden abzutrennen, wurde der Markierungsansatz einer Gelfiltration (vgl. 3.4.3) unterzogen.

### 3.4.2 Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide

Es wurde folgendes Oligonukleotid mittels Fluoreszenz markiert:

TRE            5'-CATCCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'

Komplementäre Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert (vgl. 3.4.1) und nach folgendem Ansatz fluoreszenzmarkiert:

TRE-Oligonukleotide (10µM)	1,0 µl
10 x NEPuffer	5,0 µl
CoCl <sub>2</sub> (2,5mM)	5,0 µl
Cy3-dCTP-Farbstoff (10mM)	2,5 µl
Terminale Transferase (20U/µl)	0,5 µl
Aqua bidest	36 µl

Anschließend wurde der Ansatz inkubiert (15 min, 37°C) und die Reaktion mit 10 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,3 M; pH 8,0) abgestoppt. Während dieser Zeit hängt die Terminale Transferase die fluoreszenzmarkierten d NTPs an das 3'-Ende der Oligos an. Diese Oligonukleotide konnten nun durch die Fluoreszenzmarkierung im Retardation Assay sichtbar gemacht werden.

Um freie, nicht gebundene Nukleotide von den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden abzutrennen, wurde der Markierungsansatz einer Gelfiltration (vgl. 3.4.3) unterzogen.

### 3.4.3 G50-Sephadex-Schleudersäule (Gelfiltration)

G50-Sephadex hält unter den angegebenen Bedingungen freie Nukleotide zurück, während Oligonukleotidfragmente mit mehr als 20 bp ungehindert passieren können. Auf diese Weise können nicht gebundene Nukleotide von den markierten Oligonukleotiden getrennt werden.

Herstellung einer Schleudersäule:

Zunächst wurde das Sephadex mit TE-Puffer aufgeschwemmt und für ca. 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Der Kolben einer Insulinspritze wurde mit Glaswolle abgedichtet und mit dem Säulenmaterial (G50-Sephadex) befüllt. Zur Verdichtung des Säulenmaterials wurde die Spritze dreimal zentrifugiert (3.500 x g über 15 min). Dabei wurde nach jeder Zentrifugation mit G50-Sephadex nachgefüllt. Die fertige Schleudersäule musste randvoll mit Sephadex gefüllt sein.

Im Anschluss wurde der Markierungsansatz auf die Säule aufgetragen und mit 50 µl aqua bidest. nachgespült. Die Säule wurde für 30 min bei 3.500 x g zentrifugiert. Das aus der Spritze ausgetretene Eluat wurde aufgefangen und dessen Aktivität im Szintillationszähler bestimmt (siehe unten).

### 3.4.4 Quantitative Bestimmung der Inkorporation von $\gamma^{32}\text{P-ATP}$

Um die Markierungseffizienz des radioaktiven Eluats der Schleudersäule zu bestimmen, wurde 1 µl des Eluats mit 4 ml Szintillationslösung gemischt und im Beckmann-Szintillationszähler analysiert. Verwendet wurde ein spezielles  $^{32}\text{P}$ -Analysenprotokoll, das die Impulsrate pro Zeiteinheit in „counts per minute“ (cpm) ermittelte.

### 3.4.5 Spezifische Bindung der Oligonukleotide an das Protein

Bindungspuffer (TXN):

Glycerin	10 % (vol/vol)
Tris/HCl	20 mM
KCl	5 mM

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	3 mM
PMSF	0,2 mM

10 µl der in 3.3 extrahierten Kernextrakte wurden mit 4,5 µl Bindungspuffer (TXN) und 0,5 µl unspezifischer DNA (poly-(dIdC); 1µg/µl) versetzt und inkubiert (15 min, 30°). Dadurch konnten unspezifisch DNA-bindende Proteine abgefangen werden.

Dieser Reaktionsansatz wurde nach Zugabe des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidfragments (1µl) bzw. des radioaktiv markierten Oligonukleotidfragments (Volumen = Impulsrate von 20000 cpm/Probe) erneut inkubiert (30 min, 30°C). In dieser Zeit konnte AP-1 spezifisch an das markierte Oligonukleotid binden.

### 3.4.6 Gelelektrophorese

Diese Methode beruht auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität eines Protein-Nukleotid-Komplexes im Vergleich zu einem proteinfreien, markierten DNA-Fragment bzw. Oligonukleotides.

Für die Gelelektrophorese wurden folgende Lösungen verwendet:

#### Retardation-Gel-Lösung

Aqua bidest.	35 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (79 g+ 1 g auf 100 ml)	4 ml
Glycerin	1 ml
10 x RA-Puffer	400 µl
Ammonium-Persulfat 10 % (wt/vol)	300 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	34 µl

#### 100 x RA-Puffer, pH 7,9

Tris/HCl	670 mmol/l
Natriumacetat	330 mmol/l
EDTA	100 mmol/l

### Gefärbter 10 x Tris-acetat/EDTA (TAE)-Puffer

Tris-acetat	40 mM
EDTA	1 mM
Bromphenolblau	1 % (vol/vol)
Saccharose	50%

Nach dem Reinigen und Entfetten zweier Glasplatten mit Spülmittel und Alkohol (100%) wurde eine der Platten auf der Innenseite mit Acrylase behandelt. Zwischen die Platten wurden eine Schablone (ungefähre Größe des späteren Gels) und zwei Spacer als Abstandhalter bzw. seitliche Begrenzungen des Zwischenraumes (Gels) eingefügt und mittels 2 Reihen von Schraubzwingen unter Druck gesetzt. Diese Konstruktion wurde, um sie nach unten abzudichten, in einen Gelgießstand eingespannt.

Anschließend wurde die frisch angesetzte Retardation-Gel-Lösung luftblasenfrei in den Raum zwischen die beiden Platten gegossen und von oben ein Kamm in das noch nicht auspolymerisierte Gel geschoben, um Taschen für das spätere Einbringen des Reaktionsansatzes zu erhalten. Das Gel brauchte bei Raumtemperatur etwa 30 min, um auszupolymerisieren.

Danach wurde der Kamm entfernt, die Glasplatten aus dem Gelgießstand gelöst und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Boden und Deckel der Kammer wurden mit 1 X RA-Puffer luftblasenfrei gefüllt und die Taschen mit RA-Puffer durchgespült. Nach einem Vorlauf (30 min, 60 V, 4°C), um die Moleküle im Gel auszurichten, und nochmaligem Ausspülen der Taschen wurden diese mit den jeweiligen Reaktionsansätzen und einem Laufstreckenindikator (gefärbter TAE-Puffer, 1 µl) beladen, bevor die eigentliche Elektrophorese (120 min, 150 V, 4°C) erfolgte.

Das mit den radioaktiv markierten Reaktionsansätzen beladene Gel wurde im Anschluss an die Elektrophorese vorsichtig aus den Glasplatten gelöst, auf ein Filterpapier aufgebracht und bei 90°C getrocknet. Danach wurde es mit Frischhaltefolie luftdicht verschlossen, auf einen Storage Phosphor Screen gelegt und dort über mehrere Tage exponiert. Das Screening-Signal wurde mit dem Phosphor Imager gescannt und mit der Quantity One Software densitometrisch ausgewertet.

Das mit den fluoreszenzmarkierten Reaktionsansätzen beladene Gel konnte gleich im Anschluss an die Elektrophorese im Fluoreszenz Imager gescannt und mit der Quantity One Software densitometrisch ausgewertet werden.

### 3.4.7 Supershift Assay

Die Kernextrakte wurden nach der Bindung der spezifischen Proteine (vgl.3.4.5) mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert (30 min, 30°C). Folgende Antikörper wurden verwendet:

#### Antikörper (1:10 verdünnt mit TXN)

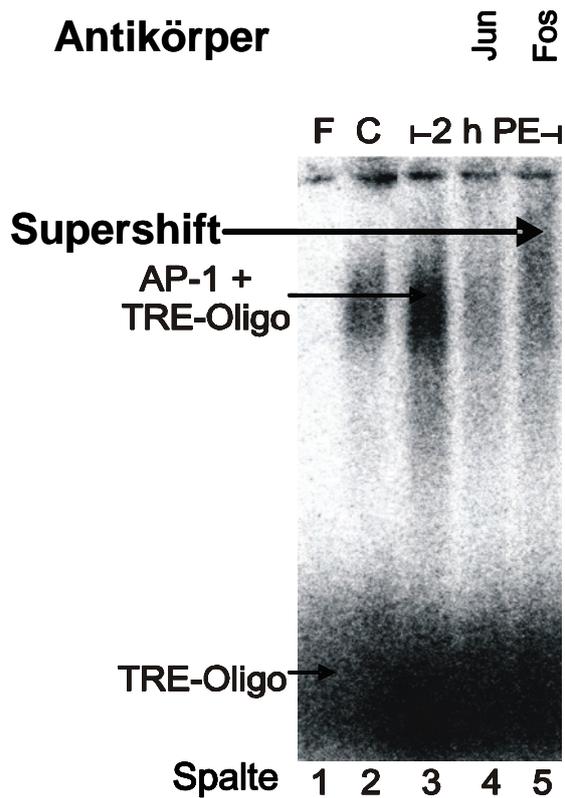
Allgemeine:

Jun	2,5µl
Fos	2,5µl

Spezielle:

c-Jun	2,5 µl
JunB	2,5 µl
JunD	2,5 µl
c-Fos	2,5 µl
FosB	2,5 µl
Fra1	2,5 µl

Wenn o. g. Antikörper ein spezifisches Protein in dem DNA-Protein-Komplex (TRE-Oligonukleotid-AP-1) erkannten, reduzierten sie den in der Gelelektrophorese nachweisbaren Shift (s. Abb. 3.4.7. Spalte 3). Die Reduktion eines Shifts kann durch zwei unterschiedliche Vorgänge erfolgen. Zum einen entstehen durch die Anbindung des Antikörpers Komplexe, die aufgrund ihrer Größenzunahme in der Gelelektrophorese eine geringere Laufstrecke zurücklegen und so einen Supershift erzeugen (Spalte 5), zum anderen kann es durch den Antikörper zu einer Störung der Bindung zwischen TRE-Oligonukleotid und Ap-1 kommen, so dass nur wenige Komplexe entstehen und dadurch der Shift deutlich reduziert wird (Spalte 4).



**Abb.3.4.7: Retardation Gel nach PE-Stimulation und Zugabe von spezifischen Antikörpern.**

Nicht gebundene TRE-Oligonukleotide laufen im Gel am schnellsten und somit am weitesten (TRE-Oligo). An AP-1 gebundene TRE-Oligonukleotide laufen langsamer, was sich an einem verstärkten Shift zeigt (AP-1+TRE-Oligo Shift, Spalte 2 und 3). Durch die Antikörpergabe kann der Shift reduziert werden (Spalte 4) oder ein Supershift entstehen (Spalte 5).

### 3.5 Proteinsynthesemessung mittels Inkorporation von (<sup>14</sup>C)-Phenylalanin

Inkorporationsmedium (Proteinsynthese):

CCT-Kulturmedium	x ml
L-(U <sup>14</sup> C)-Phenylalanin	0,1 µCi/ml
Ascorbinsäure	100µM

Die Zellen wurden in 1 ml Inkorporationsmedium (bezogen auf Kulturschalen vom Typ Falcon 3001) durch Zugabe von Phenylephrin (10  $\mu$ M) bzw. Isoprenalin (1 $\mu$ M) induziert und im Brutschrank inkubiert (24h, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit).

Die Aminosäure Phenylalanin dient fast ausschließlich der Proteinsynthese, sie wird nicht von Kardiomyozyten metabolisiert (Morgan et al., 1971). Deshalb eignet sich die Inkorporation von radioaktivem Phenylalanin zur Quantifizierung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten. Um eine gleichmäßige zelluläre Verfügbarkeit des Phenylalanins zu gewährleisten, enthielt das Inkorporationsmedium einen Überschuss (0,3 mM) an nicht markiertem Phenylalanin.

Die Inkorporation wurde durch die Entfernung des Inkorporationsmediums und dreimaliges Waschen der Kulturen mit eiskaltem PBS beendet. Die Proteinfraction der Kulturen wurde mit 1 ml TCA (wt/ vol) bei 4° C über Nacht gefällt.

Um zu überprüfen, ob die zelluläre Aufnahme und Verfügbarkeit von (<sup>14</sup>C)-Phenylalanin in allen untersuchten Versuchsbedingungen äquivalent war, wurde das Vorkommen der markierten Aminosäure im Bestand der zur Proteinsynthese benötigten Vorläufermoleküle (Precursor-Pool) radioaktiv nachgewiesen. Der Precursor-Pool entspricht derjenigen Phenylalanin-Fraktion, die zwar von den Kardiomyozyten aufgenommen, nicht aber in Proteine umgesetzt wurde. Zur radioaktiven Quantifizierung des Precursor-Pools wurden 500  $\mu$ l der zur Proteinfällung verwendeten TCA-Lösung mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Zerfallsereignisse pro Minute (dpm) wurden je zweimal über 5 min im Flüssig-Szintillationszähler bestimmt. Aus beiden Messungen wurde ein Mittelwert gebildet und von diesem der Leerwert subtrahiert. Der Leerwert wurde mit einer entsprechenden Menge an nicht radioaktivem Lösungsmittel im Flüssig-Szintillationszähler ermittelt.

