Die Rolle der p38 MAP-Kinase in der Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten

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

vorgelegt von Claudia Martina Müller
aus Ettlingen

Gießen 2004

Aus dem Physiologischen Institut

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

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter
Gutachter: Prof. Dr. Dr. J. Schaper

Tag der Disputation: 25.05.2005

„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.“

Gießen, 20. November 2004

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Pathophysiologie der hypertrophen Herzerkrankung 1

1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie 2

1.3 Signaltransduktion kardialer Hypertrophie 3

1.4 Rolle des Transforming-Growth-Factor-β in der hypertrophen Wachstumsregulation von Herzmuskelzellen 4

1.5 Rolle der Mitogen aktivierten Kinasen für die myokardiale Hypertrophie 6

1.6 Fragestellung 8

2 Material 9

2.1 Häufig verwendete Chemikalien 9

2.2 Geräte und Laborbedarf 10

2.2.1 Zellkultur 10
2.2.2 SDS-Gelelektrophorese 10
2.2.3 Elektrische Zellstimulation 11
2.2.4 Sonstige Geräte 11

2.3 Verbrauchsmaterialien 11

2.4 Auswertungs-Software 12

3 Methoden 13

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen 13

3.1.1 Versuchstiere 13
3.1.2 Präparation und Isolierung von Myozyten aus dem Rattenherz 13

3.2 Zellkultur 15

3.2.1 Vor- und Ausplattieren 15
3.2.2 Verwendung der Kardiomyozyten in Kurzzeit- beziehungsweise Langzeitkulturen 16

3.3 Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten 17

3.3.1 Probenvorbereitung 17
3.3.2 Elektrische Stimulation adulter Kardiomyozyten 17

3.4 Methoden zur Quantifizierung der Proteinsynthese sowie der RNA- und DNA-Synthese 18

3.4.1 Probengewinnung 18

3.4.2 Bestimmung der Proteinsynthese anhand der ^{14}C-Phenylalanin-Inkorporation 19
3.4.3 Ermittlung der RNA-Konzentration 20
3.4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration 20

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford 21

3.6 Protein-Gelelektrophoretische Methoden 21

3.6.1 Probenvorbereitung 21
3.6.2 Gelelektrophorese 22
3.6.3 Western-Blot-Verfahren 24
3.6.4 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot 25
3.6.5 Immunologischer Nachweis aktivierter p38 MAP-Kinase 26
3.6.6 Auswertung der Gele 27

3.7 Statistik 27

4 Ergebnisse 28

4.1 Expression verschiedener hypertrophierelevanter Proteinkinasen in Langzeitkulturen adulter Kardiomyozyten 28

4.2 β-adrenerg induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeit- und Langzeitkulturen 30

4.3 Einfluss adrenerger Stimulation auf die Proteinsynthese in Langzeitkulturen und deren Abhängigkeit von der Signaltransduktion der p38 MAP-Kinase 33

4.4 Einfluss von TGF-β auf die Expression der p38 MAP-Kinase in Langzeitkulturen 35

4.5 Einfluss von Hyperosmolarität auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase sowie auf die Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten 36

4.5.1 Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeitkulturen durch Hyperosmolarität 37
4.5.2 Einfluss von Hyperosmolarität auf die Proteinsynthese adulter Kardiomyozyten in Kurzzeitkulturen sowie deren Abhängigkeit von der p38 MAP-Kinase 38

4.6 Einfluss mechanischer Aktivität infolge elektrischer Stimulation auf die Proteinsynthese sowie auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten 40

4.6.1 Einfluss elektrischer Stimulation auf die Proteinsynthese adulter Kardiomyozyten 40
4.6.2 Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der durch elektrische Stimulation bedingten Steigerung der Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen 43

5 Diskussion 45

5.1 Einfluss von TGF-β auf die vermehrte Expression der p38 MAP-Kinase unter Kulturbedingungen 45

5.2 Rolle der p38 MAP-Kinase in der adrenergen Signaltransduktion myokardialer Proteinsynthesesteigerung 46

5.2.1 Signaltransduktion β-adrenerger Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten 46

5.2.2 Signaltransduktion α-adrenerger Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten 47

5.3 Einfluss mechanischer Aktivität auf die p38 MAP-Kinase sowie die myokardiale Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen 48

5.4 Schlussfolgerung 50

6 Zusammenfassung 53

7 Summary 54

8 Literaturverzeichnis 55

9 Publikationen 63

10 Lebenslauf 64

11 Danksagung 65

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
A	Ampère, Einheit der elektrischen Stromstärke
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammonium-Persulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
BDM	2,3-Butandionmonoxime
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie, Einheit für die Aktivität eines radioaktiven Stoffes
dpm	Zerfallsereignisse pro Minute (dots per minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	early response kinase (p42/44 MAP-Kinase)
FCS	Fötales Kälberserum
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
Hz	Frequenz in Hertz
IE	internationale Einheiten
Iso	Isoproterenol
kDa	Kilo-Dalton
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M	Mol, Einheit der Stoffmenge
NAC	N-Acetylcystein
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Konzentration
PI 3	Phosphatidylinositol-3
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylenediamine
TGF-β	Transforming growth factor β
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie der hypertrophen Herzerkrankung

Die myokardiale Hypertrophie stellt eine Adaptation physiologischer Zellfunktionen an eine funktionelle Mehrbelastung dar. Diese kann zum Beispiel in Form vermehrter Druck- oder Volumenarbeit beziehungsweise beider Faktoren vorliegen. Das Herz kompensiert die erhöhte Beanspruchung, in einem zunächst weitgehend reversiblen Prozess, über eine Zunahme der Wanddicke. Dies gelingt mittels Steigerung der Proteinsyntheserate, so dass bei gleichbleibender Zellzahl eine Zunahme des Zellvolumens resultiert.

Obwohl hypertrophes Wachstum eine physiologische Antwort auf zunehmende Arbeitsbelastung ist, kann es unter pathophysiologischen Bedingungen letztendlich zur Herzinsuffizienz führen. Als ein Beispiel hierfür ist die vermehrte Arbeitsbelastung bei chronisch arteriellem Hypertonus zu nennen, welcher eine häufige Ursache der klinisch manifestierten Herzinsuffizienz ist. Infolge des erhöhten arteriellen Blutdrucks vermag das Herz kurzfristig über eine Zunahme der Wandspannung den Druckgradienten zwischen Ventrikel und Aorta auszugleichen. Dieser Dehnungsreiz wirkt über einen noch nicht exakt geklärten Mechanismus als Wachstumsstimulus auf die Myokardzelle, so dass durch Erhöhung des Muskelfaserdurchmessers die Wandspannung konstant gehalten werden kann. Bei anhaltender Druckbelastung erreicht die myokardiale Volumenzunahme das sogenannte Kritische Herzgewicht, das heißt, die Herzmuskelmasse übersteigt die koronare Versorgungskapazität. Im Rahmen der Minderversorgung drohen ein Anstieg der Wandspannung sowie eine Gefügedilatation, die zu einer Abnahme der Leistungsfähigkeit des Herzens führen. Die Myokardhypertrophie ist als Hinweis auf eine sich entwickelnde chronische Herzinsuffizienz mit erhöhter Morbidität anzusehen (Levy et al., 1990). Entsprechend ist die Aufklärung ihres Pathomechanismus von großem klinischem Interesse.

1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie

Die Kultivierung isolierter Kardiomyozyten ermöglicht die gezielte Untersuchung kardialer Hypertrophie auf zellulärer Ebene. In definierten Medien können die Auswirkungen ausgesuchter neurohumoraler Faktoren in bekannten Wirkstoffkonzentrationen und unabhängig von deren hämodynamischer Wirkung untersucht werden. Dies stellt einen Vorteil gegenüber den Bedingungen in vivo dar. Da sich kultivierte Kardiomyozyten primär mechanisch inaktiv verhalten, bietet die Zellkultur den weiteren Vorteil zelluläre Reaktionen auf einzelne Stimuli, unabhängig von mechanischen Einflüssen, zu beurteilen. Andererseits können die Kardiomyozyten durch elektrische Stimulation auf eine vorgegebene Kontraktionsfrequenz eingestellt und somit die Verhältnisse am schlagenden Herzen simuliert werden. Dadurch gelingt eine Annährung an die physiologischen Bedingungen mit der Möglichkeit, gezielt die Auswirkungen mechanischer Aktivität auf die Proteinsynthese der Kardiomyozyten zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden zur Erforschung Hypertrophie-induzierender Stimuli und deren spezifischer Signaltransduktion zwei Kulturmodelle mit unterschiedlicher Kulturdauer gewählt. Die Gewinnung der Herzmuskelzellen aus den Ventrikeln adulter Ratten war in beiden Fällen identisch. In den sogenannten Kurzzeitkulturen werden frisch isolierte Kardiomyozyten bereits wenige Stunden nach ihrer Gewinnung zu Versuchszwecken genutzt und über maximal 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Sie bestehen aus stäbchenförmigen Zellen, die in ihrer Morphologie und ihren metabolischen Eigenschaften im Wesentlichen den Bedingungen in vivo entsprechen. Über 24-36 Stunden verfügen diese Kulturen über einen stabilen Proteinstoffwechsel, zeigen darauf allerdings infolge eines veränderten Proteinmetabolismus eine kulturbedingte Atrophie (Volz et al., 1991). Entsprechend eignen sich Kurzzeitkulturen nur über einen begrenzten Zeitraum für Hypertrophieexperimente. In Langzeitkulturen werden die Herzmuskelzellen vor Durchführung der Experimente über sechs Tage mit 20% fötalem Kälberserum im Medium kultiviert. Kardiomyozyten in Langzeitkulturen reagieren auf diese Kulturbedingungen mit Veränderungen ihrer Zellmorphologie; das ursprünglich längliche Zellsoma bildet zahlreiche Ausläufer aus und imponiert als sternförmige abgeflachte Figur. Serumkultivierte Herzmuskelzellen behalten trotz ihrer morphologischen Veränderungen ihre metabolischen Eigenschaften bei (Spahr et

al.,1989). Sie eignen sich daher auch für Beobachtungen längerfristiger zellulärer Reaktionen.

Kulturmodelle für Kardiomyozyten existieren sowohl für neonatale als auch für Herzmuskelzellen des adulten Tieres. Da die kardiale Hypertrophie vor allem im Erwachsenenalter auftritt und entsprechend die adulten Zellen hypertrophen Stimuli ausgesetzt sind, wurden in dieser Arbeit ausschließlich adulte Herzmuskelzellen verwendet.

1.3 Signaltransduktion kardialer Hypertrophie

In vivo ist die Entstehung einer Myokardhypertrophie und letztendlich auch einer Herzinsuffizienz von einer neurohumoralen Aktivierung begleitet (Morgan und Baker, 1991). Dabei ist neben einem erhöhten Katecholamin-Plasmaspiegel auch ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System nachweisbar. In Anbetracht der klinischen Relevanz dieser Erkrankung besteht ein hohes Interesse daran aufzuklären, auf welche Weise diese unterschiedlichen Faktoren die Proteinsynthese der Kardiomyozyten beeinflussen.

Katecholamine wirken an ihren Zielzellen, mit unterschiedlicher Affinität, über α- beziehungsweise β-Adrenozeptoren. In vivo ist sowohl eine α- als auch eine β-adrenerg induzierte myokardiale Hypertrophie beschrieben worden. Unter den Bedingungen der Zellkultur ist diese zelluläre Reaktion verändert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Bartolome et al. (1980), die in vivo eine β-adrenerg induzierte Hypertrophie beschrieben haben, wurde im Zellkulturmodell frisch isolierter Kardiomyozyten eine Proteinsynthesesteigerung nur nach α-adrenerger Stimulation, nicht aber nach einem β-adrenergen Stimulus nachgewiesen (Fuller et al., 1990; Schlüter und Piper, 1992). Dagegen reagieren serumkultivierte Herzmuskelzellen, entsprechend den Verhältnissen in vivo, auch auf einen β-adrenergen Stimulus mit einer Steigerung ihrer Proteinsynthese (Pinson et al., 1993). Es wird vermutet, dass das unterschiedliche Verhalten adrenerger Rezeptoren in den verschiedenen Kulturmodellen in einer differierenden Rezeptor-Ankopplung an die Hypertrophie-induzierende Signaltransduktion begründet ist.

Die Signalstransduktion der α-agonistischen Katecholaminwirkung auf die myokardiale Proteinsynthese konnte im Zellkulturmodell aufgeklärt werden. Über die Proteinkinase C, die PI 3-Kinase sowie die $p70^{s6}$-Kinase erhöht α-Adrenozeptor-Stimulation die Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen (Pönicke et al., 2001).

Die Signaltransduktion β-adrenerger Hypertrophie ist nur unvollständig bekannt und lässt sich aufgrund fehlender hypertropher Ansprechbarkeit des Rezeptors in Kurzzeitkulturen nicht untersuchen. Eine Untersuchung derjenigen zellulären Mechanismen, die nach β-adrenerger Stimulation myokardiale Hypertrophie bedingen, ist allerdings, aufgrund ihrer oben genannten Eigenschaften, an serumkultivierten Kardiomyozyten möglich. Schlüter et al. (1998) und Simm et al. (1998) zeigten, dass β-adrenerge Stimulation mit Isoproterenol zwar im Verlauf eine identische Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation wie die α-adrenerge Stimulation benutzt, nämlich die Aktivierung der PI 3-Kinase und der $p70^{s6}$-Kinase; die initial an der α-adrenergen Signaltransduktion beteiligte Proteinkinase C wird dabei jedoch nicht aktiviert. Stattdessen aktiviert β-adrenerge Stimualtion die cAMP-abhängige Proteinkinase A. Die Identifizierung derjenigen Signaltransduktionsmoleküle, die eine Ankopplung β-adrenerger Stimulation an die Aktivierung der PI 3-Kinase und damit an die hypertrophe Wachstumsregulation der Zelle bedingen, ist noch Gegenstand der Forschung.

1.4 Rolle des Transforming-Growth-Factor-β in der hypertrophen Wachstumsregulation von Herzmuskelzellen

Wie bereits erwähnt, reagieren serumkultivierte Kardiomyozyten, im Gegensatz zu frisch isolierten Zellen, auf β-adrenerge Stimulation mit einer Proteinsynthesesteigerung. Eine mögliche Ursache dieser hypertrophen Ansprechbarkeit β-adrenerger Rezeptoren in serumkultivierten Kardiomyozyten ist, dass die Zellen in diesem Kulturmodell dem Wachstumsfaktor TGF-β ausgesetzt sind. Nach Untersuchungen von Taimor et al. (1999) wird TGF-β von den Kardiomyozyten in das umgebende Milieu abgegeben und von den im Serum enthaltenen Proteasen in seine aktive Wirkform überführt.