Nach dem Absaugen der in den Kulturen verbliebenen TCA-Lösung und dem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Kulturen mit 1 ml 1 N NaOH / 0,01 % SDS (wt/vol) für 2h bei 37°C hydrolysiert.

Zur Bestimmung der Inkorporation von (<sup>14</sup>C)-Phenylalanin in Säure-präzipitierbares Protein wurden 250  $\mu$ l des Zellhydrolysats mit je 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt

und über Nacht gekühlt (4°C). Die Zerfallsereignisse (dpm) wurden im Flüssig-Szintillationszähler nach oben beschriebener Methode ermittelt.

### **3.6 Zellmorphologie**

Die auf Falcon 3001 ausplattierten Zellen wurden mit Phenylephrin (10µM) über 24 h induziert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop im Durchleuchtungsmodus (10 x Objektiv) mit einer CCD Kamera als mikroskopische Bilder aufgenommen und digitalisiert. Für die Messungen wurden alle stäbchenförmigen Zellen (ca. 60 – 100 Zellen pro Versuchsreihe) aus fünf zufällig ausgewählten Bildern ausgewertet. Der Durchmesser der Zellen wurde an der breitesten Stelle jeder Zelle mit dem Programm Analysis<sup>®</sup> von SIS bestimmt. Daraus wurde der Querschnitt der Zelle mit der Formel:  $(\text{Radius})^2 \times \pi$  berechnet. Durch diese Methode wurde es möglich, das Wachstum über die Größenzunahme von unterschiedlich behandelten Zellen miteinander zu vergleichen.

### **3.7 Statistik**

Die Messwerte wurden als Standardfehler vom arithmetischen Mittelwert (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) und durch den nachfolgenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt (Godfrey, 1985). Differenzen mit  $p < 0,05$  galten als statistisch signifikant.

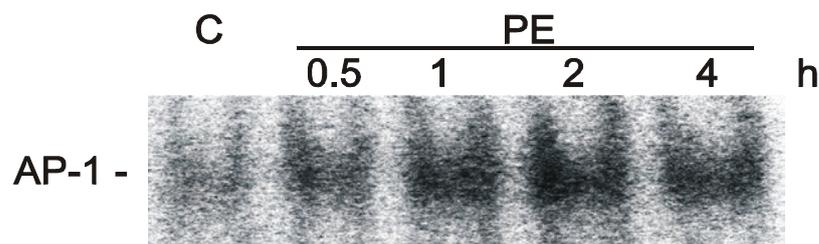
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hypertrophie durch $\alpha$ -adrenerge Stimulation

#### 4.1.1 Phenylephrin (PE) induziert AP-1 Bindungsaktivität

Um eine Verstärkung der AP-1 Bindungsaktivität durch  $\alpha$ -adrenerge Stimulation (Phenylephrin,  $10\mu\text{M}$ ) nachzuweisen, wurden isolierte Kardiomyozyten adulter Ratten mit PE induziert. Die Abhängigkeit der AP-1 Bindungsaktivität von der Induktionsdauer wurde durch ansteigende Inkubationszeiten ermittelt. Die Zellernte erfolgte nach 0,5, 1, 2 und 4h. Aus diesen Zellen wurden die Kernextrakte gewonnen, mit radioaktiv markierten TRE Oligonukleotiden versetzt und in Retardation Gelen ausgewertet. Ein Indikator für die Bindungsaktivität ist die Schattierung des für den Komplex (AP-1/Oligonukleotid) spezifischen Shifts im Retardation Gel.

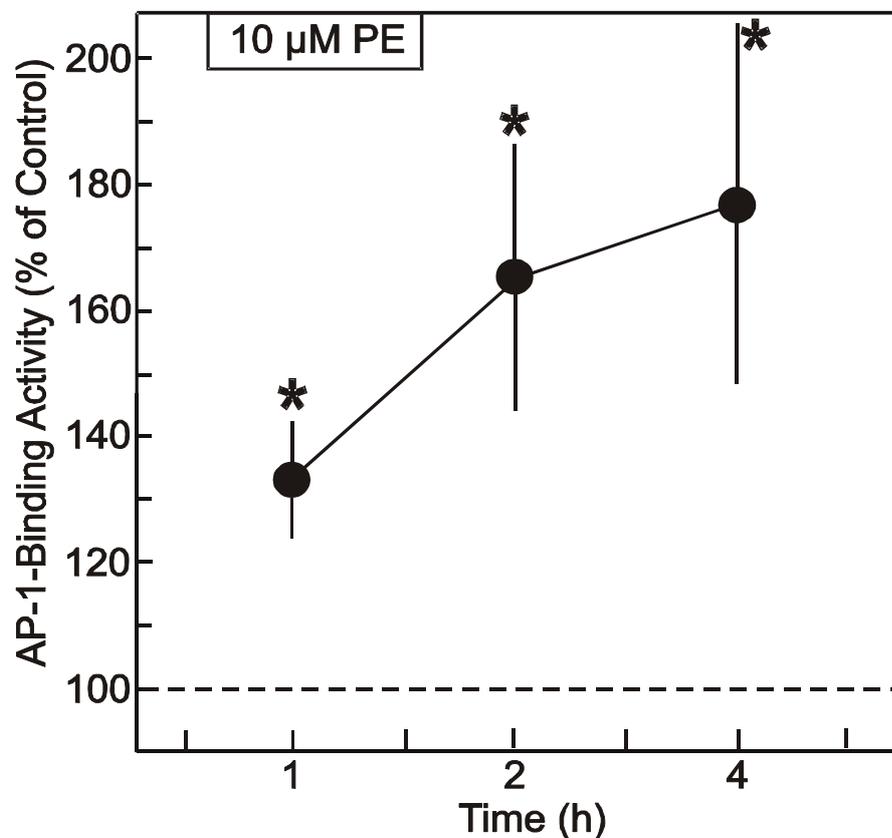
In den Gelen zeigte sich bei den mit PE behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben eine deutliche Verstärkung der Schattierung des Shifts (Abb. 4.1.1.A).



**Abb.4.1.1.A: Aktivierung der AP-1 Bindungsaktivität nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation (Phenylephrin,  $10\mu\text{M}$ ).**

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt von einem Retardation Gel im Phosphor-Imager. Dargestellt ist die Bindung von AP-1 an radioaktiv markierte Oligonukleotide mit einer AP-1 Bindungsstelle. In Abhängigkeit von der Induktionszeit zeigt sich eine Zunahme des AP-1 Shifts.

Um diese Beobachtung genauer bestimmen zu können, wurden mehrere Versuchsreihen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Aus den im Phosphor Imager eingescannten Gelen wurde der AP-1-Shift densitometrisch ausgewertet. Die AP-1 Bindungsaktivität erhöhte sich nach 1h PE-Induktion auf  $132 \pm 10$  % in Bezug auf die Kontrollgruppe ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ), bei längerer Inkubation (4 h) stieg die Bindungsaktivität auf  $177 \pm 29$  % ( $n=5$ ,  $p<0,05$ , vs. Kontrolle) (Abb. 4.1.1.B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Phenylephrin AP-1 in Herzmuskelzellen aktiviert.



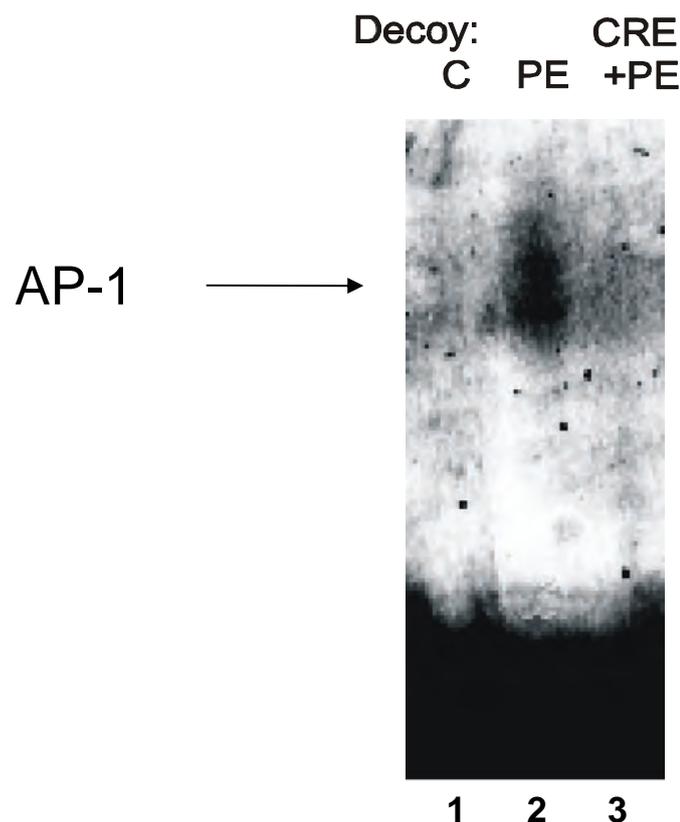
**Abb.4.1.1.B: Aktivierung der AP-1 Bindungsaktivität nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation (Phenylephrin, 10  $\mu$ M).**

Die Werte wurden in 5 voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt und zu Mittelwerten  $\pm$  SE zusammengefasst. Eine signifikante Erhöhung der AP-1 Bindungsaktivität ist die Folge der Induktion mit PE (\* =  $p<0,05$  versus Kontrolle).

#### 4.1.2 AP-1 ist entscheidend an der $\alpha$ -adrenergen Hypertrophie Entwicklung beteiligt

##### 4.1.2.1 Reduktion der AP-1 Bindungsaktivität durch CRE-Decoy-Oligonukleotide

Um die Funktion der AP-1 Aktivierung für die  $\alpha$ -adrenerge Wachstumsstimulation durch PE (10 $\mu$ M) näher zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden (CRE, 500nM, 5 h), welche die AP-1 Bindungssequenz beinhalten, transformiert. Diese CRE-Decoy-Oligonukleotide fangen aktivierte AP-1 Moleküle ab, so dass sie nicht an AP-1 Bindungsstellen anderer Gene binden können. In den mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden behandelten Kulturen wurde die AP-1 Bindungsaktivität in Retardation Gelen im Vergleich zu nicht transformierten Zellen vermindert (Abb.4.1.2.1).



**Abb.4.1.2.1: Reduktion der AP-1 Bindungsaktivität durch CRE-Decoy-Oligonukleotide.** Dieses Retardation Gel zeigt die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1. Bei den mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden (Spalte 3) vorbehandelten Zellen kommt es im Vergleich zu

*den nur mit PE (Spalte 2) induzierten Zellen zu einem deutlichen Verlust der Bindungsaktivität des AP-1.*

Ob diese Absenkung der Bindungsaktivität von AP-1 mit Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel einhergeht, wurde anhand der Proteinsyntheserate und der Zellgröße (s.4.1.2.2-3) überprüft.

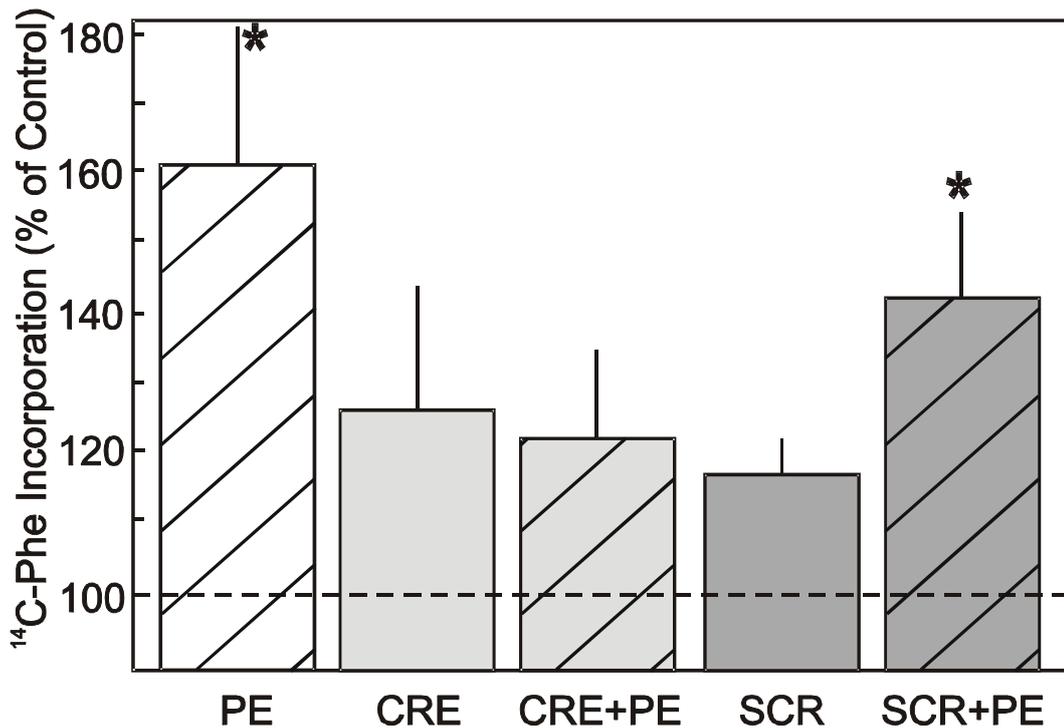
#### **4.1.2.2 Proteinsyntheserate**

Anhand der Inkorporation von (<sup>14</sup>C)-Phenylalanin wurde die Proteinsyntheserate ermittelt. Eine Erhöhung der Proteinsyntheserate ist ein gutes Merkmal für die Hypertrophie der Kardiomyozyten.