Untersuchungen von Schlüter et al. (1995) zeigten, dass TGF-β in vitro ursächlich an der Induktion β-adrenerg vermittelter Hypertrophie in serumkultivierten Herzmuskelzellen beteiligt ist. TGF-β bedingt dabei eine Anbindung der Proteinkinase A an die PI 3-Kinase gekoppelte hypertrophe Wachstumsregulation (Schlüter et al., 1995, 1999). Der entsprechende Rezeptorsubtyp, der dadurch an die hypertrophe Wachstumsregulation ankoppelt, wurde als der β_2-Adrenozeptor identifiziert (Zhou et al., 1996). Die detaillierte Signaltransduktion, die nach β_2-adrenerger Stimulation zu einer Steigerung der Proteinsynthese führt, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Auch in vivo konnte die Bedeutung des Wachstumsfaktors TGF-β für die myokardiale Wachstumsregulation durch verschiedene Studien belegt werden, die eine vermehrte Produktion von TGF-β unter den Bedingungen kardialer Hypertrophie nachweisen (Everett et al., 1994; Villarreal et Dillmann, 1992). Ebenso konnte in Untersuchungen mit spontan hypertensiven Ratten eine vermehrte myokardiale Expression von TGF-β beim Übergang von einer adaptiven Hypertrophie zur Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Boluyt et al., 1994). Auch bei Menschen, die unter einer idiopathischen hypertrophen Kardiomyopathie leiden, wurde eine vermehrte Expression von TGF-β im Myokard beobachtet (Li et al., 1997). Insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen scheint TGF-β im Herzen an Bedeutung zu gewinnen. Vermutlich spielt es eine wichtige Rolle beim Übergang einer kompensierten zu einer dekompensierten Myokardhypertrophie, indem es über die trophische Ankopplung β_2-adrenerger Rezeptoren zur Dysregulation myokardialer Wachstumsvorgänge beiträgt.

Abbildung 1.1: Signaltransduktion α- und β-adrenerg induzierter Proteinsynthesesteigerung in adulten Kardiomyozyten

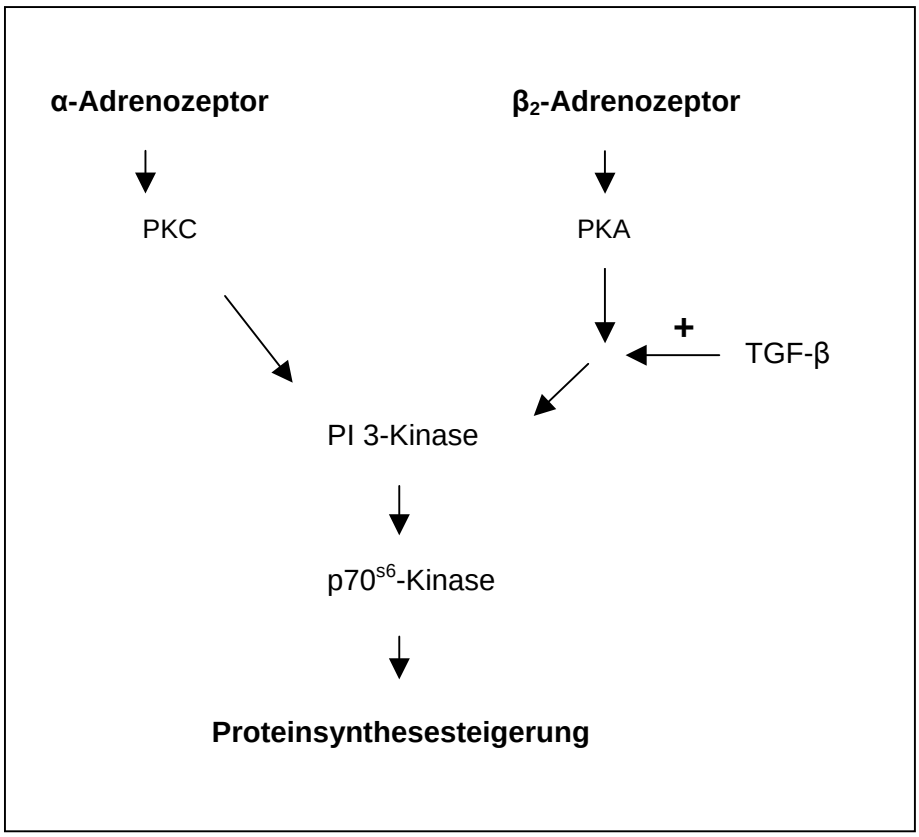

Abb. 1.1: Dargestellt ist die Signaltransduktion gesteigerter Proteinsynthese durch α- beziehungsweise β_2-adrenerge Stimulation in kultivierten adulten Kardiomyozyten der Ratte. Der β_2-Adrenozeptor aktiviert zunächst die Proteinkinase A (PKA) und ist in Anwesenheit von TGF-β an die PI 3-Kinase und nachfolgende Schritte hypertropher Wachstumsregulation angekoppelt. Die Proteinkinase C (PKC) bedingt die Anbindung α-adrenerger Stimulation an die hypertrophe Signaltransduktion.

1.5 Rolle der Mitogen aktivierten Kinasen für die myokardiale Hypertrophie

Es gibt Hinweise darauf, dass Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen), wie zum Beispiel die p42/44 MAP-Kinase (ERK) oder die p38 MAP-Kinase, in die hypertrophe Wachstumsregulation des Herzens involviert sind (Strinskova et al., 2002; Sugden, 2001). So konnte zum Beispiel eine direkte wachstumsinduzierende Wirkung von Angiotensin über die Aktivierung der p42/44 MAP-Kinase in neonatalen Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Yamazaki et al.,1999). Auch im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsprozessen ist die Bedeutung der MAP-Kinasen unbestritten; hierbei induzieren sie über eine Kaskade mehrerer

Phosphorylierungsschritte Transkriptionsprozesse im Zellkern (Bogoyevitch, 2000). Ein besonderes Interesse gilt der p38 MAP-Kinase, welche nach Studien von Wang et al. (1998) an der Progression einer Myokardhypertrophie beteiligt zu sein scheint. Weiterhin ist an transgenen Mäusen, die eine erhöhte Aktivität der p38 MAP-Kinase aufweisen, die vermehrte Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie beschrieben worden (Zhang et al., 2000). Ob die p38 MAP-Kinase unter diesen Bedingungen eine Rolle in der hypertrophen Wachstumsregulation der Herzmuskelzellen spielt beziehungsweise auf welche Weise sie in die Signaltransduktion gesteigerter Proteinsynthese eingebunden ist, ist allerdings noch Gegenstand der Forschung. An neonatalen Kardiomyozyten konnte, zumindest für einen klassischen hypertrophen Stimulus wie der α_1-Adrenozeptor-Stimulation, die Unabhängigkeit der hypertrophen Signaltransduktion von der p38 MAP-Kinase belegt werden (Clerk et al., 1998). In früheren Arbeiten, ebenfalls an neonatalen Kardiomyozyten, wurde allerdings auch gezeigt, dass Charakteristika myokardialer Hypertrophie durch passive Zelldehnung induzierbar sind (Komuro et al., 1990, 1991). Entsprechend ist hypertrophes Wachstum nicht unbedingt von einer Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktion abhängig. Dies belegen auch die Ergebnisse von Aikawa et al. (2002), die an neonatalen Kardiomyozyten eine signifikante Proteinsynthesesteigerung infolge mechanischer Belastung nachweisen. Parallel zu der Proteinsynthesesteigerung beobachteten die Autoren auch eine deutliche Aktivierung der p38 MAP-Kinase.

Welche Bedeutung die MAP-Kinasen für die Wachstumsregulation adulter Herzmuskelzellen haben, wird weiterhin untersucht. Da die Arbeitsleistung der Kardiomyozyten wesentlich mit einer Veränderungen der Zellmorphologie verbunden ist, zum Beispiel bei der systolischen Zellkontraktion beziehungsweise der passiven Zelldehnung durch Vorlasterhöhung, könnten auch in adulten Zellen mechanische Einflüsse einen wichtigen hypertrophen Stimulus darstellen. Entsprechend den Ergebnissen an neonatalen Kardiomyozyten, konnten vorherige in vitro-Studien die mechanische Belastung adulter Herzmuskelzellen als einen unabhängigen Wachstumsstimulus identifizieren (Wada et al., 1996 und Decker et al., 1997). Eine Beteiligung der MAP-Kinasen an dieser mechanisch induzierten Proteinsynthesesteigerung wird vermutet.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Zellkulturmodell adulter Kardiomyozyten der Ratte die Signaltransduktion β-adrenerg induzierter Wachstumsregulation untersucht. Dabei wurde insbesondere auf folgende Fragestellungen eingegangen:

1. Treten unter den Bedingungen der Zellkultur Veränderungen in der Expression von Signalmolekülen auf, die an der hypertrophen Wachstumsregulation beteiligt sind?
2. Sind diese Signalmoleküle an der β-adrenerg induzierten Proteinsynthesesteigerung beteiligt?
3. Besteht eine Abhängigkeit der verstärkten Expression bestimmter Signaltransduktionsmoleküle von der Wirkung des Wachstumsfaktors TGF-β?
4. Können andere hypertrophe Stimuli diesen Signaltransduktionsweg unabhängig von einer Kultivierung mit TGF-β benutzen?

2 Material

2.1 Häufig verwendete Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin	Sigma, Taufkirchen
APS	Serva, Heidelberg
Ascorbinsäure	Fluka, Taufkirchen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BCIP	Applichem, Darmstadt
2,3-Butandionmonoxime (BDM)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cytosin-β-Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Isoproterenol	Sigma, Taufkirchen
MAP-Kinase Antikörper	Calbiochem, Bad Soden
Medium 199/Earl’s Salts	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Mercaptopropanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
NBT	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
^{14}C-Phenylalanin	Amersham, Freiburg
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
SB 202190	Calbiochem, Bad Soden
SDS	Merck, Darmstadt
SDS-6H-Molecular Weight Standard	βSigma, Taufkirchen
Saccharose	Merck, Darmstadt

Taurin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Bad Soden) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen
Gewebehacker	Harvard Apparatus, USA
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan

2.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Netzgerät	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen

2.2.3 Elektrische Zellstimulation

Netzgerät	Biometra, Göttingen
Schalen	Eigenbau mit Six-wells Schalen Typ Falcon 3046, Werkstatt des Physiologisches Instituts, Justus-Liebig-Universität Gießen

2.2.4 Sonstige Geräte

Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Amersham, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.3 Verbrauchsmaterialien

Immobilon P	Millipore, Eschborn
Hybond-N Nylon, 0,45 Micron	Amersham, Braunschweig
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, Typ Falcon 3046 Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsgefäß	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Einweg-Zellschaber	Typ Falcon 3087, Becton Dickinson, Heidelberg

2.4 Auswertungs-Software

Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld

3 Methoden

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Wistar-Ratten entstammten der Züchtung des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Giessen und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin®) und Wasser. Zur Gewinnung der Kardiomyozyten wurden ausschließlich adulte männliche Tiere mit einem Lebendgewicht von 300-400 g verwendet.

3.1.2 Präparation und Isolierung von Myozyten aus dem Rattenherz

Vor Beginn der Präparation wurde eine Langendorff-Perfusionsanlage mit Powell-Medium befüllt und auf 37°C erwärmt. Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und ihnen anschließend das Genick gebrochen. Ohne Verzug wurde der Thorax in der Mittellinie eröffnet, das Herz mitsamt der Lunge im oberen Mediastinum abgetrennt und in eine vorbereitete Petrischale mit 4˚C kalter physiologischer Kochsalzlösung eingebracht. Nach Entfernung der Lungenlappen sowie anhängender Gewebereste erfolgte die retrograde Perfusion des Herzens über die Aorta ascendens mittels der Langendorff-Apparatur. Dabei wurde zunächst das in den Herzhöhlen verbliebene Blut mit Powell-Medium ausgewaschen. Über die anschließenden 25 Minuten wurde das Herz mit 50 ml Collagenase-Puffer rezirkulierend mit einer Flussrate von 2-3 ml pro Minute perfundiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurden Aorta und Vorhöfe abgetrennt und allein die ventrikulären Anteile weiter verwendet. Diese wurden mittels eines Skalpells grob geviertelt und durch einen Gewebehacker jeweils zweimal längs und quer mit einer Schnittstärkeneinstellung von 07 bearbeitet. Der entstandene Zellbrei, der sich überwiegend noch aus Zellkonglomeraten zusammensetzte, wurde mit 30 ml Collagenasepuffer versetzt und unter ständiger Carbogen-Begasung im Wasserbad für zehn Minuten nachverdaut. Dabei unterstützte vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die weitere Vereinzelung der Herzmuskelzellen.

Nachfolgend ermöglichte die Verwendung eines Nylonnetzes mit einer Porengröße von 200 µm das Abfiltrieren von Zelltrümmern und Geweberesten. Die gewonnene Suspension wurde drei Minuten bei 25 x g zentrifugiert und der Collagenase-Puffer im Überstand abgesaugt. Das verbliebene Zellmaterial wurde darauf mit Powell-Medium, welches eine Calcium-Konzentration von 200 µM aufwies, resuspendiert. Dieser Schritt wiederholte sich nach erneuter gleichartiger Zentrifugation, allerdings mit einer auf 400 µM erhöhten Calcium-Konzentration im Powell Medium. Die dadurch erhaltene Suspension verteilte man auf mit Gradientenlösung gefüllte Reagenzgläser, deren Anzahl den präparierten Herzen entsprach. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation erhielt man eine Zellpopulation, welche zu 40-60% aus intakten stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

Powell-Medium:

NaCl	110 mM
$NaHCO_3$	25 mM
KCl	2,6 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
Glukose	11 mM
Mg_2SO_4 x H_2O	1,2 mM

Collagenase-Puffer:

Powell-Medium	50 ml
Collagenase	20 mg (chargenabhängig)
Calcium-Stammlösung (100 mM)	12,5 µl

Gradienten-Lösung:

Powell-Medium	x ml
Albumin	4 % (wt/vol)
$CaCl_2$	1 mM

3.2 Zellkultur

3.2.1 Vor- und Ausplattieren

Um zu gewährleisten, dass sich die intakten Kardiomyozyten an den Kulturschalen anheften, wurden diese für mindestens vier Stunden bei 37℃ mit Vorinkubationsmedium beschichtet, welches kurz vor dem Ausplattieren wieder abgesaugt wurde.

Zum Ausplattieren wurden die gewonnenen Herzmuskelzellen in bereits auf 37℃ vorgewärmtes CCT-Kulturmedium aufgenommen und mittels einer Glaspipette auf die Schalen gegeben. Durchschnittlich wurde die Zellsuspension eines präparierten Herzens in 20 ml CCT-Kulturmedium resuspendiert und die vorbereiteten Falcon-Schalen mit jeweils etwa 1 ml befüllt. Die angelegte Zellkultur eines Herzens entsprach dabei etwa 20 Kulturschalen. Im Mittel wurde eine Zelldichte auf den Schalen von etwa 5×10^4 erzielt.

Um nach dem Ausplattieren eine Anheftung der intakten Kardiomyozyten am Boden der Kulturschalen zu ermöglichen, erfolgte zunächst eine Inkubation über zwei bis vier Stunden bei 37℃ unter CO_2-freien Bedingungen im Brutschrank. Durch anschließendes einmaliges Waschen und Befüllen der Schalen mit 1 ml CCT-Kulturmedium wurden abgerundete oder nicht haftende Zellen entfernt. Die dadurch erhaltene Zellpopulation setzte sich zu 90% aus intakten stäbchenförmigen Kardiomyozyten zusammen und konnte nach einer Ruhephase von mindestens 20 Minuten zu Versuchszwecken genutzt werden.

<u>Vorinkubationsmedium:</u>

M199/HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

M199/HEPES gepuffert:

Medium 199/Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mM

Auf pH 7,4 titriert und steril filtriert

CCT-Kulturmedium:

M199/HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mM
Carnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM

Auf pH 7,4 titriert und steril filtriert

3.2.2 Verwendung der Kardiomyozyten in Kurzzeit- beziehungsweise Langzeitkulturen

Die unter 3.1.2 gewonnenen isolierten Kardiomyozyten waren nach dem Ausplattieren und Anheften auf den Kulturschalen sowohl als Langzeit- als auch als Kurzzeitkulturen verwendbar. Kurzzeitkulturen wurden nach dem Ausplattieren in CCT-Kulturmedium inkubiert, am gleichen Tag entsprechend des Versuchsprotokolls verwendet und innerhalb von 24 Stunden geerntet. Die Zellkontur blieb hierbei stäbchenförmig.

Zur Gewinnung von Langzeitkulturen wurden die Kardiomyozyten nach dem Ausplattieren über höchstens sechs Tage in CCT-Kulturmedium mit einem Serumanteil von 20% im Brutschrank bei 37℃ inkubie rt. Darauf konnten die Kulturen nach mindestens zweimaligem Waschen mit 1 ml CCT zu Versuchszwecken verwendet werden, indem sie in serumfreien CCT-Kulturmedium entsprechend dem Versuchprotokoll inkubiert und innerhalb von 24 Stunden geerntet wurden.

Kurzzeitkulturmedium:

CCT-Kulturmedium	x ml
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Ascorbinsäure	100 µM

Langzeitkulturmedium:

CCT-Kulturmedium	x ml
FCS	20% (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/l

3.3 Elektrische Stimulation der Kardiomyozyten

3.3.1 Probenvorbereitung

Die Herzmuskelzellen wurden auf bereits vorplattierte Six-wells vom Typ Falcon 3046 ausplattiert. Die Deckel der Kulturschalen hatte die hauseigene Werkstatt dergestalt mit Drähten versehen, dass auf dem Niveau der anhaftenden Zellen ein Stromfluss erzeugt werden konnte. Dies wurde durch zwei am Deckel fixierte, gegenüberliegende U-förmige Drahtschlingen ermöglicht, die parallel zueinander dem Schalenboden auf einer Länge von etwa 1,5 Zentimetern auflagen. Der Abstand zwischen den beiden Schlingen entsprach dabei etwa zwei Dritteln des Schalendurchmessers. Indem die gegenüberliegenden Drähte jeweils mit den entgegengesetzten Polen eines Netzgerätes verbunden wurden, konnten die Kardiomyozyten mittels elektrischer Stimulation auf eine vorgegebene Schlagfrequenz eingestellt werden.

3.3.2 Elektrische Stimulation adulter Kardiomyozyten

Nach Inkubation der Zellen mit den dem Versuchsprotokoll entsprechenden Substanzen und Verwendung des präparierten Deckels, erfolgte die elektrische Stimulation. Über maximal 24 Stunden wurden die Herzmuskelzellen mit einer Frequenz von 0,5 Hz bei 37℃ im Brutschrank stimuli ert. Die Zellernte diente, je nach

Zielsetzung und Aufbau des Versuches, als Probenmaterial für anschließende gelelektrophoretische Methoden oder aber der Quantifizierung biochemischer Prozesse, wie in 3.4 beschrieben.

3.4 Methoden zur Quantifizierung der Proteinsynthese sowie der RNA- und DNA-Synthese

Der Nachweis vermehrter Proteinsynthese innerhalb des Versuchszeitraumes erfolgte anhand des Einbaus von radioaktiv markierten Phenylalanin (^{14}C-Phenylalanin) in zelleigenes Protein. Diese Aminosäure wird von adulten Kardiomyozyten der Ratte weder synthetisiert noch metabolisiert (Morgan et al.,1971), sondern dient allein als Substrat der Proteinsynthese. Über die radioaktive Markierung der Aminosäure gelang im β-Counter deren Quantifizierung anhand der gemessenen Zerfallsereignisse pro Minute. Die Anzahl der gemessenen Zerfallsereignisse entsprach dabei einem Mittelwert aus dem Messzeitraum von fünf Minuten. Die Einbaurate von Phenylalanin diente als Maß für die zelluläre Proteinsynthese. Sie errechnete sich aus dem Verhältnis zwischen der Phenylalaninfraktion, die im Überstand zurückblieb sowie derjenigen, die in der Proteinsynthese verbraucht und in zelleigenes Protein eingebaut worden war. Die erste Fraktion ließ sich aus der Aktivität im Medium bestimmen, die zweite Fraktion wurde aus dem Zellhydrolysat der Kardiomyozyten bestimmt (3.4.1). Die Messung von RNA- und DNA-Gehalt erfolgte photometrisch ebenfalls aus dem Zellhydrolysat (siehe 3.4.3 und 3.4.4).

3.4.1 Probengewinnung

Die verwendeten Kurzzeit- oder Langzeitkulturen wurden nach einmaligem Waschen mit CCT in 1ml ^{14}C-Phenylalanin-haltigem Medium über 24 Stunden bei 37℃ im Brutschrank inkubiert. Je nach Versuchsprotokoll wurden ausgewählten Agenzien zugegeben. Zur Beendigung der Inkubation wurde das Induktionsmedium abgesaugt und die Schalen einmalig mit 1 ml kaltem PBS gewaschen.

Die Proteinfraktion des Überstandes wurde durch Zugabe von 1 ml 10%iger TCA-Lösung (wt/vol) je Kulturschale bei 4℃ über Nacht gefällt. Am darauffolgenden

Tag wurden 500 µl je Schale entnommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Zerfallsereignisse, als Maß für enthaltenes ^{14}C-Phenylalanin, im β-Counter gezählt. Die ermittelte Aktivität entsprach der Aminosäurenfraktion, die nicht in der zellulären Proteinsynthese verbraucht worden war, dem sogenannten Precursorpool.

Der folgende Arbeitsgang diente der Gewinnung von Probenmaterial zur Bestimmung der intrazellulären Parameter: RNA-, DNA- und Proteingehalt der Kardiomyozyten. Nach Entnahme des Precursorpools wurde die restliche Flüssigkeit auf der Kulturschale verworfen und diese einmalig mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, bevor die am Boden haftenden Zellen mit 1 ml 1 N NaOH/0,01% SDS (wt/vol) für ein bis zwei Stunden bei 37℃ im Brutschrank hydrolysie rt wurden. Das gewonnene Zellhydrolysat diente in den folgenden Arbeitsschritten der Bestimmung von RNA-, DNA- und Proteingehalt der Kardiomyozyten.

Induktionsmedium:

CCT-Kulturmedium	x ml
^{14}C-Phenylalanin	0,1 µCi/ml
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Ascorbinsäure	100 µM

10xPBS:

NaCl	150 mM
NaH_2PO_4 x H_2O	4 mM
Na_2HPO_4 x H_2O	16 mM
Auf pH 7,3 titriert	

3.4.2 Bestimmung der Proteinsynthese anhand der ^{14}C-Phenylalanin-Inkorporation

Zur Bestimmung derjenigen ^{14}C-Phenylalaninfraktion, die in zelluläres Protein eingebaut worden ist, entnahm man von dem unter 3.4.1 gewonnenen Zellhydrolysat 250 µl und versetzte diese mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit. Anschließend wurden im β-Counter die Zerfallsereignisse pro Minute gemessen. Anhand des Verhältnisses von ^{14}C-Phenylalanin im Zellhydrolysat und im Überstand (3.4.1) errechnete sich die

Einbaurate in zelluläres Protein. Als Referenzwert wurden im β-Counter zusätzlich die Zerfallsereignisse der Szintillationsflüssigkeit allein bestimmt.

3.4.3 Ermittlung der RNA-Konzentration

Grundlage für die Bestimmung des RNA-Gehaltes der Proben war das unter 3.4.1 gewonnene Zellhydrolysat. Davon wurden 500 µl entnommen und die gleiche Menge 10%ige TCA-Lösung (wt/vol) hinzugegeben, um über Nacht bei 4℃ die Proteinfraktion zu fällen. Anschließend wurden die Proben über 15 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und der im Überstand befindliche RNA-Gehalt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich ermittelte man als zu subtrahierenden Leerwert die Extinktion des Ansatzes bei 320 nm. Die Extinktion von 1 OD entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

3.4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte im Anschluss an die unter 3.4.3 beschriebene RNA-Messung. Der zur RNA-Messung dienende Überstand wurde zuvor vorsichtig abpipettiert. Das nach der Zentrifugation am Boden des Eppendorf-Gefäßes verbliebene Pellet wurde mit je 250 µl 1 N NaOH/0,01% SDS (wt/vol) und 10%iger TCA-Lösung (wt/vol) resuspendiert. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit Acridin-Orange im Verhältinis 1:100 (Stocklösung 600 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur über ein bis zwei Stunden unter Lichtabschluss inkubiert. Daraufhin bestimmte man im Mikrotiterplatten-Fluoreszenzmessgerät bei 485 nm die Anregungswellenlänge und bei 538 nm die Emissionswellenlänge. Zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes wurden die gewonnenen Messwerte mit einer Eichkurve verrechnet, die mit DNA aus Salmontestes, gelöst in 1N NaOH/0,01% SDS (wt/vol), in Konzentrationen zwischen 0 und 2,0 mg/ml erstellt wurde.

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte nach Bradford et al. (1976) mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brillant Blue G-250. Aus dem unter 3.4.1 gewonnen Zellhydrolysat wurde von jeder Schale, jeweils in dreifacher Ausführung, 10 µl auf eine Mikrotiterplatte übertragen und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Dabei ließ sich, je nach Proteingehalt der Probe, bereits ein deutlicher Farbumschlag in den Blaubereich erkennen, da die Proteinbindung des enthaltenen Farbstoffes eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm bewirkte. Daher konnte nachfolgend eine Bestimmung des Proteingehaltes der Proben, anhand des beigefügten Standards, über deren Extinktion bei 595 nm im Photometer erfolgen. Zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge diente als Standard BSA gelöst in 1N NaOH/0,01% SDS (wt/vol) in den Konzentrationen 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brillant Blue G-250	0,1 % (wt/vol)
96 % Methanol	5 % (vol/vol)
85 % ortho-Phosphorsäure	10 % (vol/vol)
Aqua bidest. ad 1 l	

3.6 Protein-Gelelektrophoretische Methoden

3.6.1 Probenvorbereitung

Als Probenmaterial für die Gelelektrophorese dienten sowohl Kurzzeit- als auch Langzeitkulturen, wie unter 3.2 beschrieben, beziehungsweise auch elektrisch stimulierte Kardiomyozyten aus Kurzzeitkulturen (siehe 3.3). Nach Beendigung des Versuches wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturschalen mit den haftenden Herzmuskelzellen einmalig mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer je Schale und Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bewirkte eine Auflösung der Zellmembranen sowie beginnende Ablösung der Zellen. Das im Puffer enthaltene Natrium-ortho-Vanadat diente der Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Zum Verdau der

Nukleinsäuren wurde daraufhin Benzonase (Endkonzentration auf der Schale 50 U/ml) zugefügt und die Kulturschalen über weitere 15 Minuten auf dem Schüttler belassen. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 50 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt. Für weitere 15 Minuten erfolgte bei 60℃ im Eppendorf-Inkubator die Denaturierung des enthaltenen Proteins. Die Proben standen nun zur weiteren Verwendung bereit und konnten bei –80℃ gelagert werden.

Lysispuffer:

Tris/HCl	50 mM
SDS	2 % (wt/vol)
Mercaptopropanol	10 % (vol/vol)
Natrium-ortho-Vanadat (1 mM)	10 % (vol/vol)
pH 6,7	

2xLaemmli-Puffer:

Tris/HCl	0,5 mM
Glycerin	25 % (vol/vol)
SDS (10 %ig)	4 % (wt/vol)
Mecaptopropanol	1 % (vol/vol)
Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)
pH 6,8	

3.6.2 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte als SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese Technik erlaubt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine auf der Basis des Molekulargewichtes. Verwendung fanden ausschließlich diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, wobei sich die beiden Fraktionen in der Konzentration von Acrylamid und dessen Verhältnis zu Bisacrylamid unterschieden. Nach dem Beladen des Gels mit jeweils 25 µl Probenmaterial aus der Zellernte erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 40 mV. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Protein-

Molekulargewichtsmarker zwischen 29 und 205 kDa (SDS-6H-Molecular Weight Standard) gleichzeitig auf das Gel aufgetragen.

Trenngel:

AA/BAA (100:1)	12,5 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml
Aqua bidest.	10 ml
APS 10 % (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl
SDS 10 % (wt/vol)	300 µl

4x Trenngelpuffer:

Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (wt/vol)
ph 8,8	

Sammelgel:

AA/BAA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest.	6,4 ml
APS 10 % (wt/vol)	100 µl
TEMED	12 µl
SDS 10 % (wt/vol)	150 µl

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (wt/vol)
pH 6,8	

Die angegebenen Mengenangaben waren ausreichend für jeweils zwei Gele.

Laufpuffer (SDS-Page):

Glycin	1,44 % (wt/vol)
Tris/HCl	0,3 % (wt/vol)
SDS	0,1 % (wt/vol)
Aqua bidest. ad 1l	

3.6.3 Western-Blot-Verfahren

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im „semi-dry-blotting-Verfahren“ elektrophoretisch nach Kyhse-Andersen (1984) auf eine PVDF Membran transferiert. Dazu wurden zunächst drei Blatt Filterpapier mit konzentriertem Anodenpuffer durchtränkt und luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer aufgelegt. Darüber kam gleichermaßen behandeltes Papier mit Anodenpuffer sowie die in 70%iges Methanol und Anodenpuffer getauchte Blotmembran zu liegen. Vorsichtig wurde nun das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel luftblasenfrei auf die Blotmembran aufgebracht. Den Abschluss bildeten drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere sowie die Kathode der Blotkammer. Der Proteintransfer erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm^2.

Konzentrierter Anodenpuffer:

Tris/HCl	300 mM
Methanol	20 % (vol/vol)
pH 10,4	

Anodenpuffer:

Tris/HCl	30 mM
Methanol	20 % (vol/vol)
pH 10,4	

Kathodenpuffer:

Tris/HCl	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20 % (vol/vol)
pH 9,4	

3.6.4 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot

Der Einsatz spezifischer Antikörper ermöglichte die optische Darstellung einer bestimmten Proteinfraktion auf der PVDF-Membran. Verwendung fanden hier zweierlei Antikörper, wobei der Erstantikörper an die gewünschte Proteinfraktion auf der PVDF-Membran bindet, der Zweitantikörper dagegen an den Fc-Teil des Erstantikörpers. Um diese Reaktionen optisch darzustellen und zu quantifizieren, war der Zweitantikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert, welches bei Kontakt mit der Entwicklerlösung eine Farbreaktion auslöst, die mit steigender Enzymmenge an Intensität gewinnt.

Nach abgeschlossenem Proteintransfer (3.6.3) erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Inkubation der PVDF-Membran über mindestens zwei Stunden in 2 % BSA (wt/vol) in TBS-Puffer. Darauf wurde die Membran zweimal über fünf Minuten mit TBS gewaschen und während zwei Stunden bei Raumtemperatur im Erstantikörper inkubiert, bevor wiederum die Membran drei mal zehn Minuten mit 0,1 % Triton (vol/vol) in TBS-Puffer gewaschen wurde. Darauf erfolgte eine zweistündige Inkubation im Zweitantikörper, bevor sich wiederum ein Waschvorgang über je drei mal fünf Minuten mit 0,5 % Triton (vol/vol) in TBS-Puffer anschloss. Durch Zugabe der Entwicklerlösung wurden die detektierten Proteine auf der bisher weiß erscheinenden Membran als violette Banden sichtbar. Diese Reaktion beruht, wie oben erwähnt, auf der Enzymwirkung der Alkalischen Phosphatase. Das in der Entwicklerlösung enthaltene 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) wird reduziert und präzipitiert mit dem Farbstoff Nitro Blue Tetrazolium (NBT) als violette Substanz. Die Entwicklung der PVDF-Membran erfolgte in Dunkelheit über ein bis fünf Minuten bei Raumtemperatur und wurde durch Einbringen der PVDF-Membran in Aqua bidest. beendet.