Da die Proteinsyntheserate sich bei einer 2-4 h andauernden Induktion nicht wesentlich steigert, wurde die Stimulation der Kardiomyozyten mit PE (10µM) auf 24 h verlängert, daraufhin steigerte sich die Proteinsyntheserate (Abb.4.1.2.2) signifikant in Bezug zur Kontrollgruppe auf  $161 \pm 27 \%$  (n=4, p<0,05). Durch eine Vorinkubation mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden (500nM) über eine Dauer von 5 h verringerte sich der durch PE-Gabe induzierte Anstieg der Syntheserate bei den mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden transformierten und PE stimulierten Zellen deutlich auf  $123 \pm 27 \%$  (n=4, p<0,05, vs. Kontrolle). Durch alleinige Transformation der Kulturen mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden lag die Proteinsyntheserate bei  $126 \pm 19 \%$  (n=4, p<0,05, vs. Kontrolle).

Um zu kontrollieren, ob dieser Effekt für die CRE-Decoy-Oligonukleotide spezifisch ist, wurden die Zellen mit korrespondierenden scrambled-Decoy-Oligonukleotiden (SCR) behandelt. Die Transformation mit den SCR-Decoy-Oligonukleotiden konnte den Anstieg der Proteinsyntheserate durch PE-Induktion (24h) nicht abfangen ( $143 \pm 12 \%$ , n=4, p<0,05, vs. Kontrolle).

Nur die für AP-1 spezifischen CRE-Decoy-Oligonukleotide waren dazu in der Lage, die Proteinsyntheserate signifikant zu verringern, was beweist, dass AP-1 funktionell an der PE-induzierten Steigerung der Proteinsyntheserate beteiligt ist.



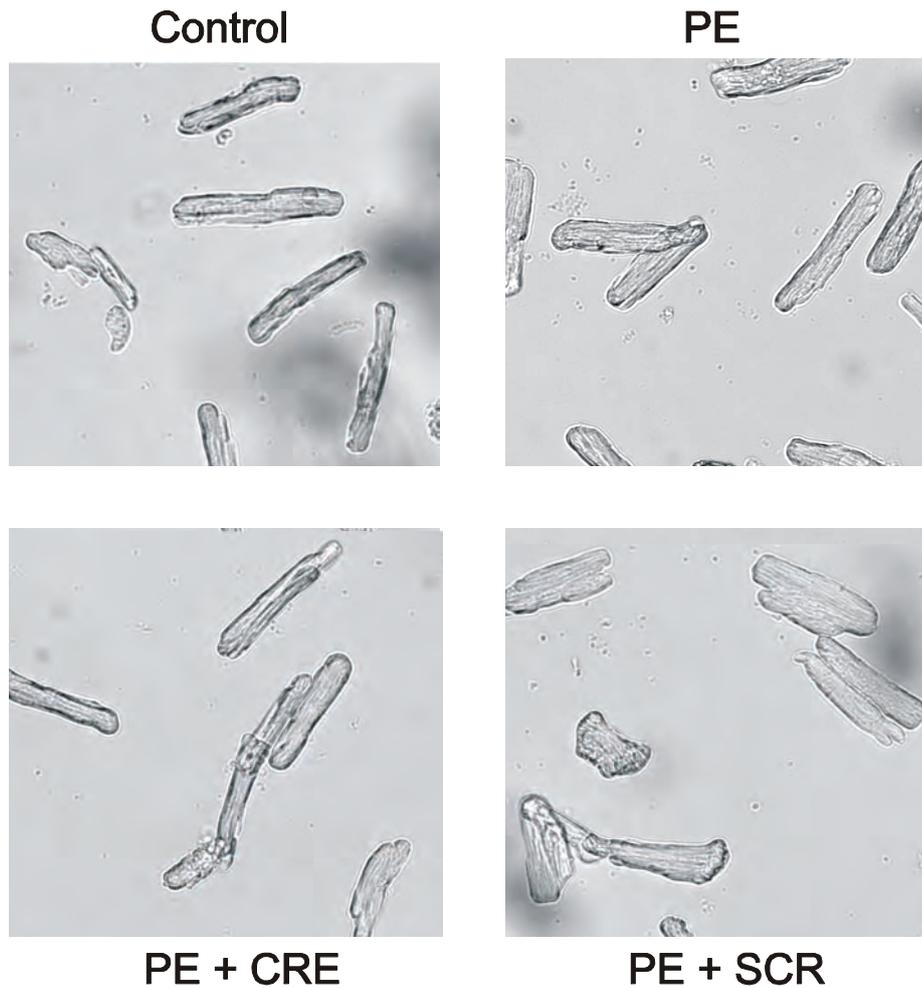
**Abb.4.1.2.2: AP-1 als Vermittler PE-induzierter Steigerung der Proteinsyntheserate.**

In der Abbildung ist die Proteinsyntheserate der unterschiedlich behandelten Kardiomyozyten anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Phenylalanin dargestellt. CRE- und SCR-Decoy-Oligonukleotide alleine können die Syntheserate nicht signifikant steigern. Die Induktion mit Phenylephrin (24h, 10µM) erhöht die Synthese (Kontrolle 100%) deutlich. Das SCR Oligonukleotid ist nicht dazu in der Lage den durch PE induzierten Anstieg abzufangen, nur das CRE-Decoy Oligonukleotid vermindert diesen Anstieg signifikant. Darstellung von MW ± SE aus n = 4, \* = p<0,05 versus Kontrolle.

#### 4.1.2.3 Zellgröße

Als zusätzlicher Marker des vermehrten Wachstums der Kardiomyozyten wurde die Zellgröße bei unterschiedlichen Induktionen vermessen. Die Zelllänge und -breite wurde mit dem Programm Analysis<sup>®</sup> anhand von mikroskopischen Fotos, die mit einer CCD-Video Kamera angefertigt wurden, gemessen und anschließend der Zellquerschnitt berechnet.

In Abb. 4.1.2.3.A ist die Größenzunahme der Kardiomyozyten nach PE Stimulation sichtbar. Diese Wachstumsantwort konnte durch die Vorinkubation der Zellen mit CRE-Decoy Oligonukleotiden antagonisiert werden. Keine Verminderung der Hypertrophie zeigte sich in den mit SCR-Decoy Oligonukleotiden transformierten Zellen.

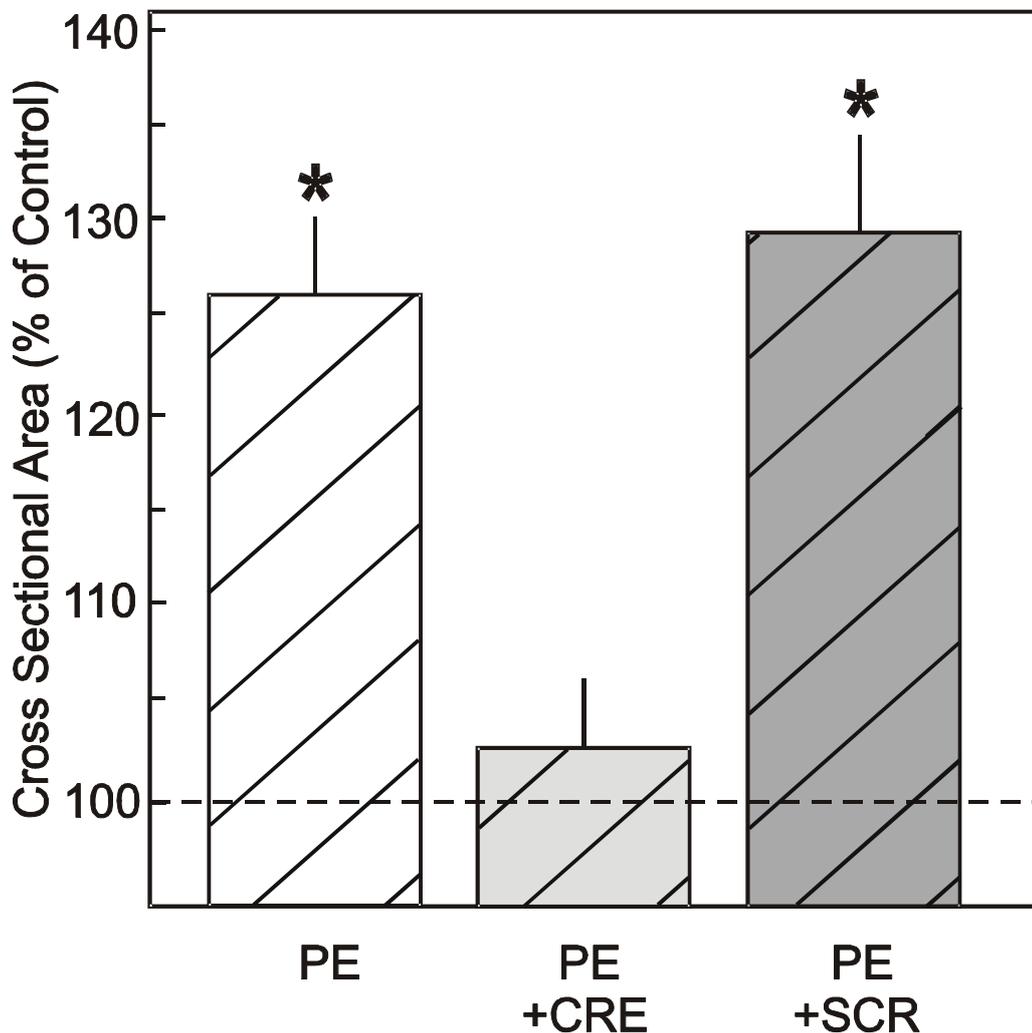


**Abb.4.1.2.3.A: Die Zellgröße von Herzmuskelzellen nach PE-Induktion**

Hier sind repräsentative mikroskopische Fotos einer CCD-Video Kamera dargestellt. Oben links sind die Kontrollzellen, oben rechts die mit PE (10 $\mu$ M) induzierten Zellen und unten die jeweils mit CRE- oder SCR-Decoy-Oligonukleotiden transformierten und PE-stimulierten Kardiomyozyten gezeigt. Die Größenzunahme der Zellen (Breite) auf der rechten Seite ist eindeutig erkennbar. Die Zellen, die mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden transformiert wurden, zeigen ein der Kontrolle vergleichbares Größenwachstum.

Die Berechnungen der Zellquerschnitte ( $\text{Radius}^2 \times \pi$ ) ergaben bei den mit PE stimulierten Zellen einen Zuwachs auf  $126 \pm 4 \%$  ( $n=6$ ,  $p<0.05$  vs. Kontrolle). Diese Zellantwort konnte durch die Transformation der Kardiomyozyten mit CRE-Decoy Oligonukleotiden abgefangen werden ( $104 \pm 3 \%$ ,  $p< 0.05$  vs. Kontrolle). Die Vorinkubation der Zellen mit SCR-Decoy Oligonukleotiden verhinderte das durch PE

verursachte Größenwachstum nicht ( $129 \pm 4 \%$ ,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle)(siehe Abb.4.1.2.3.B).



**Abb.4.1.2.3.B: Die Zellgröße von Herzmuskelzellen nach PE-Induktion**

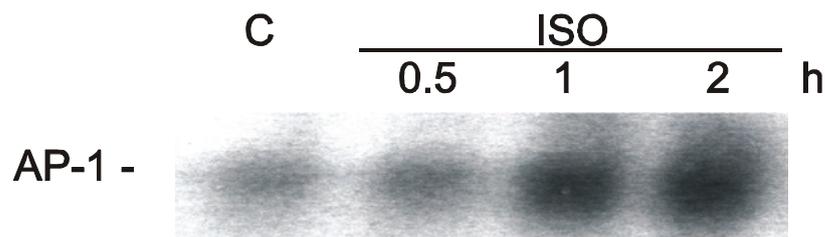
Die Zellquerschnitte wurden in voneinander unabhängigen Versuchsreihen ( $n=6$ ) berechnet und zu Mittelwerten zusammengefasst. Die Stimulation mit PE erhöhte den Querschnitt der Kardiomyozyten deutlich. Diese Hypertrophie Antwort konnte durch die Vorinkubation mit CRE-Decoy-Oligos stark verringert werden. Die Transformation mit SCR-Decoy-Oligos hatte keine wesentlichen Auswirkungen auf das Zellwachstum. Darstellung von  $MW \pm SE$  aus  $n = 6$ , \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Diese Versuchsreihen demonstrieren, dass das intrazelluläre Abfangen von AP-1 mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden die  $\alpha$ -adrenerge Wachstumsstimulation verhindert. Dieses Ergebnis identifiziert AP-1 als einen essentiellen Mediator in der Signalkaskade der Hypertrophie nach PE Stimulation.

## 4.2 Hypertrophie durch $\beta$ -adrenerge Stimulation

### 4.2.1 Isoprenalin (ISO) induziert AP-1 Bindungsaktivität

Um durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation (Isoprenalin,  $1\mu\text{M}$ ) einen eventuellen Anstieg der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 nachzuweisen, wurden isolierte Kardiomyozyten adulter Ratten nach Langzeitkultivierung (6 d) mit Isoprenalin (ISO) stimuliert. Die Zellen wurden nach 0.5, 1, 2 h Induktionsdauer geerntet und Kernextrakte gewonnen. Die AP-1 Bindungsaktivität in den Kernextrakten wurde in Retardation Gelen analysiert. Eine gegenüber der Kontrolle deutliche Zunahme des AP-1 Shifts zeigt, dass ISO die Bindungsaktivität des AP-1 erhöht (Abb.4.2.1.A).

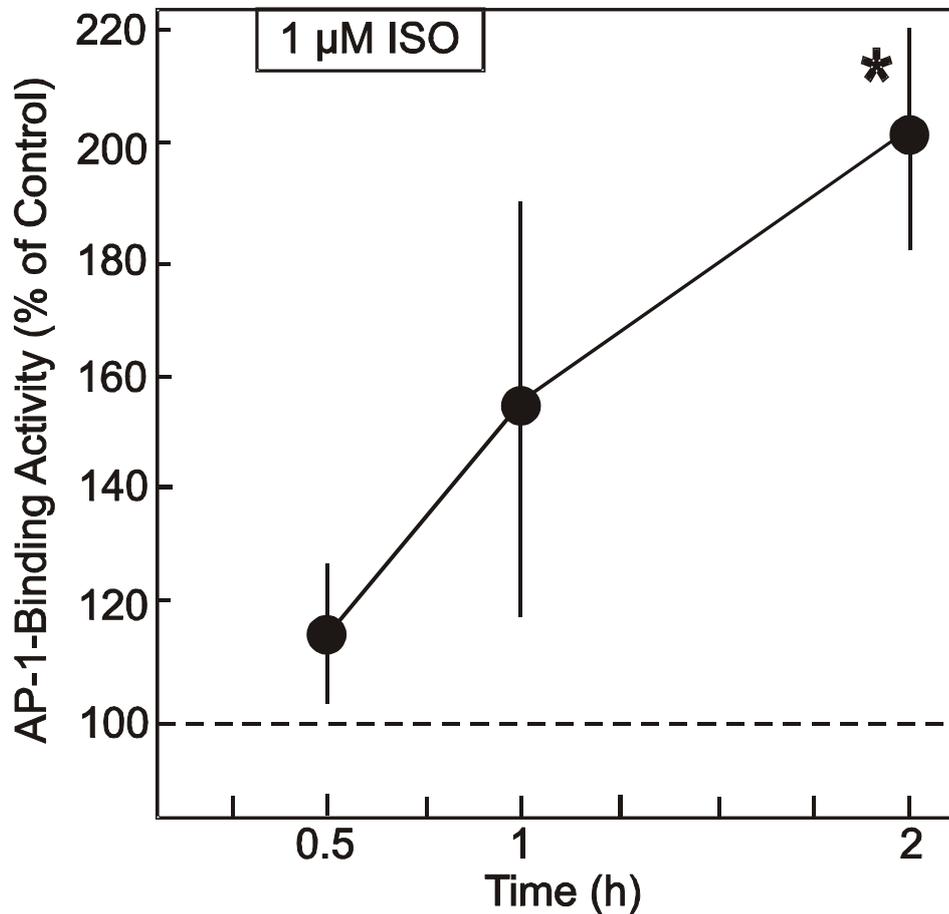


**Abb.4.2.1.A: Aktivierung der AP-1 Bindungsaktivität nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation (Isoprenalin,  $1\mu\text{M}$ ).**

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt von einem Retardation Gel im Phosphor-Imager. Dargestellt ist die Bindung von Kernproteinen an radioaktiv markierte TRE-Oligonukleotide, die eine für AP-1 spezifische Bindungssequenz besitzen. In Abhängigkeit von der Induktionszeit zeigt sich eine eindeutige Zunahme des spezifischen Shifts.

Um diese Beobachtung genauer erfassen zu können, wurden mehrere voneinander unabhängige Versuchsreihen mit ISO durchgeführt. Die Retardation Gele wurden nach dem Einscannen densitometrisch ausgewertet und zu Mittelwerten zusammengefasst. Es ergab sich bei einer 2 Stunden langen Induktionsdauer ein Anstieg der Bindungsaktivität auf  $203 \pm 19 \%$  ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abb.4.2.1.B). Dass Isoprenalin eine vermehrte Aktivität des

Transkriptionsfaktors AP-1 hervorruft, konnte in dieser Versuchsreihe bestätigt werden.



**Abb.4.2.1.B: Aktivierung der AP-1 Bindungsaktivität nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation (Isoprenalin,  $1\mu\text{M}$ ).**

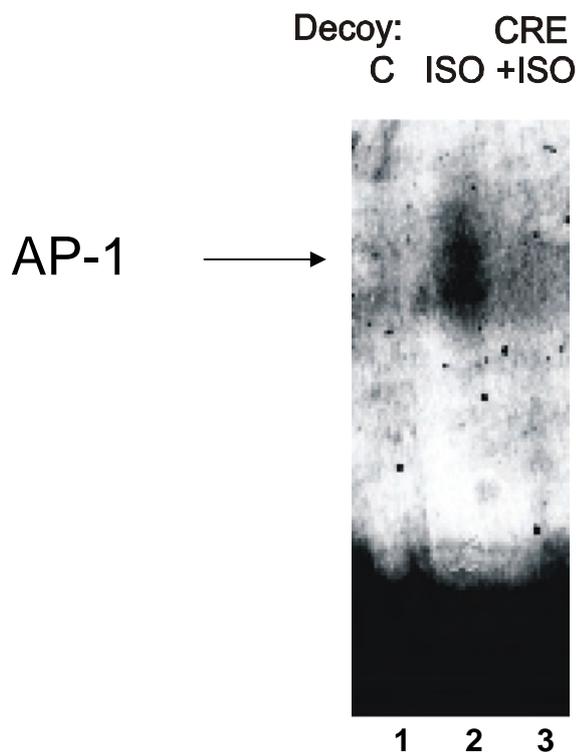
Die Werte wurden in 5 voneinander unabhängigen Retardation Gelen densitometrisch ermittelt und zu Mittelwerten zusammengefasst. Die Induktion mit ISO geht nach einer Zeit von 2h mit einer signifikanten Erhöhung der Bindungsaktivität einher. Darstellung von MW  $\pm$  SE aus  $n = 5$ ,  $* = p < 0,05$  vs. Kontrolle.

#### **4.2.2 AP-1 ist nicht entscheidend an der durch ISO induzierten Hypertrophie beteiligt**

Um die Rolle der AP-1 Aktivierung für die  $\beta$ -adrenerge Wachstumsstimulation durch ISO ( $1\mu\text{M}$ ) genauer zu erforschen, wurden Kardiomyozyten mit CRE-Decoy-

Oligonukleotiden (CRE, 500nM, 5 h) transformiert. CRE-Oligos besitzen eine für AP-1 spezifische Bindungssequenz, dadurch können sie aktivierte AP-1 Moleküle abfangen. Auf diese Weise wird AP-1 inaktiviert und kann nicht mehr an seiner Bindungsstelle auf der DNA bzw. an den radioaktiv markierten TRE-Oligonukleotiden ankoppeln.

Bei den mit Isoprenalin induzierten Zellen gelang es durch die Vorinkubation mit CRE-Decoy-Oligonukleotide die AP-1 Proteine intrazellulär abzufangen und damit ihre Bindungsaktivität signifikant zu reduzieren (Abb.4.2.2.A).



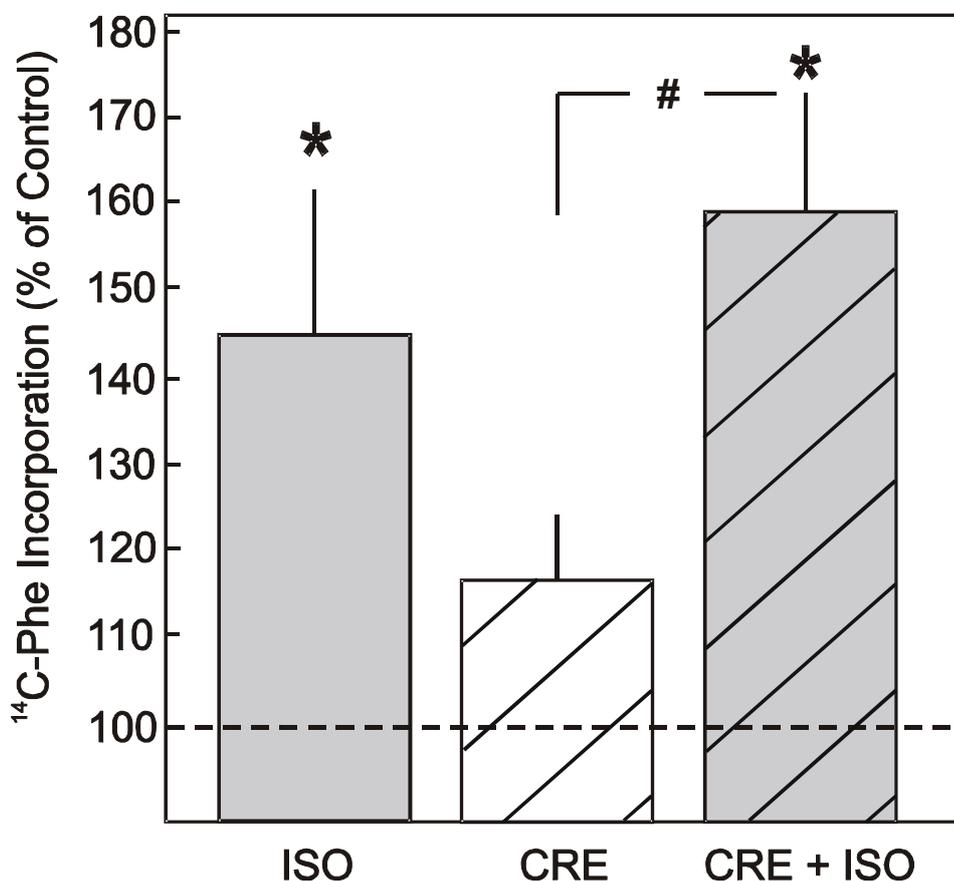
**Abb.4.2.2.A: Reduktion der AP-1 Bindungsaktivität durch CRE-Decoy-Oligonukleotide.** Dieses Retardation Gel zeigt die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1. Bei den mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden (Spalte 3) vorbehandelten Zellen kommt es im Vergleich zu den nur mit ISO (Spalte 1) induzierten Zellen zu einem deutlichen Verlust der Bindungsaktivität des AP-1.

Die Auswirkung der verminderten Bindungsaktivität auf den Zellstoffwechsel wurde durch die Proteinsyntheserate anhand der Inkorporation von (<sup>14</sup>C)-Phenylalanin (vgl. 4.1.2.2) bestimmt.

Isoprenalin erhöhte die Syntheserate über 24 h auf 145 ± 17 % in Bezug zur Kontrolle (n=8, p<0,05 vs. Kontrolle). Im Gegensatz zur α-adrenergen Stimulation

konnte die durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation erhöhte Proteinsyntheserate nicht durch das intrazelluläre Abfangen des AP-1 Komplexes mittels CRE-Decoy-Oligonukleotiden vermindert werden: Sie lag nach ISO-Stimulation bei den mit CRE-Decoy-Oligonukleotiden transformierten Zellen bei  $158 \pm 17$  % ( $n=8$ ,  $p<0,05$  vs. Kontrolle) (Abb.4.2.2.B).

Dies zeigt, dass der AP-1 Komplex bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation nicht in den vermehrten Wachstumsprozess involviert ist. Diese Erkenntnis wird auch durch Ergebnisse in Versuchsreihen mit kürzerer Kulturzeit (1 Tag) unterstützt. Hier stimulierte ISO zwar eine vermehrte AP-1 Bindungsaktivität, aber ohne eine Hypertrophie zu verursachen.



**Abb.4.2.2.B: AP-1-Decoy-Oligonukleotide können die Proteinsyntheserate bei ISO induzierter Hypertrophie nicht vermindern.**

Die Induktion mit Isoprenalin erhöht die Syntheserate deutlich. Die CRE-Decoy-Oligonukleotide vermindern das durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation vermehrte Wachstum der Zellen nicht. Darstellung von  $ME \pm SE$  aus  $n = 8$ , \* =  $p<0,05$  vs. Kontrolle.