TBS:

Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
ph 7,4	

Antikörperlösung:

Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,05 % (vol/vol)
BSA	2 % (vol/vol)
ph 7,4	

Die jeweils eingesetzten Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 mit der Antikörperlösung verdünnt.

Entwicklerlösung:

AP-Puffer	40,0 ml
BCIP	5,2 mg
NBT	13,2 mg

AP-Puffer:

Tris/HCl	100 mM
$MgCl_2$	5 mM
NaCl	10 mM
ph 9,5	

3.6.5 Immunologischer Nachweis aktivierter p38 MAP-Kinase

Als Maß für den Aktivierungsgrad der p38 MAP–Kinase ist die Ausprägung ihrer Phosphorylierung anzusehen. Da der Nachweis der Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAP-Kinase nicht auf einem Gel geführt werden konnte, wurden gleiche Mengen an Probenmaterial (25 µl) in gleicher Reihenfolge auf zwei Gele aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine und dem erfolgten Proteintransfer auf die PVDF-Membran, wurden die beiden identisch

beladenen Gele in zwei unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. Von diesen bindet einer an die gesamt dargestellte p38 MAP-Kinase, entsprechend phosphorylierten und nicht phosphorylierten Anteilen, während der andere spezifisch die phosphorylierte Form der p38 MAP–Kinase bindet. Der Anteil der phosphorylierten Form an der gesamt dargestellten p38 MAP-Kinase entsprach deren Aktivierungsgrad.

3.6.6 Auswertung der Gele

Die densitometrische Quantifizierung der Banden auf der PVDF-Membran erfolgte auf dem PC mit Hilfe des Programms Image Quant® (Molecular Dynamics, Krefeld).

3.7 Statistik

Die Messwerte wurden als Mittelwerte ± der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) unter Nutzung des Student–Newmann–Keuls–Testes durchgeführt. Wurden zwei Gruppen verglichen, fand der T-TEST Anwendung. Differenzen mit $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Expression verschiedener hypertrophierelevanter Proteinkinasen in Langzeitkulturen adulter Kardiomyozyten

Aufgrund der unterschiedlichen hypertrophen Ansprechbarkeit des β-Adrenozeptors in Kurzzeit- und Langzeitkulturen wurden serumkultivierte Kardiomyozyten auf eine veränderte Expression von Signaltransduktionsmolekülen untersucht, deren Beteiligung an der hypertrophen Wachstumsregulation des Herzens bekannt ist. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die p38 MAP-Kinase, die p42/44 MAP-Kinase (ERK), die Proteinkinase B (PKB) sowie Isoformen der Proteinkinase C wurde deren Expression über SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Technik quantifiziert. Die Kardiomyozyten wurden über maximal fünf Tage kultiviert und täglich ein Anteil der Kulturschalen geerntet.

Die Expression der p38 MAP-Kinase war ab dem dritten Tag der Zellkultur gegenüber dem Kontrollniveau (Expression am Tag eins der Zellkultur) signifikant erhöht und blieb bis zum fünften Tag auf signifikant erhöhtem Niveau. Die Expression von p42/44 MAP-Kinase, Proteinkinase B (PKB) und Isoformen der Proteinkinase C blieb unverändert (Abb. 4.1.1 und 4.1.2).

Abbildung 4.1.1: Expression verschiedener Signaltransduktionsmoleküle in Langzeitkulturen adulter Kardiomyozyten

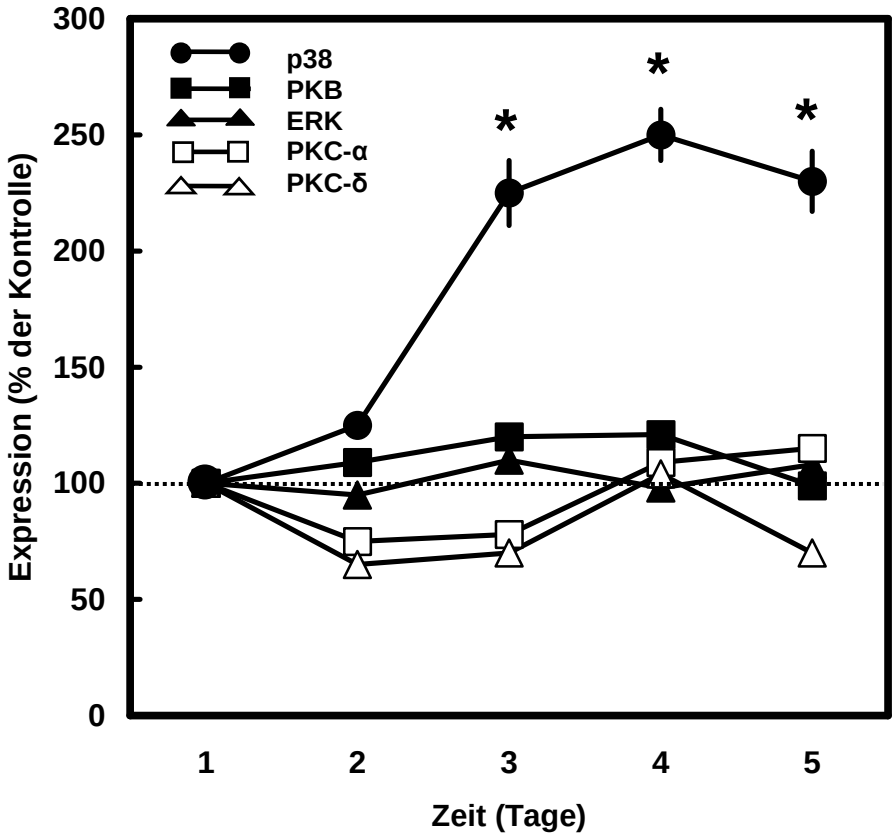

Abb. 4.1.1: Serumkultivierte Kardiomyozyten zeigen ab dem dritten Tag der Zellkultur eine signifikant erhöhte Expression der p38 MAP-Kinase. Die Expression der p42/44 MAP-Kinase (ERK), der Proteinkinase B (PKB) sowie der PKC α und PKC δ blieben unverändert. Die Kardiomyozyten wurden über längstens fünf Tage in Anwesenheit von aktiviertem TGF-β kultiviert und täglich die Expression der verschiedenen Proteinkinasen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Kulturen, * = p < 0,05 vs. Expression am Tag eins der Kultur.

Abbildung 4.1.2: Repräsentative Western-Blots zeigen die Expression jeweils einer Proteinkinase in serumkultivierten Kardiomyozyten im Verlauf von fünf Tagen

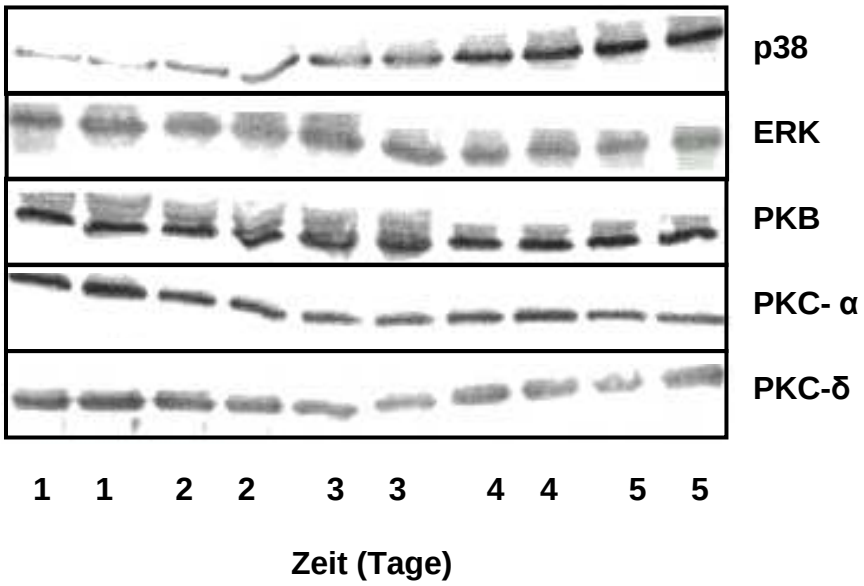

Abb. 4.1.2: Dargestellt sind fünf repräsentative Western-Blots, welche jeweils die Ausprägung der Expression einer Proteinkinase im Verlauf von fünf Tagen zeigen. Ab dem dritten Tag der Zellkultur ist die vermehrte Expression der p38 MAP-Kinase deutlich an der intensiveren Bandenfärbung zu erkennen. Die weiteren Proteinkinasen PKC α, PKC δ, PKB und p42/44 MAP-Kinase (ERK) zeigen über den gleichen Zeitraum keine signifikante Änderung der Bandenintensität.

4.2 β-adrenerg induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeit- und Langzeitkulturen

Wie unter 4.1 beschrieben, exprimieren serumkultivierte Kardiomyozyten vermehrt das Signaltransduktionsmolekül p38 MAP-Kinase. Um einen vermuteten Zusammenhang zwischen der hypertrophen Ansprechbarkeit β-adrenerger Rezeptoren in Langzeitkulturen und der hier ebenfalls beobachteten vermehrten Expression der p38 MAP-Kinase aufzuklären, wurde jeweils an serumkultivierten als auch an frisch isolierten Kardiomyozyten untersucht, inwieweit die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion β-adrenerger Rezeptoren integriert ist. Die Tatsache, dass die p38 MAP-Kinase durch eine spezifische Phosphorylierung in ihre aktive Wirkform überführt wird, ermöglichte es, anhand des Anteils von phosphorylierter Form an der

gesamt nachgewiesenen p38 MAP-Kinase, den Aktivierungsgrad der p38 MAP-Kinase zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass in Kurzzeitkulturen nach 60-minütiger β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol, gegenüber unstimulierten Kontrollen, eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase nachweisbar war. Ein kürzerer Stimulus von lediglich 30 Minuten bewirkte dagegen keine signifikante Aktivierung. Die nach dem gleichen Versuchsprotokoll erhobenen Ergebnisse an Langzeitkulturen zeigten ebenfalls eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase erst nach 60-minütiger Stimulation mit Isoproterenol, gegenüber dem Kontrollniveau unstimulierter Kardiomyozyten. Entsprechend war sowohl in Kurzzeit- als auch in Langzeitkulturen, also unabhängig von TGF-β, eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach β-adrenerger Stimulation nachweisbar (Abb. 4.2.1).

Abbildung 4.2.1: Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Isoproterenol in Kurzzeit- und Langzeitkulturen

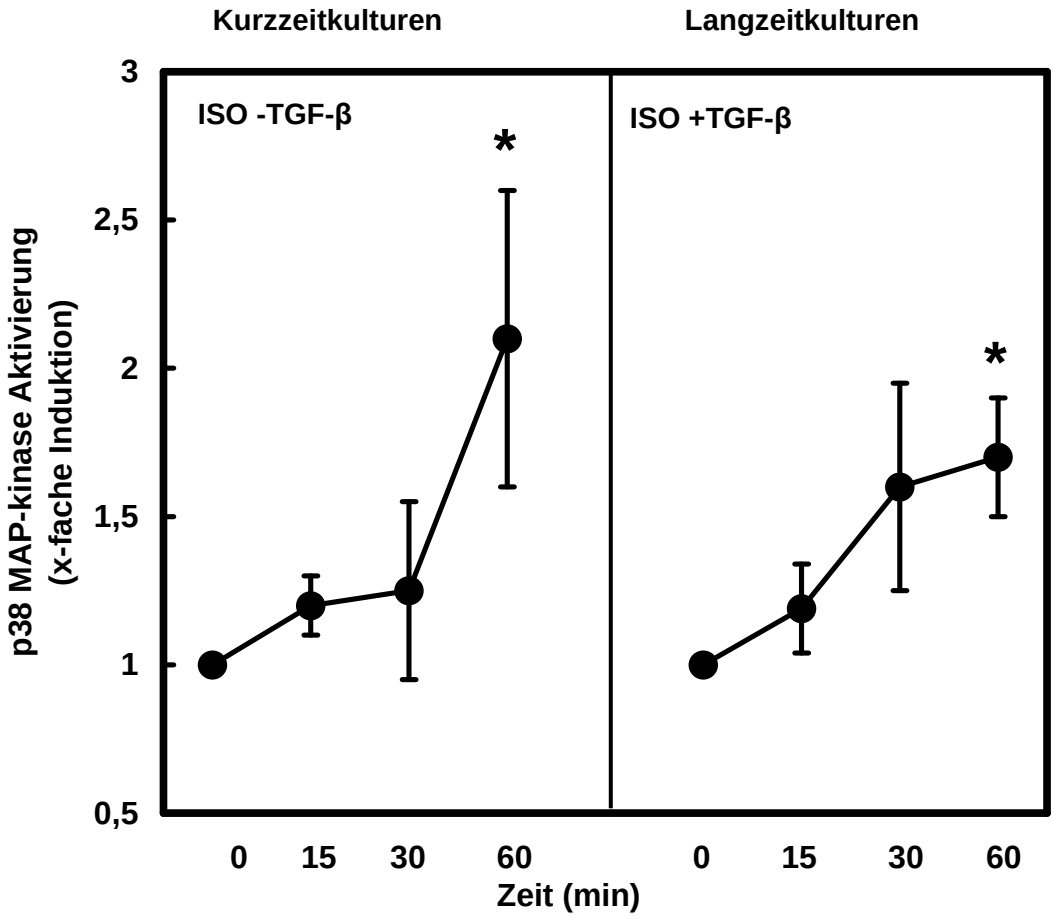

Abb. 4.2.1: Dargestellt ist die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeit- und Langzeitkulturen adulter Kardiomyozyten. Isoproterenol aktiviert nach 60-minütiger Stimulation, unabhängig von TGF-β, die p38 MAP-Kinase signifikant. Die Herzmuskelzellen wurden jeweils über 15, 30 und 60 Minuten mit Isoproterenol (Iso, 100 nM) stimuliert. Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase über Western-Blots bestimmt. Als Kontrollen dienten nicht-stimulierte Kardiomyozyten jeweils jeder Kultur. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Kulturen, * = p < 0,05 vs. Kontrolle.

4.3 Einfluss adrenerger Stimulation auf die Proteinsynthese in Langzeitkulturen und deren Abhängigkeit von der Signaltransduktion der p38 MAP-Kinase

Vorherige Versuche zeigten, dass Isoproterenol gleichermaßen in Kurzzeit- und Langzeitkulturen die p38 MAP-Kinase aktiviert. Unter Berücksichtigung der unter 4.1 beschriebenen Ergebnisse wurde im Folgenden untersucht, ob die β-adrenerg induzierte Hypertrophie serumkultivierter Kardiomyozyten abhängig von der Signaltransduktion der p38 MAP-Kinase ist. Die Zellen wurden zunächst über sechs Tage kultiviert. Die Proteinsyntheserate der Herzmuskelzellen nach adrenerger Stimulation sowohl mit Isoproterenol als auch mit Phenylephrin wurde anhand des Einbaus von ^{14}C-Phenylalanin untersucht. Zusätzlich wurde ein Anteil der Kulturschalen mit der Substanz SB 202190 versetzt, welche ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP-Kinase ist. Da die p38 MAP-Kinase nicht in die Signaltransduktion α-adrenerger Wachstumsregulation involviert ist, wurde die Spezifität von SB 202190 dadurch untersucht, dass Kardiomyozyten der gleichen Präparation sowohl mit als auch ohne Vorinkubation mit SB 202190 mit dem α-Sympathomimetikum Phenylephrin stimuliert wurden. Zum anderen wurden die Kardiomyozyten allein mit SB 202190 inkubiert.