### **4.3 Zusammensetzung von AP-1**

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Dimer. Dieses setzt sich aus zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen. Für dieses Hetero- oder Homodimer kommen Bindungspartner aus der b-ZIP-Super-Proteinfamilie, zu der die Proteinfamilien Jun, Fos, Maf und Nrl gehören, in Frage. In der folgenden Untersuchungsreihe wurde die Komposition des AP-1 Dimers bei unterschiedlicher Stimulation (PE, ISO, SNAP) analysiert. Diese drei Stimulationen bewirken bekanntermaßen alle eine Zunahme der AP-Bindungsaktivität, haben aber auf den Zellstoffwechsel unterschiedliche Auswirkungen. So führt die Stimulation mit PE über eine Aktivierung von  $\alpha$ -Rezeptoren zu einer vermehrten Aktivität von AP-1 und abhängig davon zur Hypertrophie der Kardiomyozyten (s.4.1.2), eine Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren führt hingegen zwar zu einer gesteigerten AP-1 Bindungsaktivität, diese ist aber nicht entscheidend für die Entstehung der Hypertrophie (s.4.2.2). Durch den NO Donor SNAP wird die Bindungsaktivität von AP-1 erhöht, AP-1 ist daraufhin essentiell an der Entstehung von Apoptose in Kardiomyozyten beteiligt (Taimor et al., 2001).

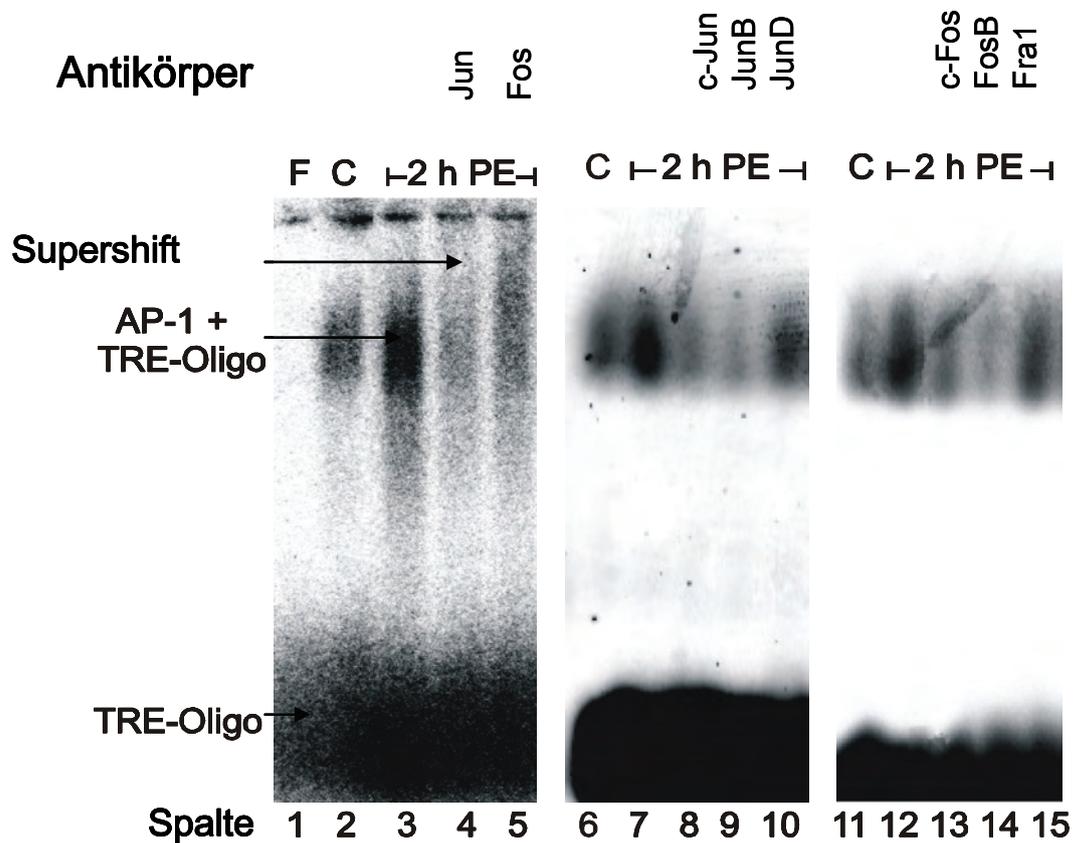
Eine mögliche Ursache für die divergierenden Wirkungen könnte in der Dimerzusammensetzung von AP-1 liegen. Die Analyse des Dimers wurde durch Einsatz spezifischer Antikörper in Retardation-assays durchgeführt (siehe 3.4).

#### **4.3.1 Zusammensetzung von AP-1 unter $\alpha$ -adrenerger Wachstumsstimulation**

Die isolierten Kardiomyozyten wurden für 2h mit Phenylephrin (10 $\mu$ M) induziert und anschließend geerntet. Die aus diesen Zellen gewonnenen Kernextrakte wurden nach Versuchsanordnung für die Retardation Gele vorbereitet und mit den unterschiedlichen Antikörpern vermischt.

Antikörper, die alle Familienmitglieder der Jun- und Fos-Familie erkennen, reduzierten den AP-1 Shift deutlich (siehe Spalte 4, 5 in Abb. 4.3.1). Diese Tatsache beweist, dass sich der Transkriptionsfaktor AP-1 aus diesen Proteinfamilien bildet. Um die Zusammensetzung von AP-1 genauer zu bestimmen, wurden AK eingesetzt, die für die Familienmitglieder spezifisch sind. Die für c-Jun-, JunB-, c-Fos- und FosB-Proteine spezifischen AK reduzierten den Shift in 10 voneinander unabhängigen

Gelen deutlich, wohingegen JunD- und Fra1-AK den AP-1 Shift nicht eindeutig vermindern konnten.



**Abb.4.3.1: PE stimuliert c-Jun, JunB, FosB und c-Fos Dimere.**

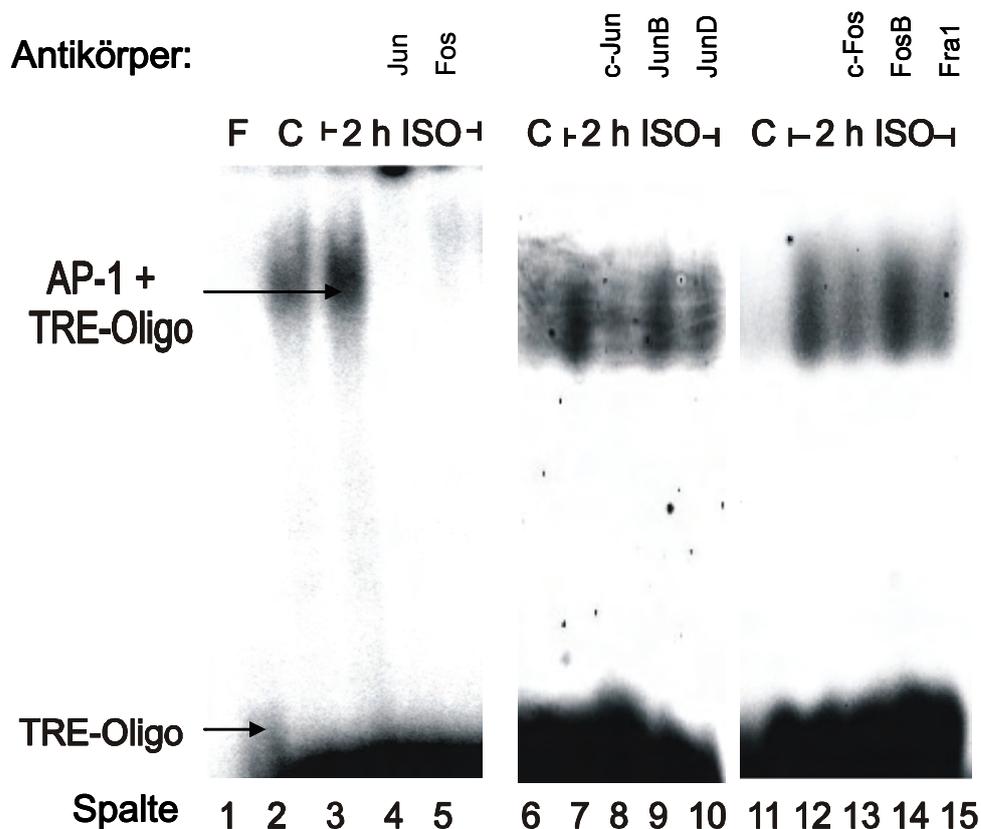
Durch die Zugabe von Jun- und Fos-Antikörper (Spalte 4, 5) ist der AP-1 Shift deutlich reduziert. In den Spalten 8, 9, 13 und 14 ist der Shift durch c-Jun-, JunB-, FosB- und c-Fos-Antikörper vermindert, die JunD- und Fra1-Antikörper verändern den Shift nicht eindeutig.

#### 4.3.2 AP-1 unter $\beta$ -adrenerger Wachstumsstimulation durch ISO

Langzeitkulturen wurden mit Isoprenalin ( $1\mu\text{M}$ , 2h) (siehe 3.2.4) induziert. Die daraus gewonnen Kernextrakte wurden wie in 3.4 beschrieben behandelt und mit den verschiedenen Antikörpern versetzt.

Wie bei der  $\alpha$ -adrenergen Stimulation reduzierten die Jun- und Fos-Antikörper in voneinander unabhängigen Versuchsreihen den AP-1 Shift eindeutig (Spalte 4 und 5 in Abb.4.3.2). Dies zeigt, dass der AP-1 Komplex auch bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation aus Fos- und Jun-Familienmitgliedern besteht. Spezifische Antikörper für c-Jun, JunD, c-Fos und Fra1 verringerten die AP-1 Bande in mehreren Versuchen (Abb.4.3.2, Spalte 8, 10, 11 und 12). Die Antikörper JunB und FosB hingegen hatten keine wesentlichen Auswirkungen auf den AP-1 Shift (siehe Abb.4.3.2 Spalte 9 und 14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der AP-1 Komplex sowohl bei  $\alpha$ -adrenerger Stimulation als auch bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation aus Proteinen der Jun- und Fos-Familien zusammengesetzt ist. Die Dimere unterscheiden sich durch die Bildung aus unterschiedlichen Mitgliedern der jeweiligen Proteinfamilien. Zusätzlich zu c-Fos- und c-Jun sind JunB- und FosB-Proteine bei  $\alpha$ -adrenerger Stimulation und Fra1- und JunD-Proteine bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation vermehrt in den Kernextrakten nachweisbar.



**Abb.4.3.2: ISO stimuliert c-Jun, c-Fos, JunD und Fra1 Dimere.**

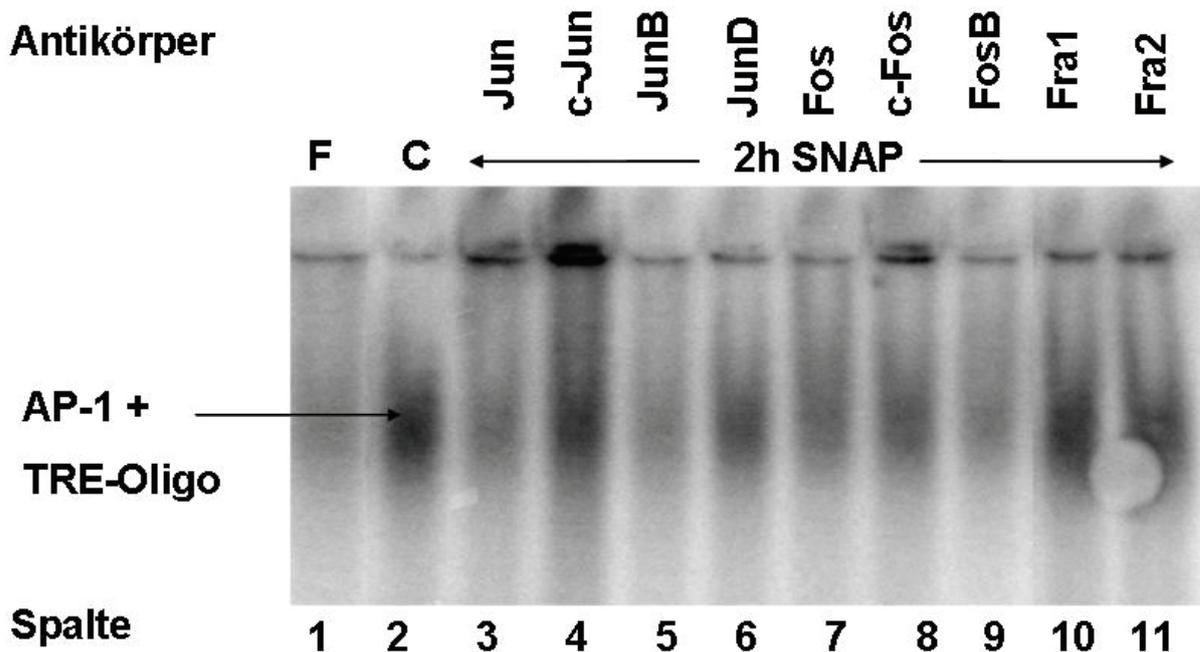
Der AP-1 Shift wird durch Antikörper, die für alle Fos- bzw. Jun-Proteine spezifisch sind, deutlich reduziert (Spalte 4, 5). In den Spalten 8, 10, 12 und 15 ist der Shift durch c-Jun-, JunD-, c-Fos- und Fra1-Antikörper vermindert, die JunB- und FosB-Antikörper verändern den Shift nicht wesentlich.