Die erhobenen Ergebnisse an Langzeitkulturen zeigten, dass diese sowohl nach β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol (100 nM) als auch nach α-adrenerger Stimulation mit Phenylephrin (10 µM) eine gegenüber nicht-stimulierten Kontrollen signifikante Steigerung zum einen der Inkorporation von ^{14}C-Phenylalanin zum anderen der Gesamtproteinmenge aufwiesen. Dabei unterschieden sich die Einbauraten nach α- und β-adrenergem Stimulus nicht signifikant voneinander. Die durch Isoproterenol-vermittelte Steigerung der Proteinsyntheserate konnte durch Hemmung der p38 MAP-Kinase mit SB 202190 signifikant inhibiert werden. Die α-adrenerg induzierte Proteinsynthesesteigerung blieb auch nach Vorinkubation mit SB 202190 signifikant erhöht. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der p38 MAP-Kinase für die β-adrenerg induzierte Hypertrophie in Langzeitkulturen. Die Inkubation der Kardiomyozyten mit SB 202190 allein ergab keinen Effekt hinsichtlich der Proteinsyntheserate (Abb. 4.3.1).

Abbildung 4.3.1: α- und β-adrenerg induzierte Proteinsynthesesteigerung in Langzeitkulturen und Hemmung β-adrenerger Effekte durch SB 202190

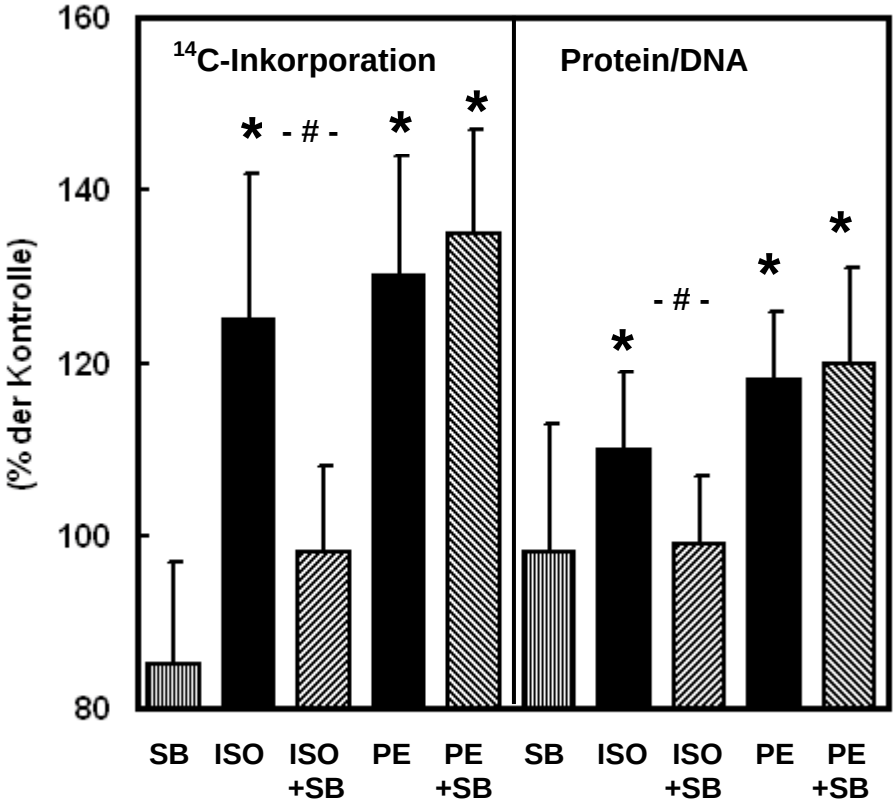

Abb. 4.3.1: In Langzeitkulturen induziert sowohl Isoproterenol (Iso, 100 nM) als auch Phenylephrin (PE, 10 µM) eine signifikante Steigerung der Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten: Links dargestellt anhand der ^{14}C-Phenylalanin-Inkorporation, rechts dargestellt anhand des Protein/DNA-Verhältnisses. Im Gegensatz zur α-adrenergen Stimulation mit Phenylephrin konnte die β-adrenerg-vermittelte Proteinsynthesesteigerung durch Vorinkubation der Kardiomyozyten mit SB 202190 (SB, 1 µM) signifikant gehemmt werden. Inkubation allein mit SB 202190 (SB, 1 µM) bleibt ohne Auswirkungen auf die Proteinsynthese. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 5 Kulturen. * = p < 0,05 vs. Kontrolle, # = p < 0,05 Isoproterenol bei Vorinkubation mit SB vs. alleiniger β-adrenerger Stimulation.

4.4 Einfluss von TGF-β auf die Expression der p38 MAP-Kinase in Langzeitkulturen

Wie unter 4.1 dargestellt, zeigen Langzeitkulturen adulter Kardiomyozyten eine vermehrte Expression der p38 MAP-Kinase. Nachfolgend wurde ein vermuteter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von aktiviertem TGF-β und der gleichzeitig beobachteten vermehrten Expression der p38 MAP-Kinase untersucht. Dies gelang durch Hemmung der TGF-β Wirkung im serumhaltigem Milieu mittels neutralisierender TGF-β-Antikörper. Die Kardiomyozyten wurden über drei beziehungsweise sechs Tage kultiviert. Jeweils die Hälfte der Kulturschalen wurden mit TGF-β-Antikörpern versetzt, die übrigen Kulturschalen wurden unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert und geerntet, um darauf im Western-Blot Verfahren die Expression der p38 MAP-Kinase zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Inhibition der TGF-β-Wirkung durch neutralisierende TGF-β-Antikörper nach drei- beziehungsweise sechstägiger Kultivierung eine erhöhte Expression der p38 MAP-Kinase beobachtet werden konnte (Abb. 4.4.1).

Abbildung 4.4.1: Expression der p38 MAP-Kinase in Langzeitkulturen bei vorhandener und fehlender TGF-β-Wirkung

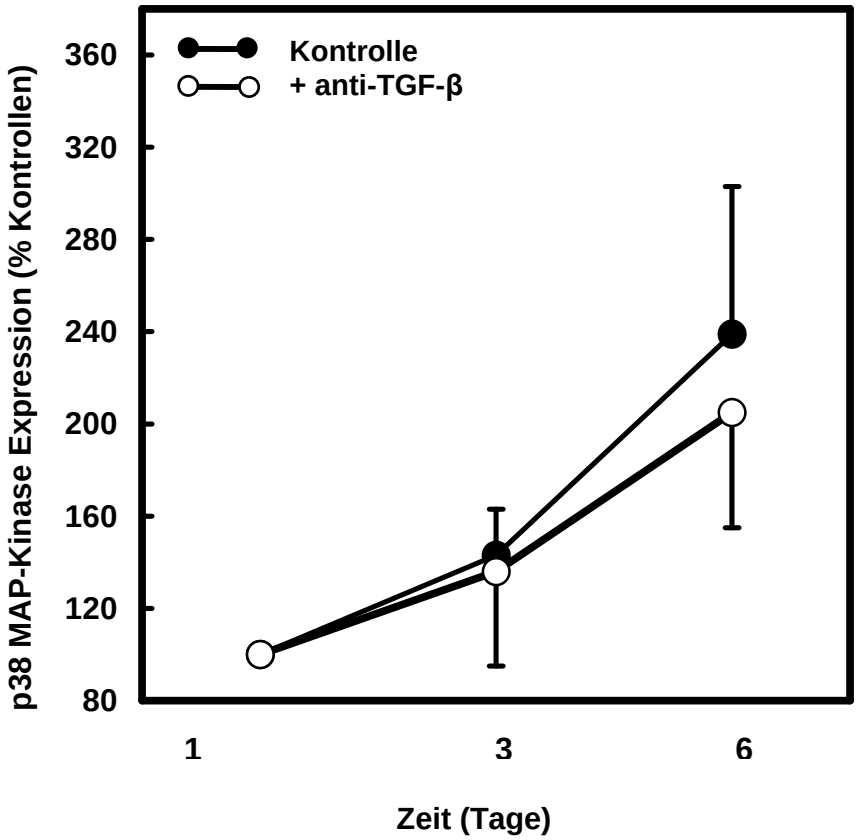

Abb. 4.4.1: Zugabe von neutralisierenden TGF-β-Antikörpern zum Kulturmedium hat keinen Effekt auf die gesteigerte Expression der p38 MAP-Kinase in Langzeitkulturen. Die Kardiomyozyten wurden über drei beziehungsweise sechs Tage mit TGF-β-Antikörpern inkubiert. Die Kontrollen erhielten keine weiteren Zusätze. Die quantitative Auswertung erfolgte nach SDS-Gelelektrophorese über Western-Blot-Technik. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Kulturen.

4.5 Einfluss von Hyperosmolarität auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase sowie auf die Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten

Nach den oben beschriebenen Ergebnissen ließ sich als ein möglicher Grund fehlender β-adrenerger Hypertrophie in Kurzzeitkulturen eine nicht ausreichende Expression der p38 MAP-Kinase in den frisch isolierten Zellen vermuten. Die folgenden Versuche basierten auf der Fragestellung, ob - wie bei der Kultivierung in serumhaltigem Milieu - eine hypertrophierelevante Induktion der p38 MAP-Kinase

auch in frisch isolierten Kardiomyozyten möglich ist. Als Einflussparameter wurde eine mechanische Belastung der Kardiomyozyten gewählt. Dies erzielte man durch hyperosmolares Kulturmedium, welches über einen Wasserverlust der Zelle eine Belastung des Zytoskeletts bewirkt.

4.5.1 Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeitkulturen durch Hyperosmolarität

Unter Versuchsbedingungen wurden die Kardiomyozyten über 24 Stunden in hyperosmolarem Medium inkubiert. Die Kontrollen wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen in normoosmolarem Medium kultiviert. Der Nachweis der Aktivierung der p38 MAP-Kinase erfolgte wiederum mit Hilfe der spezifischen Antikörper für die phosphorylierte sowie gesamt dargestellte Form der p38 MAP-Kinase. Anhand des Verhältnisses von phosphorylierter Form zu gesamt nachweisbarer p38 MAP-Kinase gelang die Bestimmung des Aktivierungsgrades.

Nach 24-stündiger Inkubation in hyperosmolarem Medium (Saccharose 150 mM) war im Western-Blot eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAP-Kinase nachweisbar. Diese war gegenüber dem Kontrollniveau normoosmolar kultivierter Kardiomyozyten um 51 (± 12) % signifikant vermehrt (Mittelwerte aus n = 3 Kulturen ± SEM, * = $p < 0,05$ hyperosmolar kultivierter Kardiomyozyten gegenüber normoosmolaren Kulturbedingungen).

Abbildung 4.5.1: Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Hyperosmolarität

C C Hyperos. Hyperos.

Abb. 4.5.1: Repräsentativer Western-Blot zeigt die Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach 24-stündiger Inkubation in hyperosmolarem Medium (Hyperos., Saccharose 150 mM). Die Aktivierung ist an der intensiveren Bandenfärbung erkennbar, welche dem Molekulargewicht der phosphorylierten Form der p38 MAP-Kinase entspricht. Die Kontrollen (C) wurden über 24 Stunden unter normoosmolaren Bedingungen kultiviert.

4.5.2 Einfluss von Hyperosmolarität auf die Proteinsynthese adulter Kardiomyozyten in Kurzzeitkulturen sowie deren Abhängigkeit von der p38 MAP-Kinase

Unter 4.5.1 wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten auf die Kultivierung im hyperosmolarem Milieu mit einer vermehrten Aktivierung der p38 MAP-Kinase reagieren. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Herzmuskelzellen unter gleichen Bedingungen eine veränderte Proteinsynthese aufweisen und ob diese im Zusammenhang mit der Aktivierung der p38 MAP-Kinase steht. Dazu wurde anhand des Einbaus von ^{14}C-Phenylalanin die Proteinsynthese hyperosmolar kultivierter Kardiomyozyten, im Vergleich zu normoosmolar kultivierten Herzmuskelzellen, jeweils mit und ohne Vorinkubation mit SB 202190 bestimmt.

Die Untersuchungen an hyperosmolar kultivierten Kardiomyozyten belegten zum einen, dass diese auf die Kulturbedingungen mit einer signifikant erhöhten Proteinsynthese reagierten. Diese war im Vergleich zu den Kontrollen unter normoosmolaren Bedingungen um etwa 50 % erhöht (Abb. 4.5.2). Zum anderen unterstreichen die Ergebnisse einen vermuteten Zusammenhang zwischen der Aktivierung der p38 MAP-Kinase und konsekutiver Proteinsynthesesteigerung in hyperosmolar kultivierten Kardiomyozyten. Die Hemmung der p38 MAP-Kinase mit SB 202190 inhibierte die zuvor beobachtete Proteinsynthesesteigerung der hyperosmolar kultivierten Kardiomyozyten signifikant (Abb. 4.5.2).

Abbildung 4.5.2: Proteinsynthesesteigerung in hyperosmolar kultivierten Kurzzeitkulturen sowie deren Hemmung durch SB 202190

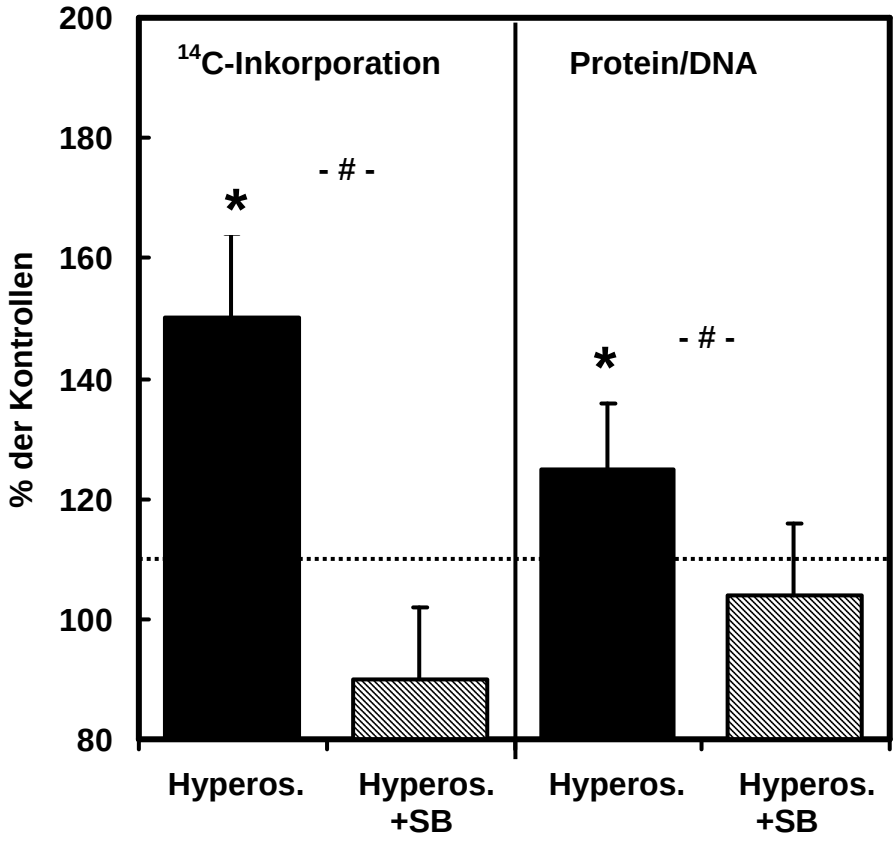

Abb. 4.5.2: links: Die Inkorporation von ^{14}C-Phenylalanin ist nach 24-stündiger Inkubation in hyperosmolarem Medium (Saccharose 150 mM) gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Eine Vorinkubation mit SB 202190 (SB, 1 µM) inhibiert diesen Effekt wiederum signifikant. Rechts: Das Protein-DNA Verhältnis ist ebenfalls in hyperosmolar kultivierten Kardiomyozyten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht und erreicht unter SB wieder das Kontrollniveau. Die Kontrollen wurden über 24 Stunden mit ^{14}C-Phenylalanin in normoosmolarem Medium kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Kulturen, * = p < 0,05 vs. Kontrolle, # = p < 0,05 Vorinkubation mit SB vs. alleiniger hyperosmolarer Inkubation

4.6 Einfluss mechanischer Aktivität infolge elektrischer Stimulation auf die Proteinsynthese sowie auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten

Wie unter 4.5 beschrieben, scheint die p38 MAP-Kinase an der Proteinsynthesesteigerung in hyperosmolar kultivierten Kardiomyozyten beteiligt zu sein. Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit eine mechanische Belastung, wie sie zum Beispiel unter physiologischen Bedingungen im schlagenden Herzen vorkommt, ähnliche zelluläre Reaktionen bedingt. Die gleichmäßige mechanische Aktivität wurde im Zellkulturmodell durch elektrische Stimulation der Kardiomyozyten erreicht. Die Differenzierung, ob der elektrische Reiz allein beziehungsweise die resultierende Kontraktion zelluläre Reaktionen induziert, erfolgte durch Verwendung von 2,3-Butandionmonoxime (BDM, 20 mM). BDM unterbindet die Interaktion von Aktin und Myosinfilamenten und inhibiert somit, trotz elektrischer Stimulation, die Kontraktion der Herzmuskelzelle.