#### 4.3.3 AP-1 unter NO-Donor vermittelter Apoptose durch SNAP

Da AP-1 auch bei der durch einen NO-Donor ( $\pm$ )-S-nitroso-N-acetylpenicillamine (100 $\mu$ M, SNAP) verursachten Apoptose eine wesentliche Rolle spielt (Taimor et al., 2001), wurde in dieser Versuchsreihe auch eine Analyse der Zusammensetzung von AP-1 unter SNAP Induktion durchgeführt.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden mit SNAP (100 $\mu$ M) induziert, 2 h inkubiert und geerntet. Die daraus gewonnenen Kernproteinextrakte wurden wie oben beschrieben in Retardation Gelen durch die Zugabe von Antikörpern analysiert.

In voneinander unabhängigen Gelen (n=4) konnte durch die Behandlung mit Jun- (alle) und Fos-Antikörpern (alle) die für AP-1 spezifische Bande deutlich reduziert werden. Dies macht deutlich, dass das AP-1 Dimer bei SNAP-Induktion aus Fos und Jun Familienmitgliedern aufgebaut ist. Von den spezifischen Antikörpern konnten nur FosB und JunB (n=4) die AP-1 Bande wiederholt reduzieren. Die übrigen Antikörper waren nicht dazu in der Lage den Shift mehrmals eindeutig zu verringern. Das AP-1 Dimer setzt sich also bei der SNAP induzierten Apoptose aus JunB und FosB Untereinheiten zusammen



**Abb.4.3.3: SNAP stimuliert JunB und FosB Dimere.**

Deutlich ist die Reduktion des AP-1 Shifts durch die all Jun-, all Fos-, FosB und JunB Antikörper zu erkennen. Alle anderen konnten den Shift zwar manchmal, aber nicht wiederholbar verringern.

## 5 Diskussion

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es unter anderem im Rahmen einer systemischen Katecholaminausschüttung zur Hypertrophie des Myokards. Diese Ereignisse führen zu einer ungünstigen strukturellen Veränderung, dem so genannten „Remodeling“ im Herzen. Die molekularen Regulationsmechanismen, die für den Übergang von normaler Zellgröße der Herzmuskelzellen hin zur Hypertrophie verantwortlich sind, sind noch weitestgehend unbekannt.

Lösungsansätze zur Klärung der molekularen Regulationsmechanismen wurden unter anderem von Omura et al. (2002) veröffentlicht. Diese konnten zeigen, dass in dominant negativen c-Jun Mutanten die durch Endothelin und Phenylephrin ( $\alpha$ -adrenerg) verursachte Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten verhindert wird. Dies deutet auf eine Beteiligung von dem Transkriptionsfaktor AP-1 an der Hypertrophie hin.

Des Weiteren konnten Takemoto et al. (1999) eine enge Korrelation zwischen Herzmuskelhypertrophie und gesteigerter AP-1 Bindungsaktivität bei Ratten, die kontinuierlich mit Isoprenalin ( $\beta$ -adrenerg) infundiert wurden, nachweisen.

Eine weitere essentielle Rolle spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 bei der durch den NO-Donor SNAP verursachten Apoptose von adulten Kardiomyozyten (Taimor et al., 2001).

Aus diesen bekannten Ergebnissen ergaben sich für uns zwei Fragen:

- 1) Ist der Transkriptionsfaktor AP-1 essentiell an der Hypertrophie, die durch  $\alpha$ - und  $\beta$ - adrenerge Stimulation verursacht wird, beteiligt?
- 2) Gibt es bei den verschiedenen Stimulationen (NO-Donor,  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerg) von adulten Kardiomyozyten Unterschiede in der Dimerzusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1?

## 5.1 Die Rolle von AP-1 für die Hypertrophie und Apoptose

Durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation der Kardiomyozyten konnte in der Gelelektrophorese eine signifikant vermehrte Bindungsaktivität von AP-1 erzielt werden. Ebenso konnte eine vermehrte Bindungsaktivität von AP-1 nach Stimulation mit einem NO-Donor, wie schon in der Literatur durch Taimor et al. (2001) beschrieben, bestätigt werden.

Die weiterführenden Untersuchungen zur Bedeutsamkeit des Transkriptionsfaktors AP-1 für die Hypertrophie der Herzmuskelzellen mittels intrazellulären Abfangens des AP-1 durch CRE-Decoy-Oligonukleotide zeigten folgende Ergebnisse:

In den mit Phenylephrin stimulierten Zellen konnte die Steigerung der Proteinsyntheserate und die mikroskopisch nachweisbare Größenzunahme verhindert werden. Im Gegensatz dazu wurde in den mit Isoprenalin stimulierten Zellen die Steigerung der Proteinsyntheserate nicht herabgesetzt.

Diese Ergebnisse beweisen, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 einen wesentlichen Schritt in der Signaltransduktion bei der über  $\alpha$ -Rezeptoren vermittelten Hypertrophie darstellt. Im Gegensatz dazu zeigen sie aber, dass AP-1 keinen entscheidenden Anteil an der Signaltransduktion bei der über  $\beta$ -Rezeptoren ausgelösten Hypertrophie hat, obwohl seine Bindungsaktivität dabei erhöht ist. Die Rolle von AP-1 unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation bleibt weiterhin unklar.

Bei der NO-induzierten Apoptose konnte bereits in früheren Studien an adulten ventrikulären Kardiomyozyten (Taimor et al. 2001, Schneiders et al., 2005) durch das Abfangen von AP-1 seine Notwendigkeit für die Apoptose bewiesen werden.

Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 ist somit durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Substanzen sowie durch NO möglich. Wobei eine  $\alpha$ -adrenerg vermittelte AP-1-Aktivität im Gegensatz zu einer  $\beta$ -adrenerg vermittelten Aktivität die Herzmuskelzellhypertrophie induziert. Im Gegensatz dazu vermittelt der Transkriptionsfaktor AP-1 unter NO-Stimulation Apoptose in Herzmuskelzellen.

## 5.2 Variation in der Dimerzusammensetzung von AP-1

Hinsichtlich der Dimerzusammensetzung von AP-1 zeigten sich Unterschiede nach Stimulation mit Phenylephrin, Isoprenalin und einem NO-Donor. Den Hauptanteil bei der AP-1-Komplexbildung hatten bei allen 3 Stimulationsarten Jun- und Fos-Untereinheiten aus der b-ZIP-Super-Proteinfamilie.

Nach  $\alpha$  und  $\beta$ -adrenerger Stimulation ist bei der Dimerbildung von AP-1 die Beteiligung divergierender Familienmitglieder der b-ZIP-Super-Proteinfamilie nachweisbar. So sind die AP-1-Dimere nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation aus den Familienmitgliedern JunB, FosB, c-Jun und c-Fos zusammengesetzt, wohingegen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation hauptsächlich JunD, Fra1, c-Jun und c-Fos nachweisbar sind.

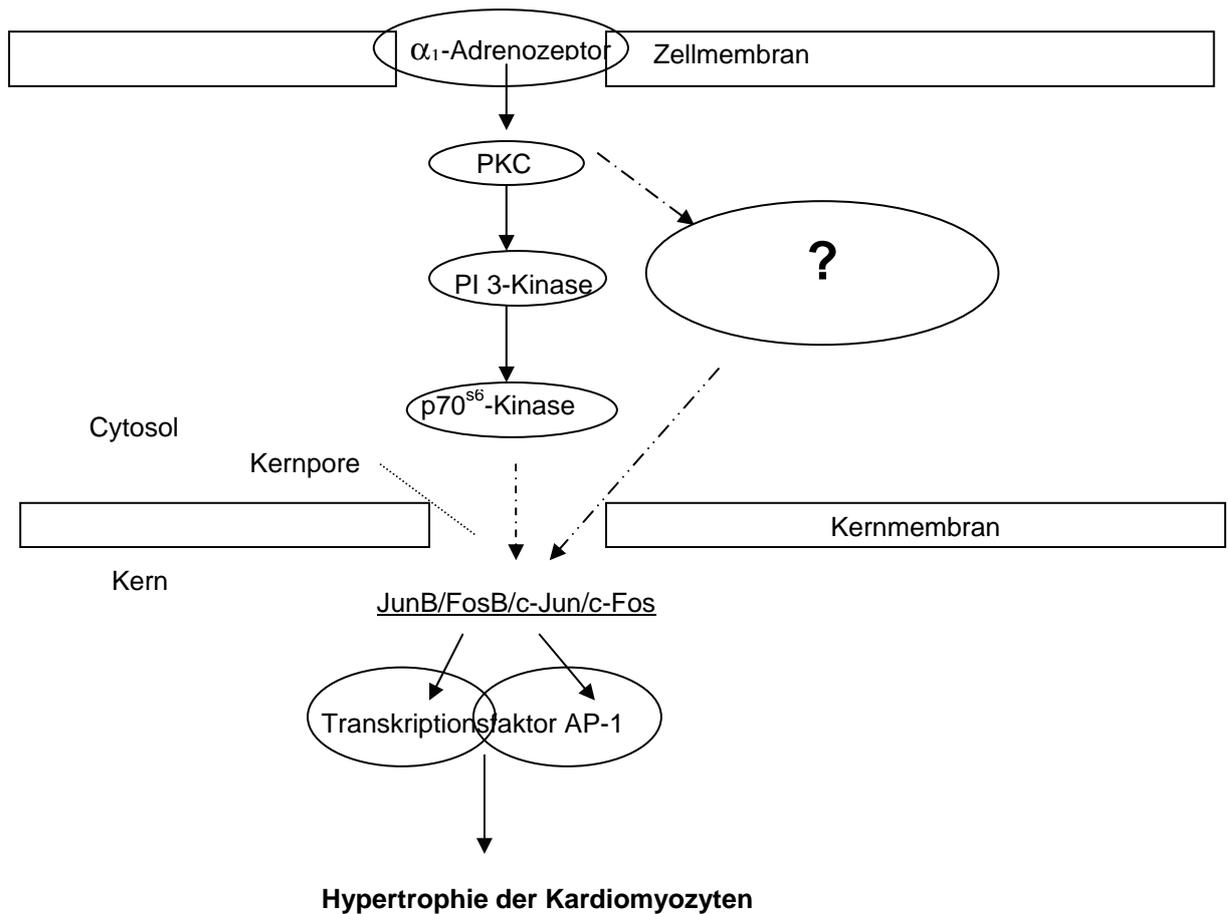
Im Vergleich der Dimerzusammensetzung von AP-1 unter Stimulation mit NO bzw. Phenylephrin zeigte sich, dass beide aus Jun und Fos Untereinheiten aufgebaut sind, wobei sich unter Stimulation mit NO einzig FosB und JunB mit spezifischen Antikörpern wiederholt nachweisen ließen, während unter PE-Stimulation noch c-Jun und c-Fos induziert waren.

Die Analyse der Dimerzusammensetzung mittels Antikörpern in Retardatongelen muss sicherlich kritisch diskutiert werden. Supershifts oder eine Reduktion der Shifts durch Antikörper in diesen Gelen sind nicht einfach nachzuweisen und schwierig zu quantifizieren. Des Weiteren ist die Entstehung eines Supershifts bzw. eine Shift-Reduktion stark abhängig von der Qualität der Antikörper. Diese Probleme führen dazu, dass sich geringe Kompositionsunterschiede in der Dimerzusammensetzung von AP-1 nicht detektieren lassen. Nur Hauptbestandteile sind mit ausreichender Sicherheit zu erkennen.

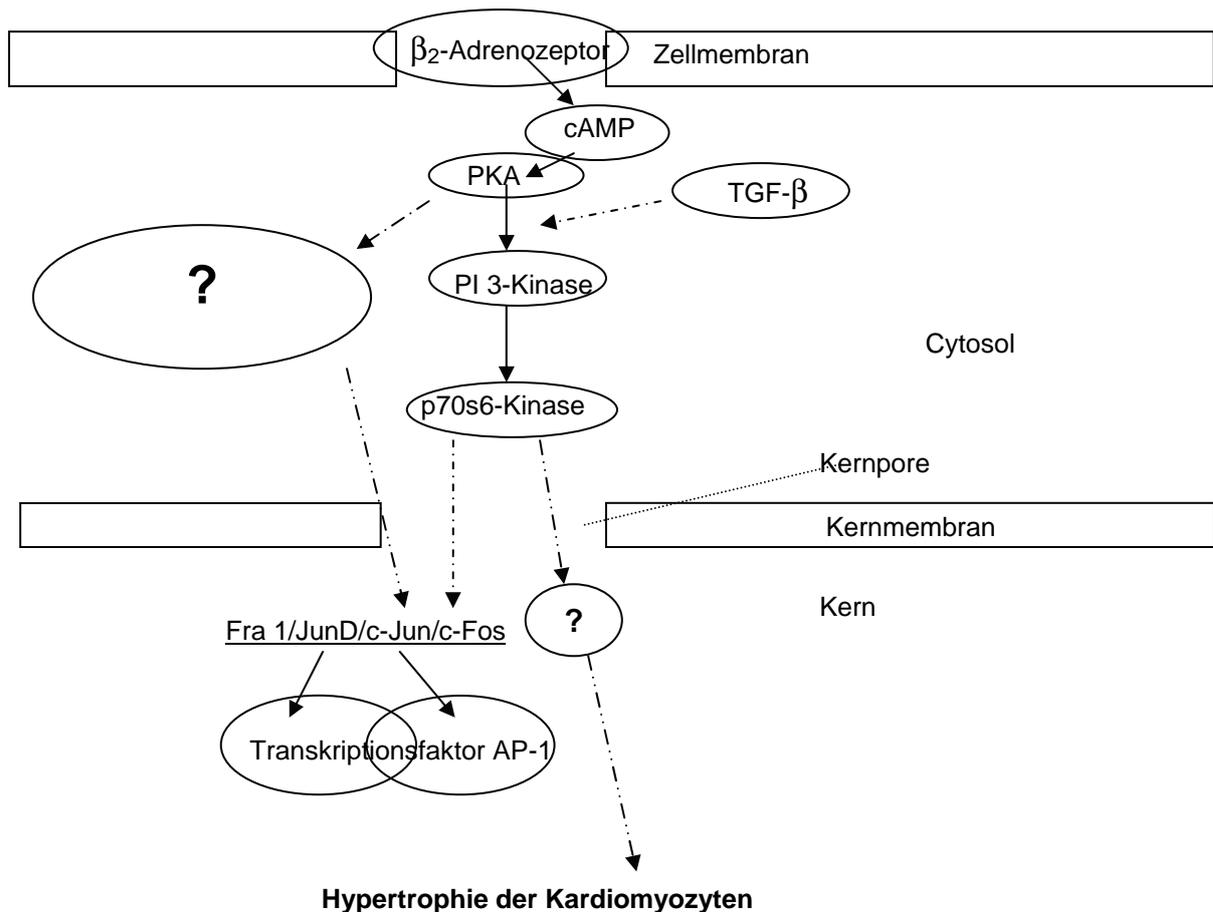
### 5.2.1 Mögliche Ursachen für divergierende AP-1 Zusammensetzung

Die gezeigten Unterschiede in der Dimerzusammensetzung von AP-1 unter adrenerger Stimulation könnten durch divergierende Signaltransduktion unter diesen Bedingungen erklärt werden. So konnten Pönicke et al. (2001) zeigen, dass das Signal nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation über die Proteinkinase C, PI 3-Kinase und die

p70s6-Kinase an den Zellkern weitergeleitet wird. Die Stimulation der  $\beta_2$ -Rezeptoren führt im Gegensatz dazu über eine cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A in TGF- $\beta$  bedingter Ankopplung (Schlüter et al., 1995,1998) zu einer Aktivierung der PI 3- und p70s6-Kinase (Simm et al., 1998). So gesehen zeigen beide Stimulationsarten bei der Signaltransduktion einen teilweise ähnlichen Weg der Signalübermittlung. Daher ist es unwahrscheinlich, dass über eine Aktivierung der gleichen Kinasen (PI 3-Kinase, p70s6-Kinase) eine unterschiedliche Dimerzusammensetzung verursacht wird. Eher ist zu vermuten, dass dieser Weg nicht allein für die Transduktion des adrenergen Stimulus verantwortlich ist. Die Möglichkeit, dass sowohl durch die Proteinkinase C als auch durch die Proteinkinase A andere Wege der Signaltransduktion, die bisher völlig unbekannt sind, aktiviert werden, sollte man sicherlich nicht außer Acht lassen. Diese bisher unbekannt Wege könnten einen entscheidenden Einfluss auf die Dimerzusammensetzung haben (s. Abb. 5.2.1.A und B).



**Abb.5.2.1.A: Modell für die Signaltransduktion bei  $\alpha$ -adrenerg induzierter Hypertrophie.**  
 Durch Stimulation der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren kommt es über eine Aktivierung verschiedener Kinasen zu einer Steigerung der Proteinsyntheseleistung (Pönicke et al., 2001). Dass der Transkriptionsfaktors AP-1 entscheidend an dieser Signaltransduktion beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit bewiesen werden. Der Beweis das AP-1 genau an dieser Stelle in der Signalvermittlung eingebaut ist steht noch aus.



**Abb.5.2.1.B: Modell für die Signaltransduktion bei  $\beta_2$ -adrenerg induzierter Hypertrophie.**

Durch Stimulation der  $\beta_2$ -Adrenzeptoren (Zhou et al. 1996) kommt es über eine Aktivierung verschiedener Kinasen zu einer vermehrten Proteinsyntheseleistung (Simm et al., 1998). Auf welchem Weg der Transkriptionsfaktors AP-1 aktiviert wird und was er verursacht ist noch nicht bewiesen. In dieser Arbeit konnte nur bewiesen werden, dass seine Bindungsaktivität vermehrt ist und dass er an dieser Signaltransduktion der Hypertrophie keinen Anteil hat.

## 5.2.2 Folgen verschiedener AP-1 Zusammensetzungen

Die unterschiedliche Dimerzusammensetzung nach adrenergischer Stimulation könnte ursächlich sein, dass AP-1 Induktion nur unter  $\alpha$ - und nicht unter  $\beta$ -adrenergischer Stimulation an der Hypertrophie-Entwicklung beteiligt ist.

So konnten Hilfiker et al. (2005) zeigen, dass die vermehrte Nachweisbarkeit von JunD im Herzen mit einem protektiven Effekt einhergeht. Dominant negative JunD Mutanten zeigen eine gesteigerte Hypertrophie und Apoptose der Kardiomyozyten bei andauerndem Bluthochdruck. Demnach scheinen AP-1 Dimere mit JunD-

Beteiligung, wie sie auch in dieser Arbeit unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation gefunden wurde, nicht an der Hypertrophieentstehung beteiligt zu sein. Auch in anderen Zelltypen konnten bereits verschiedene Wirkweisen unterschiedlicher AP-1 Dimere nachgewiesen werden. Yoshioka et al. (1995) konnten zeigen, dass ein AP-1 Komplex (Jun-Fra), der durch Butylhydroquinone induziert wurde, die Transkriptionseffekte des Tumorpromoter TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-Acetat), die durch ein AP-1 Heterodimer (Jun-Fos) vermittelt werden, antagonisieren kann. In der Onkogenese konnten für Jun-Fos und Jun-ATF Heterodimere unterschiedliche, sich ergänzende Rollen in der Entstehung von Fibrosarkomen bewiesen werden (van Dam et al., 2001).

Diese Beispiele zeigen die Abhängigkeit der Effekte von der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1. Somit ist davon auszugehen, dass die unterschiedliche Dimerzusammensetzung von AP-1 unter adrenerger Stimulation die unterschiedliche Wirkung von AP-1 unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Stimulation auf das hypertrophe Wachstum beeinflusst.

### **5.3 Wechselwirkung von AP-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren**

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion bisher unbekannter modulierender Faktoren die Auswirkungen nach  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Stimulation beeinflussen. Schneider et al. (2005) konnten z.B. bei der NO-induzierten Apoptose eine Wechselwirkung zwischen den Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD nachweisen. Dieser Umstand könnte erklären, wie bei ähnlicher Dimerzusammensetzung von AP-1 nach Stimulation mit Phenylephrin bzw. NO einerseits eine Hypertrophie und andererseits eine Apoptose bei Herzmuskelzellen ausgelöst werden kann.

Schneider et al. (2005) konnten zeigen, dass in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte die Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD in der NO-induzierten Apoptose zeitgleich induziert werden und dass eine Wechselwirkung der beiden Faktoren vermutet werden kann. So führte sowohl der Einsatz des AP-1-bindenden Decoy-Oligonukleotides CRE als auch der des SMAD-bindenden Decoy-Oligonukleotides SBE zu einer Reduzierung der NO-induzierten SMAD-Bindungsaktivität. Die Tatsache, dass das AP-1-bindende und das SMAD-bindende

Decoy-Oligonukleotid die SMAD-Bindungsaktivität reduzieren konnten, spricht für eine Wechselwirkung von AP-1 und SMAD in der NO-induzierten Apoptose. Im Gegensatz dazu sind SMAD Proteine nicht für die durch AP-1 vermittelte Hypertrophie notwendig. Diese Resultate lassen die SMAD Proteine als mögliche Signale erscheinen, welche den AP-1 vermittelten Signalweg durch Wechselwirkung in eine pro-apoptotische Richtung verändern. Während die Dimerzusammensetzung unter  $\alpha$ -adrenerger oder NO Stimulation nicht wesentlich verschieden ist und somit kaum eine Rolle für die unterschiedliche Wirkung von AP-1 auf Hypertrophie und Apoptose spielen sollte.

## 6 Zusammenfassung

In der Literatur ist nach  $\alpha$ - (Phenylephrin) und  $\beta$ -adrenerger (Isoprenalin) Stimulation ein vermehrtes Größenwachstum von Kardiomyozyten beschrieben. Eine gleichzeitig vermehrte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 ließ die Frage aufkommen, ob AP-1 entscheidend an der Signalweitergabe bei der Hypertrophie Antwort beteiligt ist. Des Weiteren ist eine entscheidende Beteiligung von AP-1 an der NO-induzierten Apoptose aus der Literatur bekannt. Dies warf die Frage auf ob eine unterschiedliche Dimerzusammensetzung von AP-1 ursächlich ist für die verschiedenen Zellreaktionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell isolierter Kardiomyozyten der Ratte die Bedeutsamkeit von AP-1 für die adrenerg induzierte Hypertrophie untersucht. Die Dimerzusammensetzung von AP-1 wurde nach Stimulation der Kardiomyozyten mit Phenylephrin, Isoprenalin und einem NO-Donor analysiert.

Als wesentliches Ergebnis konnte gezeigt werden, dass durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation eine Hypertrophie der Kardiomyozyten verursacht wird, ebenso zeigt sich eine erhöhte AP-1 Bindungsaktivität. Durch Inaktivierung des AP-1 Komplexes mittels CRE-Decoy-Oligonukleotiden konnte bewiesen werden, dass AP-1 bei der  $\alpha$ -adrenerg verursachten Hypertrophie aber nicht bei der  $\beta$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie eine entscheidende Rolle zukommt. Das AP-1-Dimer setzte sich nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation aus JunB, FosB, c-Jun und c-Fos zusammen, wohingegen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation hauptsächlich JunD, Fra1, c-Jun und c-Fos bei der Dimerbildung nachweisbar waren. Nur geringe Unterschiede zeigten sich im Vergleich der Dimerzusammensetzung nach Stimulation mit NO oder Phenylephrin.

Die Unterschiede in der Dimerzusammensetzung unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Stimulation könnten erklären, warum AP-1 nur unter  $\alpha$ -adrenerger Stimulation Hypertrophie verursacht. Dagegen sind die AP-1 Dimere unter Apoptose und Hypertrophie sehr ähnlich. Hier scheint, die unterschiedliche Wirkung in der Wechselwirkung von AP-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren begründet zu sein. Bei NO-induzierter Apoptose scheint einer Wechselwirkung von AP-1 mit dem Transkriptionsfaktor SMAD ein wesentlicher Effekt zuzukommen.

## 7 Summary

Literature references describe an increased growth rate of cardiomyocytes following  $\alpha$ - (phenylephrine) and  $\beta$ -adrenergic (isoprenaline) stimulation. The simultaneous increase in the activity of the AP-1 transcription factor raises the question whether AP-1 is significantly involved in the signal transfer within the scope of the hypertrophic response. Moreover, the considerable involvement of AP-1 in NO-induced apoptosis is known from the literature, raising the question whether the special dimer composition of AP-1 is the cause of the different cell reactions.

The present study examines the significance of AP-1 with respect to adrenergically induced hypertrophy using cardiomyocytes isolated from rats. The dimer composition of AP-1 was analysed following stimulation of the cardiomyocytes using phenylephrine, isoprenaline as well as an NO-donor.

As a key result, we were able to demonstrate that the  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation causes cardiomyocyte hypertrophy. In addition, an increased binding activity of AP-1 was observed. The inactivation of the AP-1 complex by means of CRE-decoy-oligonucleotides demonstrated that AP-1 plays a major role in hypertrophy caused by  $\alpha$ -adrenergic stimulation but not in hypertrophy caused by  $\beta$ -adrenergic stimulation. Following  $\alpha$ -adrenergic stimulation, the AP-1-dimer was composed of JunB, FosB, c-Jun and c-Fos, while we mainly observed JunD, Fra1, c-Jun und c-Fos in the dimer composition following  $\beta$ -adrenergic stimulation. Only minor differences were established when comparing the dimer composition following stimulation with NO or phenylephrine.