4.6.1 Einfluss elektrischer Stimulation auf die Proteinsynthese adulter Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden über einen Zeitraum von zwei, vier oder vierundzwanzig Stunden elektrisch stimuliert, jeweils über maximal 24 Stunden unter Anwesenheit von ^{14}C-Phenylalanin inkubiert und die Proteinsynthese anhand des Einbaus der radioaktiv markierten Aminosäure bestimmt.

Es wurde nachgewiesen, dass die Herzmuskelzellen auf vier- und vierundzwanzigstündige elektrische Stimulation mit 0,5 Hz mit einer, gegenüber nicht-stimulierten Kontrollen, signifikant erhöhten Proteinsynthese reagierten. Dagegen unterschied sich die Proteinsynthese derjenigen Kardiomyozyten, die lediglich einer zweistündigen elektrischer Stimulation ausgesetzt waren, nicht signifikant von der ruhender Kontrollen (Abbildung 4.6.1.1).

Inwieweit die beobachtete Proteinsynthesesteigerung allein auf die mechanische Beanspruchung zurückzuführen ist, wurde nachfolgend untersucht, indem bei ansonsten gleichem Versuchsprotokoll ein Teil der Kulturschale vor einer vierstündigen elektrischen Stimulation mit BDM (20 mM) versetzt wurde. Dabei

konnte gezeigt werden, dass die zuvor beobachtete Proteinsynthesesteigerung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten mit der mechanischen Beanspruchung der Zellen zusammenhängt. Durch Entkopplung von elektrischer Stimulation und resultierender Kontraktion wurde die zuvor beobachtete Steigerung der Proteinsynthese signifikant inhibiert (Abbildung 4.6.1.2).

Abbildung 4.6.1.1: Einfluss elektrischer Stimulation auf die Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten

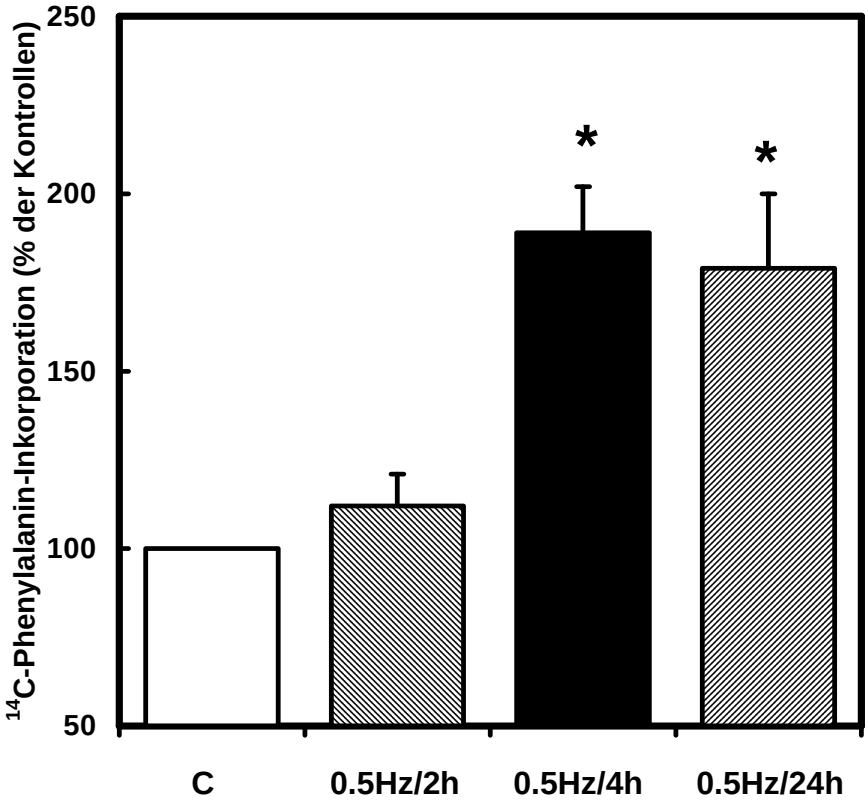

Abb. 4.6.1.1: Dargestellt ist die Proteinsyntheserate in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten. Die Zellen wurden über zwei, vier und 24 Stunden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert (0,5Hz/2h; 0,5Hz/4h; 0,5Hz/24h) und die Proteinsynthese über die Inkorporation von ^{14}C-Phenylalanin über 24 Stunden bestimmt. Sowohl vierstündige als auch 24-stündige elektrische Stimulation bewirkte eine signifikant gesteigerte Proteinsynthese. Die Kontrollen (C) unterlagen keiner elektrischen Stimulation und wurden ebenfalls über 24 Stunden kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Kulturen, * = p < 0,05 vs. ruhende Kontrollen.

Abbildung 4.6.1.2: Hemmung der Proteinsynthesesteigerung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten durch 2,3-Butandionmonoxime (BDM)

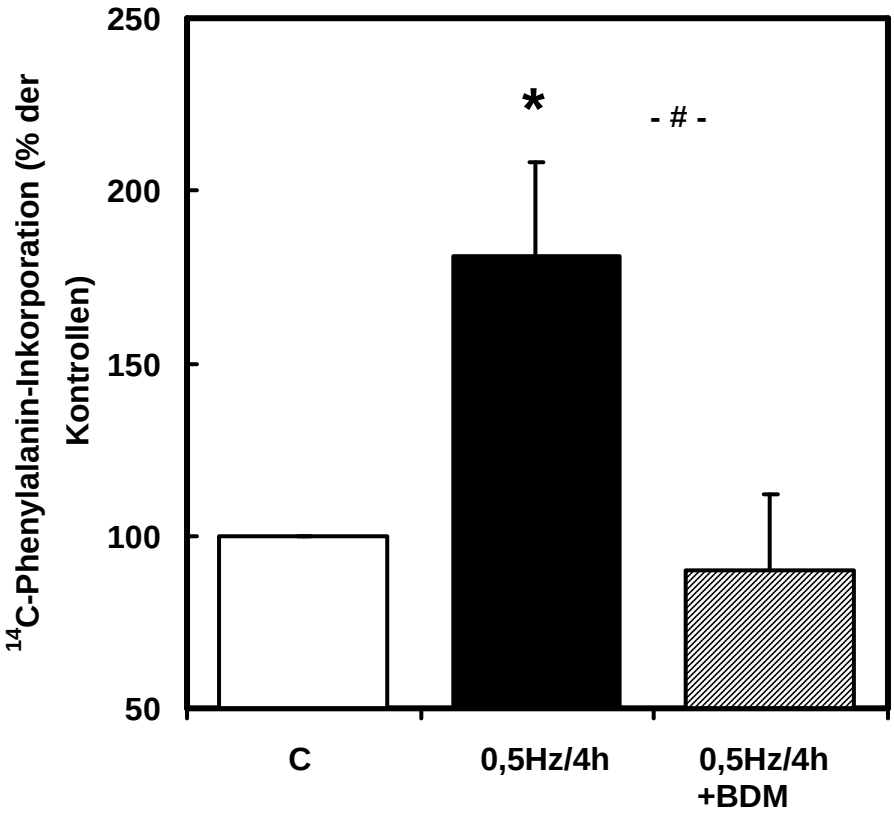

Abb. 4.6.1.2: Dargestellt ist die Proteinsyntheserate in Kurzzeitkulturen adulter Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten waren über vier Stunden einer elektischen Stimualtion mit 0,5 Hz ausgesetzt (0,5 Hz/4h), ein Teil der Kulturschalen wurde mit BDM (20 mM) versetzt. BDM inhibierte signifikant die durch vierstündige elektrische Stimulation erhöhte Proteinsynthese der Kardiomyozyten. Die Proteinsynthese wurde über den Kulturzeitraum von 24 Stunden ermittelt. Die Kontrollen (C) wurden über 24 Stunden ohne elektrische Stimulation kultiviert. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM aus n = 5 Kulturen. * = p < 0,05 vs. Kontrollen, # = p < 0,05 BDM vs. alleiniger elektrischer Stimulation.

4.6.2 Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der durch elektrische Stimulation bedingten Steigerung der Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen

Es wurde abschließend untersucht, ob die unter 4.6.1 beobachtete Proteinsynthesesteigerung am Modell mechanisch beanspruchter Zellen in Abhängigkeit von der p38 MAP-Kinase erfolgt. Dazu wurden zum einen die Kardiomyozyten über zwei, vier und 24 Stunden einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz ausgesetzt und anschließend die Aktivierung der p38 MAP-Kinase über Western-Blots bestimmt. Zum anderen wurden die Kardiomyozyten über vier Stunden mit 0,5 Hz elektrisch stimuliert, um darauf über den Zeitraum von insgesamt 24 Stunden die Proteinsynthese der Kardiomyozyten, in Abhängigkeit von einer Vorinkubation mit SB 202190 (SB, 1 µM), zu bestimmen. Als Kontrollen dienten Kardiomyozyten der gleichen Präparation, welche ohne elektrische Stimulation unter ansonsten gleichen Bedingungen kultiviert wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kardiomyozyten nach vierstündiger elektrischer Stimulation, im Vergleich zu ruhenden Kontrollen, eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase aufwiesen (Abb. 4.6.1 und 4.6.2). Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach zwei- und 24-stündiger Stimulation unterschied sich nicht signifikant von der ruhender Kontrollen (Abb.4.6.1). Die Rolle der p38 MAP-Kinase in der Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation mechanisch beanspruchter Herzmuskelzellen konnte nachfolgend näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse an den elektrisch stimulierten Kardiomyozyten sprechen für deren Beteiligung an der mechanisch induzierten Proteinsynthesesteigerung, da bei Hemmung der p38 MAP-Kinase mit SB 202190 eine zuvor beobachtete Proteinsynthesesteigerung signifikant inhibiert wurde.

Abbildung 4.6.2.1: Signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach vierstündiger elektrischer Stimulation

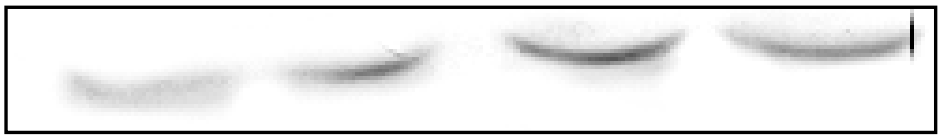

Abb. 4.6.2.1: Repräsentativer Western-Blot zeigt die signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach vierstündiger elektrischer Stimulation, erkennbar an. Die Kardiomyozyten wurden über zwei, vier und 24 Stunden mit 0,5 Hz elektrisch stimuliert (0,5 Hz/2h, 0,5 Hz/4h, 0,5 Hz/24h). Die Kontrollen (C) waren mechanisch inaktiv.

Abbildung 4.6.2.2: Einfluss der p38 MAP-Kinase auf die Proteinsynthese elektrisch stimulierter Kardiomyozyten

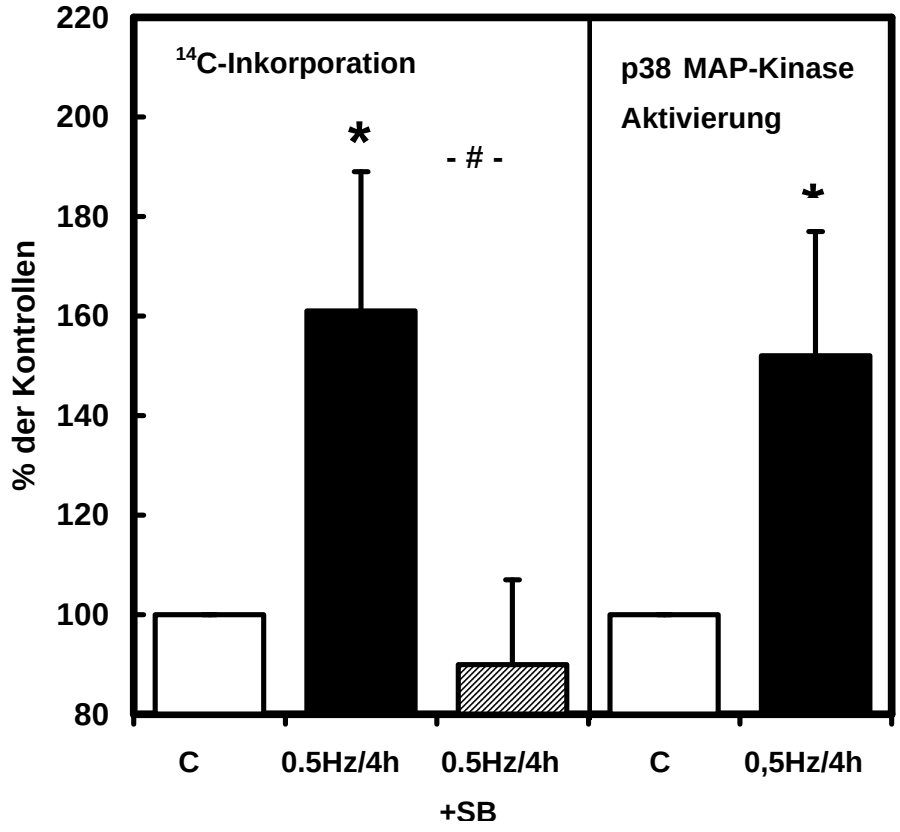

Abb. 4.6.2.2: Vierstündiger elektrische Stimulation mit 0,5 Hz (0,5 Hz/4h) erhöht sowohl die Proteinsythese als auch die Aktivierung der p38 MAP-Kinase gegenüber mechanisch inaktiven Kontrollen (C) signifikant. SB 202190 (SB, 1 µM) inhibierte signifikant die Proteinsynthesesteigerung trotz elektrischer Stimulation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 5 Kulturen. * = p < 0,05 vs. Kontrolle, # = p < 0,05 elektrische Stimulation bei Vorinkubation mit SB vs. alleinige elektrische Stimulation.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell kultivierter Kardiomyozyten der adulten Ratte die Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen hypertrophen Ansprechbarkeit β-adrenerger Rezeptoren in serumkultivierten und frisch isolierten Kardiomyozyten wurde vermutet, dass die Kultivierung von Herzmuskelzellen eine Veränderung in der Expression derjenigen Signalmolekülen bewirkt, die eine Schlüsselrolle in der Regulation hypertrophen Wachstums innehaben.