The differences in the dimer composition under  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation could explain while AP-1 only causes hypertrophy following  $\alpha$ -adrenergic stimulation. In contrast, the AP-1 dimers are very similar under apoptosis and hypertrophy. It appears that the different action is based on the interaction of AP-1 with other transcription factors. In NO-induced apoptosis, the interaction of AP-1 with the SMAD transcription factor appears to have a major effect.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Andreka P., Zang J., Dougherty C., Slepak T., Webster K., Bishopric N. (2001) Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*, 88 (3): 305-312.
2. Angel P., Karin M., (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072: 129-157.
3. Bartolome J.V., J. Huguenard and T. A. Slotkin (1980) Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Science* 210:793-794.
4. Bartolome J. V., P. A. Trepanier, E. A Chait. und T. A. Slotkin (1982) Role of polyamines in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy: Effects of a-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14:461-466.
5. Bugaisky L., Gupta M., Zak R. (1992) Cellular and molecular mechanism of cardiac hypertrophy. *The Heart and Cardiovascular System*, 2nd Edition, HA Fozzard (ed). New York: Raven Press, 1621-1640.
6. Curran T. Morgan J. (1995) Fos: an immediate-early transcriptionfactor in neurons. *J. Neurobiol.* 26: 403-412.
7. van Dam H., Wilhelm D., Herr I., Steffen A., Herrlich P., Angel P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinase to mediate c-Jun induction inresponse to genotoxic agents. *EMBO J*, 14(8): 1798-1811.
8. van Dam H., Castellazzi M. (2001) Distinct roles of Jun-Fos and Jun-ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* (2001) 20, 2453-2464.
9. Dragunow M., Preston K. (1995) The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain. Res. Brain. Rev.* 21: 1-28.
10. Ellis R., Yuan J., Horvitz R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 7: 663-698.
11. Estus S., Zaks W., Freeman R., Gruda M., Bravo R., Johnston E., (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-Jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 127:1717-1727.

12. Fliss H., Gattinger D. (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 79: 949-956.
13. Francois-Bellan A., Deprez P., Becquet D., (1999) Light induced variations in AP-1 binding activity and composition in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurochem.* 72:841-847.
14. Fuller S. Gaitanaki C., Sugden P. (1990) Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. *Biochem J* 266: 727-736.
15. Godfrey K. (1985) Comparing the means of several groups. *N Engl J Med* 313:1450-1456, 1985.
16. Gonzalez-Zulueta M. (1997) Role of nitric oxide in cell death. *B.I.F. FUTURA*, 12: 1-10.
17. Ham J., Babij C., Whitefield J., Pfarr C., Lallemand D., Yaniv M., Rubin L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14:927-939.
18. Herdegen T., Skene P., Bahr M., (1997) The c-Jun transcription factor-biopotent mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 20:227-231.
19. Herdegen T., Claret F., Kallunki T., Martin-Villalba A., Winter C., Hunter T., Karin M. (1998) Lasting N-terminal-phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J. Neurosci.* 18:5124-5135.
20. Herdegen T., Leah J. (1999) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.* 28:370-490.
21. Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kaminski K., Schaefer A., Park J.-K., Michel K., Quint A., Yaniv M., Weitzman J.,
22. Hiroi N., Marek G., Brown J., Ye H., Saudou F., Vaidya V., Duman R., Greenberg M., Nestler E. (1998) Essential role of the Fos gene in molecular, cellular, and behavioural actions of chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci.* 18:6952-6962.
23. Hughes P., Alexi T., Walton M., Williams C., Dragunow M., Clark R., Gluckman P. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 57:421-450.

24. Ikeda U., Tsuruya Y., Yakinuma T. (1991)  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation is coupled to cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 260: H953-H956.
25. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.
26. Kaminska B., Filipkowski R. K., Zurkowska G., Lason W., Przewlocki R., Kaczmarek L. (1994) Dynamic changes in the composition of the AP-1 transcription factor DNA-binding activity in rat brain following kainite-induced seizures and cell death. *Eur J Neurosci* 6: 1558-1566.
27. Kaminska B., Mosieniak G., Gierdalski M., Kossut M., Kaczmarek L. (1995) Elevated AP-1 transcription factor DNA binding activity at the onset of functional plasticity during development of rat sensory cortical areas. *Mol. Brain Res.* 33:295-304.
28. Kaminska B., Kaczmarek L., Chaudhuri A. (1996) Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex. *Neurosci.* 15:3968-3978.
29. Kaminska B., Pyrzynska B., Ciechomska I., Wisniewska M. (2000) Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp*, 60: 395-402.
30. Kasof G. M. Mandelzys A., Maika S. D., Hammer R.E., Curran T., Morgan J. L. (1995) Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and unique immediate-early gene response in c-Fos-lacZ transgenic rats. *J Neurosci* 15: 4238-4249.
31. Kataoka K., Noda M., Nishizawa M. (1994) Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*, 14: 700-712.
32. Kaczmarek L., Chaudhuri A. (1997) Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res. Rev.* 23:237-256.
33. Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F., Mahboubi A., Green D. (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell* 1:43-51.

34. Kerr J., Wyllie A., Currie A. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
35. Levy D., Garrison, R., Savage, D., Kannel, W. and Castelli, W. (1990) Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
36. Narula J, Haider N, Virmani R. (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.
37. Morgan H., Baker K. (1991) Cardiac Hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* 83: 13-25.
38. Morgan H., Jefferson L., Wolpert E. and Rannels D. (1971) Regulation of Proteinsynthesis in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 246:2163-2170.
39. Morgan J., Curran T., (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.* 18: 66-67-
40. Omura T., Yoshiyama M., Yoshida K., Nakamura Y., Kim S., Iwao H., Takeuchi K. und Yosikawa J. (2002) Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* 39: 81-86.
41. Park YG, Nesterova M, Agrawal S, Cho-Chung YS. Dual blockade of cyclic AMP response Element- (CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonukleotide. *J Biol Chem* 1999; 274 (3): 1573.
42. Pennypacker K., Walczak D., Thai L., Mason E., Douglas J., Hough J. (1993) Kainate-induces changes in opioid peptid gene and AP-1 protein expression in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 60:204-211.
43. Pennypacker K. (1998) AP-1 transcription factors: short and long-term modulators of gene expression in the brain. *Int Rev Neurobiol* 42: 169-197.
44. Pinson A., Schlüter K.-D. Zhou X., Schwarz G., Piper H.M. (1993) Alpha- und beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cel. Cardiol.* 20:825-835.
45. Piper H.M., Probst I, Schwartz P, Hutter FJ, Spieckermann PG. (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1982 Jul;14(7):397-412.
46. Pönicke K., Schlüter K.-D., Heinroth-Hoffmann I., Seyfarth T, Goldberg M., Osten B., Piper H.M., Brodde O.E. (2001) Noradrenalin induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: Involvement of only alpha 1 A-

- adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001 Nov; 364(5): 444-53.
47. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L-M. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circ* 1997; 95: 320-323.
48. Schlüter K.-D., Piper H.M. (1992) Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 263: H 1735-H1746
49. Schlüter K.-D., Zhou X.J., Piper H.M. (1995) Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.*, 1995 Nov; 269 (5 Pt 1): C 1311-6.
50. Schlüter K.-D. (1998) Untersuchungen zur Regulation der Proteinsynthese adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch hormonelle und neurohumorale Faktoren, Aachen: Shaker, ISBN 3-8265-3535-9.
51. Schlüter K.-D., Frischkopf K., Flesch M., Rosenkranz S., Taimor G., Piper H.M. (2000) Central role of decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 2000 Jan 14; 45 (2): 410-7.
52. Schneiders D., Heger J., Best P., Piper M., Taimor G. (2005) SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2005 Jul 1;67(1):87-96. Epub 2005 Mar 23.
53. Simm A., Schlüter K.-D., Diez C., Piper H.M. and Hoppe J. (1998) Activation of p70s6 kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J. Mol Cell Cardiol* 30, 2059-2067 Article No. mc 980768
54. Sonnenberg J., Macgregor-Leon P., Curran T., Morgan J. (1989) Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 3:359-365.
55. Suzuki H., Wildhirt SM., Dudek R., Narayan K., Bailey A., Bing R. (1996) Induction of apoptosis in myocardial infarction and its possible relationship to nitric oxide synthase in macrophages. *Tissue Cell*, 28: 89-97.
56. Taimor G., Lorenz H., Hofstaetter B., Schlüter K-D, Piper H.M. (1999) Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res*, 41: 147-156.
57. Taimor G., Schlüter K.-D., Frischkopf K., Flesch M., Rosenkranz S., Piper H.M. (1999) Autocrine regulation of TGF beta expression in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Dec; 31 (12) : 2127-36.

58. Taimor G., Hofstaetter B., Piper H.M. (2000) Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia. *Cardiovasc Res*, 45: 588-594.
59. Taimor G., Rakow A., Piper H.M. (2001) Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J EXPRESS*, 10: 1096/fj.01-0353fje.
60. Takemoto Y., Yoshiyama M., Takeuchi K., Omura T., Komatsu R., Izumi Y. Kim S. und Yoshikawa J. (1999) Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodelling. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 2017-2030.
61. Takeuchi J., Shannon W., Aronin N., Schwartz W. (1993) Compositional changes of AP-1 DNA –binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron* 11:825-836.
62. Volz A., Piper H.M., Siegmund B. Schwartz P. (1991) Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 23: 161-173.
63. Wildhirt S., Dudek R., Suzuki H., Pinto V., Narayan K., Bing R. (1995) Immunohistochemistry in the identification of nitric oxide synthase isoenzymes in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 29: 526-531.
64. Wildhirt S., Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichard B. (1999) Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 43: 698-711.
65. Wyllie A. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 555-556.
66. Wyllie A. (1997) Apoptosis and cancerogenesis. *Eur J Cell Biol*, 73 (3): 189-197.
67. Yoshioka K., Deng T., Caigelli M., Karin M. (1995) Antitumor promotion by phenolic antioxidants; inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:4972-4976.
68. Zhou X.J., Schlüter K.-D., and Piper H.M. (1996) Hypertrophic responsiveness to beta2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 196 Oct-Nov; 163/164: 211-216.

## 9 Publikation

### **Veröffentlichung:**

Taimor G., Schlüter KD., Best P., Helmig S., Piper HM. (2004 Juni) Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(6):H2369-75. Epub 2004 Feb 5. PMID: 14764439

Schneiders D., Heger J., Best P., Piper M., Taimor G. (2005 Juli) SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1;67(1):87-96. Epub 2005 Mar 23. PMID: 15949472

### **Poster:**

Schneiders D., Best P., Piper H. M., Taimor G. (2004 April) AP1-Dimere und assoziierte Transkriptionsfaktoren in hypertrophen und apoptotischen Kardiomyozyten. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, April 2004

## 10 Lebenslauf

Patrick Gerhard Best

Geburtsdatum-, ort: 29. März 1977 in Düsseldorf

Wohnort: Worms

Eltern: Dr. Gerhard H. Best  
Heidrun Best, geb. Maurer

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1983-1987 Grundschule Rüsselsheim/Meerbusch

1987-1997 Arndt-Gymnasium Krefeld/Rudi-Stephan-Gym. Worms

### Zivildienst:

1997-1998 Evangelisches Krankenhaus Hochstift Worms

### Hochschulbildung:

1998-2005 Justus-Liebig-Universität Giessen

2000 Ärztliche Vorprüfung

2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Approbation  
18.05.05)

### Stipendien:

2002–2004 Dreifacher Stipendiat der Hans-Kreutzer-Stiftung

### Beruflicher Werdegang:

1993-1997 Altenpflegeheim, Pflegehelfer Amandusstift Worms

1999- 2001 Pflegehelfer, Lahn-Dill Kliniken Wetzlar

2001-2002 Wissenschaftliche Hilfskraft, Physiologisches Praktikum,  
JLU-Giessen

2001-2003 Tutor, Medizinische Terminologie, JLU-Giessen

August 2005 Beginn der Tätigkeit als Arzt in der Klinik für Orthopädie  
und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Mannheim

## 11 Danksagung

Ganz besonders möchte ich Frau PD Dr. Gerhild Euler für die Ermöglichung dieser Arbeit danken. Sie stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und war mir durch ihre herzliche und geduldige Art immer eine große Stütze.

Herrn Prof. Dr. Dr. H.M. Piper möchte ich dafür danken, dass er die Grundvoraussetzungen für diese Arbeit geschaffen hat.

All meinen Kollegen im Physiologischen Institut möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Ganz besonderen Dank richte ich an Frau Daniela Schreiber, Frau Birgit Störr und alle anderen Technischen Assistenten für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Fr. Dr. Daniela Schneiders und den anderen Doktoranden des Instituts, die durch ein außergewöhnliches Arbeitsklima die Zeit am Institut und darüber hinaus wesentlich bereichert haben.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Mutter für ihre liebevolle Unterstützung. Nur durch ihre Unterstützung war es mir überhaupt möglich ein Studium zu absolvieren.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5158-0