Als ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass im Zellkulturmodell serumkultivierter Kardiomyozyten die Expression der p38 MAP-Kinase signifikant erhöht ist. Unter den gleichen Kulturbedingungen wurde in Untersuchungen von Zhou et al. (1996) eine Ankopplung β_2-adrenerger Rezeptoren an die hypertrophe Wachstumsregulation der Herzmuskelzellen nachgewiesen. Es wurde daher vermutet, dass die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion gesteigerter Proteinsynthese nach β_2-adrenerger Stimulation involviert ist und dass die Anwesenheit von TGF-β bei ihrer Aktivierung eine Rolle spielt.

5.1 Einfluss von TGF-β auf die vermehrte Expression der p38 MAP-Kinase unter Kulturbedingungen

Die Beteiligung des Wachstumsfaktors TGF-β an der hypertrophen Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten wurde in einer Studie von Schlüter et al. (1995) belegt. Diese konnte eine Inhibition hypertropher Ansprechbarkeit β-adrenerger Rezeptoren durch neutralisierende TGF-β-Antikörper nachweisen. Allerdings konnte die Vermutung, dass TGF-β über eine Induktion der p38 MAP-Kinase Expression Einfluss auf die Signaltransduktion β-adrenerger Hypertrophie gewinnt, durch folgende Ergebnisse dieser Arbeit widerlegt werden.

Zunächst wurde gezeigt, dass die vermehrte Expression der p38 MAP-Kinase in serumkultivierten Kardiomyozyten durch Verwendung neutralisierender TGF-β-Antikörper nicht gehemmt wurde, sie also unabhängig von TGF-β ist. Zweitens ist die β-adrenerg induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase ebenfalls als unabhängig von

TGF-β anzusehen, da der β-Adrenozeptor-Agonist Isoproterenol sowohl in kultivierten als auch in frisch isolierten Kardiomyozyten, entsprechend vorhandener und fehlender TGF-β Wirkung, eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase bewirkt. Weiterhin konnten im Verlauf der Arbeit Hypertrophie-auslösende Stimuli identifiziert werden, die in Kurzzeitkulturen, also in Abwesenheit von TGF-β, über eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase eine Proteinsynthesesteigerung hervorrufen (s. Kap. 5.3). Somit scheint eine zu geringe Expression der p38 MAP-Kinase in frisch isolierten Kardiomyozyten nicht die Ursache dafür zu sein, dass in diesem Kulturmodell keine β-adrenerg vermittelte Proteinsynthesesteigerung beobachtet wird. Zusammenfassend ist nach den Ergebnisse dieser Arbeit davon auszugehen, dass die p38 MAP-Kinase in der Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation den durch TGF-β induzierten Signaltransduktionsschritten vorgeschaltet zu sein scheint, da sie nicht einer Einflussnahme von TGF-β unterliegt.

5.2 Rolle der p38 MAP-Kinase in der adrenergen Signaltransduktion myokardialer Proteinsynthesesteigerung

5.2.1 Signaltransduktion β-adrenerger Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten

Adulte Kardiomyozyten exprimieren sowohl β_1- als auch β_2-Adrenozeptoren. Der β_1-Adrenozeptor ist nach Untersuchungen von Schlüter et al. (1995, 1999) im Zellkulturmodell serumkultivierter Kardiomyozyten nicht an der Regulation hypertrophen Wachstums beteiligt. Für den β_2-Adrenozeptorsubtyp wurde dagegen unter gleichen Bedingungen eine Ankopplung an die Signaltransduktion myokardialer Proteinsynthesesteigerung beschrieben (Zhou et al., 1996).

Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmals, dass die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion β_2-Adrenozeptor induzierter Hypertrophie integriert ist. Dies kann durch die folgenden Resultate dieser Arbeit belegt werden. Zum einen spricht die signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach β-adrenerger Stimulation für einen entsprechenden rezeptor-abhängigen Aktivierungsweg, sowohl in Kurzzeit- als auch in Langzeitkulturen. Zum anderen ist an serumkultivierten Kardiomyozyten von einer Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der Signaltransduktion β-adrenerger Hypertrophie auszugehen, da durch Hemmung der p38 MAP-Kinase eine zuvor

beobachtete β-adrenerg induzierte Proteinsynthesesteigerung signifikant inhibiert wurde. In Untersuchungen von Sabri et al. (2000) ist eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der Induktion β-adrenerger Hypertrophie an Kardiomyozyten der Maus nachgewiesen worden. In dieser Arbeit konnte nun ebenfalls für Kardiomyozyten der adulten Ratte eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der β-adrenerg induzierten hypertrophen Wachstumsregulation belegt werden.

5.2.2 Signaltransduktion α-adrenerger Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten

Im Gegensatz zu der β-adrenerg vermittelten Hypertrophie ist die α-adrenerg vermittelte Proteinsynthesesteigerung als unabhängig von der p38 MAP-Kinase anzusehen. Folgende Ergebnisse lassen diese Schlussfolgerung zu: Trotz erhöhter Aktivierung der p38 MAP-Kinase in serumkultivierten Kardiomyozyten war die Expression derjenigen Signalmoleküle unverändert, die nach α-adrenerger Stimulation hypertrophes Wachstum bedingen (Kapitel 4.1). Entsprechend belegen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass eine Inhibition der p38 MAP-Kinase ohne Einfluss auf die α-adrenerg induzierte Proteinsynthesesteigerung serumkultivierter Kardiomyozyten bleibt. Dies stimmt mit Studien von Tanaka et al. (2001) und Xiao et al. (2001) überein, die zeigen, dass der α-Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin keine Aktivierung der p38 MAP-Kinase bedingt.

Von einer grundsätzlichen Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der adrenerg-induzierten hypertrophen Wachstumsregulation der Kardiomyozyten ist demzufolge nicht auszugehen, da die α-adrenerg vermittelte Hypertrophie unabhängig von deren Signaltransduktion eine Steigerung der Proteinsynthese in adulten Kardiomyozyten bedingt. Diesbezüglich bestehen auch keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Kulturmodell, da bisher kein Hinweis auf eine veränderte Signaltransduktion α-adrenerger Hypertrophie zwischen kultivierten und frisch isolierten Kardiomyozyten gefunden wurde (Pinson et al., 1993).

5.3 Einfluss mechanischer Aktivität auf die p38 MAP-Kinase sowie die myokardiale Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen

Ein weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die p38 MAP-Kinase, neben der β_2-Adrenozeptor induzierten Hypertrophie, auch in die Signaltransduktion mechanisch induzierter hypertropher Wachstumsregulation in Kurzzeitkulturen integriert ist. Die mechanische Belastung als Einflussparameter wurde zum einen über elektrische Stimulation, zum anderen durch Kultivierung in hyperosmolarem Medium gewährleistet. Auf beide Bedingungen reagierten die untersuchten Kurzzeitkulturen mit einer signifikanten Proteinsynthesesteigerung. Dies stimmt auch mit Untersuchungen von Kaye et al. (1996) überein, die an adulten Kardiomyozyten eine Proteinsynthesesteigerung durch elektrische Stimulation beschrieben haben. Weiterhin konnte in dieser Arbeit neben einer Proteinsynthesesteigerung auch eine signifikante Aktivierung der p38 MAP-Kinase in mechanisch beanspruchter Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Als ein wesentliches Ergebnis ist dabei anzusehen, dass die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion mechanisch induzierter Hypertrophie in frisch isolierten Kardiomyozyten integriert ist. Dies belegen die Ergebnisse sowohl an hyperosmolar kultivierten als auch elektrisch stimulierten Kardiomyozyten, deren zuvor beobachtete Proteinsynthesesteigerung durch Hemmung der p38 MAP-Kinase wiederum signifikant inhibiert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen auch Untersuchungen von Wang et al. (1998), die, allerdings für neonatale Herzmuskelzellen, eine p38 MAP-Kinase vermittelte Hypertrophie auf der Grundlage elektrischer Stimulation belegen.

Nach den oben beschriebenen Ergebnissen über mechanisch belastete Kardiomyozyten lässt sich vermuten, dass die p38 MAP-Kinase eine wesentliche Rolle in der Ankopplung mechanischer Stimuli an die hypertrophe Wachstumsregulation der Herzmuskelzellen spielt. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, eine alleinige Aktivierung der p38 MAP-Kinase, zum Beispiel induziert durch β-adrenerge Stimulation, in frisch isolierten Kardiomyozyten nicht ausreichend, um hypertrophes Wachstum zu bedingen. Ähnlich einer Kultivierung in Anwesenheit von aktiviertem TGF-β, welche eine p38 MAP-Kinase vermittelte Hypertrophie in den Langzeitkulturen ermöglicht, werden offensichtlich durch die mechanische Belastung der adulten Kardiomyozyten weitere Signalmoleküle generiert, die über eine Co-Aktivierung mit der p38 MAP-Kinase an die hypertrophe Wachstumsregulation frisch

isolierter Kardiomyozyten angebunden sind. Einen ähnlichen Mechanismus beschrieb Ng et al (2001) für die durch Interleukin-1 induzierten morphologischen Veränderungen kardialer Myozyten, welche durch eine Co-Aktivierung von p38 MAP-Kinase und p42/44 MAP-Kinase vermittelt werden.

Über welche weiteren Signalmoleküle mechanische Aktivität an die Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation angekoppelt ist, wird bei adulten Herzmuskelzellen weiterhin untersucht. Als ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte die Aktivierung der p38 MAP-Kinase als resultierende zelluläre Reaktion auf mechanische Belastung in frisch isolierten Kardiomyozyten identifiziert werden. Dies bestätigt verschiedene Studien sowohl an neonatalen als auch an adulten Kardiomyozyten, die eine mechanische Belastung durch Zelldehnung erzielten. Hier konnte eine dehnungsinduzierte Proteinsynthesesteigerung durch Inhibition der p38 MAP-Kinase gehemmt werden (Takeishi et al., 2001; Kudoh et al., 1998; Clerk et al., 2002).

Abbildung 5.1: Rolle der p38 MAP-Kinase in der hypertrophen Wachstumsregulation kultivierter Kardiomyozyten der adulten Ratte

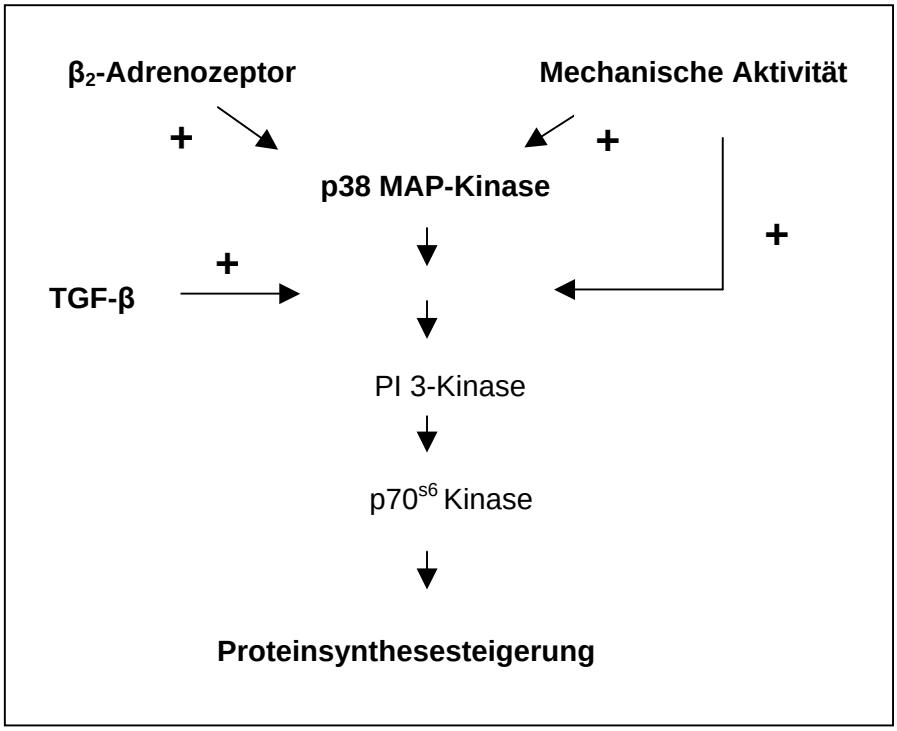

Abb. 5.1: Dargestellt ist die Signaltransduktion β_2-adrenerger Stimulation hin zu gesteigerter Proteinsynthese kultivierter Kardiomyozyten. Die p38 MAP-Kinase ist in die Signaltransduktion des β_2-Adrenozeptors integriert und koppelt über Zwischenschritte an die Aktivierung der PI 3-Kinase. Die Induktion der hypertrophen Rezeptoransprechbarkeit kann einerseits, wie links dargestellt, in serumkultivierten Kardiomyozyten durch TGF-β erfolgen. Andererseits kann die Ankopplung der p38 MAP-Kinase an die hypertrophe Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten durch mechanische Belastung der Herzmuskelzellen erfolgen (rechts dargestellt).

5.4 Schlussfolgerung

Die Frage, ob die p38 MAP-Kinase eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten spielt, wird vielfach diskutiert. Vorherige Studien mit transgenen Mäusen, die kardial eine fehlende Expression der p38 MAP-Kinase aufweisen, haben gezeigt, dass diese Tiere trotzdem eine druckinduzierte Herzhypertrophie ausbilden (Zhang et al., 2003). Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase ist demnach keine unabdingbare Voraussetzung für hypertrophes Wachstum.

Auch in der Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation ist die Bedeutung der p38 MAP-Kinase als weniger wichtig anzusehen, da viele hypertrophe Stimuli, wie zum Beispiel α-adrenerge Agonisten, Angiotensin II oder Endothelin, unabhängig von der p38 MAP-Kinase eine Proteinsynthesesteigerung in Kardiomyozyten der Ratte induzieren (Xiao et al., 2001; Choukroun et al., 1998; Kudoh et al., 1998). Eine Ausnahme scheinen dabei β-adrenerge Rezeptoren zu bilden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen zum einen für einen β-Adrenorezeptor-gekoppelten Aktivierungsweg der p38 MAP-Kinase. Zum anderen konnte nun erstmals an serumkultivierten adulten Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen werden, dass die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation nach β_2-adrenerger Stimulation integriert ist. Weiterhin wurde auch in frisch isolierten Kardiomyozyten eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach β-adrenerger Stimulation nachgewiesen. Durch verschiedene Studien ist allerdings die fehlende hypertrophe Ansprechbarkeit des β-Adrenozeptors in diesem Kulturmodell hinreichend belegt (Fuller et al., 1990; Schlüter et Piper, 1992). Entsprechend ist die Aktivierung der p38 MAP-Kinase allein nicht ausreichend, hypertrophes Wachstums zu induzieren.

Neben einer Kultivierung in Anwesenheit von TGF-β konnte in dieser Arbeit an mechanisch beanspruchten Kardiomyozyten ein weiteres Kulturmodell identifiziert werden, unter dessen Bedingungen die p38 MAP-Kinase in die hypertrophe Wachstumsregulation der Herzmuskelzellen involviert ist. Offensichtlich werden durch beide Einflussparameter zelluläre Veränderungen generiert, die eine Ankopplung der p38 MAP-Kinase an die Signaltransduktion hypertropher Wachstumsregulation bewirken. Dabei scheint der Wachstumsfaktor TGF-β in der Signaltransduktion unterhalb der p38 MAP-Kinase angesiedelt zu sein, da er nach den vorliegenden Ergebnissen keinen direkten Einfluss auf die p38 MAP-Kinase hat.

Die Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der hypertrophen Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten konnte unter den Bedingungen erhöhter mechanischer Beanspruchung beziehungsweise Anwesenheit von TGF-β nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, wird im Rahmen beider Einflussparameter, wie sie zum Beispiel bei arteriellem Hypertonus beziehungsweise vermehrter Expression von TGF-β vorkommen, eine hypertrophe

Wachstumsregulation im Herzen beobachtet, die letztendlich zur Herzinsuffizienz führen kann. Vermutlich ist die p38 MAP-Kinase vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen in die Signaltransduktion myokardialer Hypertrophie integriert, indem sie über die trophische Ankopplung β_2-adrenerger Rezeptoren beziehungsweise mechanischer Faktoren zur Dysregulation myokardialen Wachstums beiträgt. Die Bedeutung der p38 MAP-Kinase für die pathophysiologische Wachstumsregulation des Herzens unterstreicht auch eine Studie von Zhang et al. (2000), die an transgenen Mäusen mit einer erhöhten Aktivität der p38 MAP-Kinase die vermehrte Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie belegt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell kultivierter Kardiomyozyten der Ratte die Signaltransduktion myokardialer Hypertrophie untersucht. Sowohl α- als auch β-adrenerge Stimulation bedingen letztendlich über eine Aktivierung der PI 3-Kinase und $p70^{s6}$-Kinase kardiale Hypertrophie. Die Ankopplung des β-Adrenozeptors an diese hypertrophe Signaltransduktion ist allerdings noch Gegenstand der Forschung. In vitro ist die hypertrophe Ansprechbarkeit des β_2-Adrenozeptors nur in serumkultivierten Kardiomyozyten belegt. Entsprechend wurden Parameter dieses Kulturmodells hinsichtlich einer Einflussnahme auf die β-adrenerge Signaltransduktion untersucht werden.

Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in serumkultivierten Kardiomyozyten, unter Anwesenheit von TGF-β, die Expression der p38 MAP-Kinase signifikant erhöht ist. Im gleichen Kulturmodell führte eine β-adrenerge Stimulation über die Signaltransduktion der p38 MAP-Kinase zu einer myokardialen Proteinsynthesesteigerung. Die β-adrenerg induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase war dabei allerdings unabhängig von TGF-β. Im Folgenden wurden mechanische Einflussparameter hinsichtlich einer Auswirkung auf die myokardiale Wachstumsregulation untersucht. Durch mechanische Beanspruchung der Kardiomyozyten in Form von elektrischer Stimulation beziehungsweise Kultivierung in hyperosmolarem Milieu war eine p38 MAP-Kinase vermittelte Proteinsynthesesteigerung nachweisbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die p38 MAP-Kinase in die Signaltransduktion kardialer Hypertrophie nach β-adrenerger Stimulation integriert ist. Ihre Aktivierung scheint allerdings oberhalb der durch den Einfluss von TGF-β induzierten Veränderungen hypertrophen Wachstums angesiedelt zu sein. Weiterhin ist die p38 MAP-Kinase vermutlich in die Signaltransduktion mechanisch induzierter Hypertrophie integriert. Die Bedeutung der p38 MAP-Kinase für die hypertrophe Signaltransduktion unter Bedingungen vermehrter mechanischer Belastung beziehungsweise β_2-adrenerger Hypertrophie, wie sie auch am Übergang zur Herzinsuffizienz beobachtet wird, unterstreicht deren Bedeutung für die myokardiale Wachstumsregulation vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen.

7 Summary

In the present study we investigated the signaling pathway leading to cardiac hypertrophy in cultures of isolated cardiomyocytes. α-adrenoceptor as well as β-adrenoceptor stimulation leads to cardiac hypertrophy by sharing PI 3-kinase and $p70^{S6}$–kinase as the endpoints of the hypertrophic signaling pathway. The signaling molecules which couple β-adrenoceptor stimulation to activation of the PI 3-kinase are still unknown. In vitro only cardiomyocytes pre-cultured with TGF-β develop hypertrophic responsiveness to β-adrenoceptor stimulation that cannot be found in freshly isolated cells. In order to define signaling molecules which are specifically involved in β-adrenoceptor dependent hypertrophy these cultures were analysed.

The main finding of our study is that during cultivation of cardiomyocytes in presence of active TGF-β the expression of p38 MAP-kinase increased significantly. In the same culture model stimulation of β-adrenoceptors induced protein synthesis in a p38 MAP-kinase-dependent way. However, the activation of p38 MAP-Kinase by β-adrenoceptor stimulation was independent of pre-treatment with TGF-β. After that it was studied whether mechanical stress increases protein synthesis in adult cardiomyocytes. It was shown that in absence of TGF-β mechanical stress, either by hyperosmolarity or reconstitution of mechanical activity, increases protein synthesis via p38 MAP-Kinase activation in freshly isolated cells.

Activation of p38 MAP-kinase is a newly identified signaling step specific for β-adrenoceptor-dependent hypertrophy. In the regulation of protein synthesis the activation of p38 MAP-Kinase seems to be located up-stream of the TGF-β-induced changes in hypertrophic signaling molecules. Probably the p38 MAP-kinase is also part of a direct mechanical transduction to hypertrophic responses. Since the p38 MAP-Kinase is involved in β_2-adrenoceptor induced hypertrophy, which is a characteristic feature of the hypertensive heart at the transition to heart failure, as well as in mechanical force induced hypertrophy, this suggests that the p38 MAP-Kinase plays an important role in the regulation of protein synthesis under pathophysiological conditions.

8 Literaturverzeichnis

Aikawa, R., T. Nagai, S. Kudoh, Y. Zou, M. Tanaka, M. Tamura, H. Akazawa, H. Takano, R. Nagai und I. Komuro (2002)
Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAP-Kinase activation.
Hypertension 39: 233-238

Bartolome, J., J. Guguenard und T.A. Slotkin (1980)
Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy.
Science 210: 793-794

Bogoyevitch, M.A. (2000)
Signaling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system.
Cardiovasc. Res. 45: 826-842

Boluyt, M.O., L. O'Neill, A.L. Meredith, O.H.L. Bing, W.W. Brooks, C.H. Conrad, M.T. Crow und E.G. Lakatta (1994)
Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components.
Circ. Res. 75: 23-32

Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254

Choukroun, G., R. Hajjar, J.M. Kyriakis, J.V. Bonventre, A. Rosenzweig, T. Force (1998)
Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy.
J. Clin. Invest. 102: 1311-1320

Clerk A., A. Michel, P.H. Sugden (1998)

Stimulation of the p38 MAP kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy?

J. Cell. Biol. 142: 523-535

Clerk, A., T.J. Kemp, J.G. Harrison, A.J. Mullen, P.J. Barton, P.H. Sugden (2002)

Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein.

Biochem. J. 368: 101-110.

Decker, M. L., D. M. Janes, M. M. Barcley, L. Harger and R. S. Decker (1997)

Regulation of adult cardiomyocyte growth: effects of active and passive mechanical loading.

Am. J. Physiol. 272: H2902-2918

Everett, A.D., A.L. Tufro-McReddie, A. Fisher, R.A. Gomez (1994)

Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and TGF-β_1 expression.

Hypertension 23: 587-592

Fuller, S.J., C.J. Daitanaki, P.H. Sugden (1990)

Effects of catecholamines in protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. Stimulation of translation is stimulated by alpha-1-adrenoceptor.

Biochem. J. 266: 727-736

Kaye, D., D. Pimental, S. Prasad, T. Mäki, H.-J. Berger, P.L. Mc Neil, T.W. Smith und R.A. Kelly (1996)

Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro.

J. Clin. Invest. 97: 281-291

Kyhse-Andersen, J. (1984)
Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-209

Komuro, I., T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, Y. Katoh, E. Hoh, F. Takaku und Y. Yazaki (1990)
Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression.
J. Biol. Chem. 265: 3595-3598

Komuro, I., Y. Katoh, T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, E. Hoh, F. Takaku und Y. Yazaki (1991)
Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation.
J. Biol. Chem. 266: 1265-1268

Kudoh, S., I. Komuro, Y. Hiroi, Y. Zou, K. Harada, T. Sugaya, N. Takekoshi, K. Murakami, T. Kadowaki und Y. Yazaki (1998)
Mechanical stretch induces hypertrophic responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice.
J. Biol. Chem. 273: 24037-24043.

Levy, D., R.J. Garrison, D.D. Savage., W.B. Kannel und W.P. Castelli (1990)
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
N. Engl. J. Med. 322: 1561-1566

Li, R.K., G. Li, D.A. Mickle, R.D. Wesel, F. Merante, H. Luss, V. Rao, G.T. Christakis und W.G. Williams (1997)
Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy.
Circulation 96: 874-881

Morgan, H.E., L.S. Jefferson, E.B. Wolpert und D.E. Rannels (1971)
Regulation of protein synthesis in heart muscle.
J. Biol. Chem. 246: 2163-2170

Morgan, H.E. und K.M. Baker (1991)
Cardiac hypertrophy: mechanical, neural and endocrine dependence.
Circulation 83: 13-25

Ng, D.C., C.S. Long und M.A. Bogoyevitch (2001)
A role for the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases in interleukin-1 beta-stimulated delayed signal tranducer and activator of transcription 3 activation, atrial natriuretic factor expression, and cardiac myocyte morphology.
J. Biol. Chem. 276: 29490-29498.

Pinson, A., K.-D. Schlüter, X.J. Zhou, P. Schwartz, G. Kessler-Icekson und H.M. Piper (1993)
Alpha- and beta-adrenergic stimulation in cultured adult ventricular cardiomyocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. 25: 477-490.

Pönicke, K., K.-D. Schlüter, I. Heinroth-Hoffmann, T. Seyfarth, M. Goldberg, B. Osten, H.M. Piper und O.E. Brodde (2001)
Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only alpha1A-adrenoceptors.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 364(5): 444-453.

Sabri, A., E. Pak, S.A. Alcott, B.A. Wilson und S.F. Steinberg (2000)
Coupling function of endogenous alpha(1)-and beta-adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes.
Circ. Res. 86: 1047-1053

Schlüter, K.-D. and H.M. Piper (1992)

Trophic effects of catecholamines and parathyreoid hormone on adult ventricular cardiomyocytes.

Am. J. Physiol. 263: H1739-H1746

Schlüter, K.-D., X.J. Zhou und H.M. Piper (1995)

Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-β in adult rat cardiomyocytes.

Am. J. Physiol. 269: 1311-1316.

Schlüter, K.-D., Y. Goldberg, G. Taimor, M. Schäfer und H.M. Piper (1998)

Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes.

Cardiovasc. Res. 40: 174-181

Schlüter, K.-D., A. Simm, M. Schäfer, G. Taimor und H.M. Piper (1999)

Early response kinase and PI 3-Kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy.

Am. J. Physiol. 276: H1655-1663

Simm, A., K.-D. Schlüter, C. Diez, H.M. Piper und J. Hoppe (1998)

Activation of $p70^{s6}$Kinase by β-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes.

J. Mol. Cell. Cardiol. 30: 2059-2067

Spahr, R., S.L. Jacobson, B. Siegmund, P. Schwartz und H.M. Piper (1989)

Substrate oxidation by adult cardiomyocytes in long-term primary culture.

J. Mol. Cell. Cardiol. 21, 175-185

Strniskova, M., M. Barancik und T. Ravingerova (2002)

Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes.

Gen. Physiol. Biophys. 21:231-255.

Sugden, P.H. (2001)
Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy.
Ann. Med. 33: 611-622.

Taimor, G., K.-D. Schlüter, K. Frischkopf, M. Flesch, S. Rosenkranz und H.M. Piper (1999)
Autocrine regulation of TGF-β expression in adult cardiomyocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. 31: 2127-2136

Takeishi, Y., Q. Huang, J. Abe, M. Glassman, W. Che, J.D. Lee, H. Kawakatsu, E.G. Lawrence, B. D. Hoit, B.C. Berk und R.A. Walsh (2001)
Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch.
J. Mol. Cell. Cardiol. 33: 1637-1648.

Tanaka, K., M. Honda und T. Takabatake (2001)
Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte.
J. Am. Coll. Cardiol. 37:676-685.

Villarreal, F.K. und W.H. Dillmann (1992)
Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA leves for TGF-β_1, fibronectin, and collagen.
Am. J. Physiol. 262: H1861-H1866

Volz, A., H. M. Piper, B. Siegmund und P. Schwartz (1991)
Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture.
J. Mol. Cell. Cardiol. 23: 161-173

Wada, H., M.R. Zile, C.T. Ivester, G. Cooper 4th and P.J. McDermott (1996)
Comparative effects of contraction and angiotesnin II on growth of adult feline cardiomyocytes in primary culture.
Am. J. Physiol. 271: H29-H37

Wang, Y., S. Huang, V.P. Sah, J. Jr. Ross, J.H. Brown, J. Han und K.R. Chien (1998)
Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family.
J. Biol. Chem. 273(4): 2161-2168.

Xiao, L., D.R. Pimental, J.K. Amin, K. Singh, D.B. Sawyer und W.S. Colucci (2001)
MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor–stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.
J. Moll. Cell. Cardiol. 33: 779-787.

Yamazaki, T., I. Komuro und Y. Yazaki (1999)
Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy.
Am. J. Cardiol. 83: 53H-57H

Zhang, D., V. Gaussin, G.E. Taffet, N.S. Belaguli, M. Yamada, R.J. Schwartz, L.H. Michael, P.A. Overbeek und M.D. Schneider (2000)
TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice.
Nature Med. 6: 556-563

Zhang, S., C. Weinheimer, M. Courtois, A. Kovacs, C.E. Zhang, A.M. Cheng, Y. Wang und A.J. Muslin (2003)
The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis.
J. Clin. Invest. 111: 833-841

Zhou, X.J., K.-D. Schlüter und H.M. Piper (1996)

Hypertrophic responsiveness to β_2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes.

Mol. Cell. Biochem. 163/164: 211-216

9 Publikationen

Veröffentlichung:

Wenzel, S., C. Müller, H. M. Piper und K.-D. Schlüter (2004)

p38 MAP-Kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling.

The European Journal of heart failure, im Druck

Vortrag:

Wenzel, S., C. Müller, K.-D. Schlüter (2002)

Eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase ist notwendig aber nicht ausreichend für eine β-adrenerg vermittelte Myokardhypertrophie

68. Jahrestagung der Dts. Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, April 2002

Zeitschrift für Kardiologie 91 (Suppl.): I/295

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie für die stets freundliche und geduldige, fachliche und praktische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Piper, Leiter des physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität, danken für die wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch allen Medizinisch-technischen Angestellten des Physiologischen Instituts, für die freundliche und kompetente Einarbeitung sowie für die ständige Hilfsbereitschaft und Freude im Laboralltag.

Herzlich danken möchte Heike Degenhardt und Sibylle Wenzel für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

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

Danken möchte ich auch meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.