A detailed 3D anatomical illustration of a rat's heart and lungs. The heart is shown in a light blue, semi-transparent view, revealing its internal chambers and valves. The lungs are depicted in a similar style, with a light blue color and semi-transparent texture. The illustration is set against a white background with a vertical grey bar on the right side.

Wege der Angiotensin II-induzierten Apoptose in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte

Dunja Schröder

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2008

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

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Herr Prof. Dr. J. Roth

und

aus dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. G. Euler

**Wege der Angiotensin II-induzierten Apoptose
in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dunja Schröder

Tierärztin aus Wuppertal

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter Prof. Dr. G. Euler

Prof. Dr. J. Roth

Tag der Disputation 12. Juni 2008

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Herzinsuffizienz	3
1.1.1 Herzmuskelhypertrophie	4
1.1.2 Herzmuskelhypertrophie und Renin-Angiotensin-System	6
1.1.3 Herzhypertrophie und Expression des Transforming Growth Faktor β_1	7
1.1.4 Kardiomyozyten und Apoptose	9
1.1.5 Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an Hypertrophie und Apoptose	11
1.2 Zielsetzung	12
2 Material	13
2.1 Chemikalien	12
2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien	12
2.1.2 Spezielle Chemikalien	14
2.1.2.1. Reverse Transkription	15
2.1.2.2 Realtime-PCR	15
2.2 Antikörper	15
2.3 Antisense Oligonukleotide	15
2.4 Decoy-Oligonukleotide	16
2.5 Geräte und Laborbedarf	16
2.5.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	16
2.5.1.1 Zellkultur	16

2.5.1.2	Retardation Assay	16
2.5.1.3	RT-PCR	17
2.5.1.4	SDS-Gelelektrophorese	17
2.5.1.5	Hoechst 33258/Propidiumiodid Doppelfärbung	17
2.5.1.6	Sonstige Geräte	17
2.5.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.6	Auswertungs-Software	18
2.7	EDV	19
3	Methoden	20
3.1	Isolierung ventrikulärer Kardiomyozyten	20
3.1.1	Versuchstiere	20
3.1.2	Präparation isolierter Kardiomyozyten aus dem Rattenherz	20
3.2	Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten	22
3.2.1	Vorinkubation der Kulturschalen	22
3.2.2	Ausplattieren der Kardiomyozyten	22
3.2.3	Kultivierung der Kardiomyozyten	23
3.2.4	Behandlung der Zellen	23
3.2.4.1	Stimulation der Kardiomyozyten	23
3.2.4.2	Transformation der Kardiomyozyten mit Oligonukleotiden	24
3.3	Retardation Assay	25
3.3.1	Zellernte	25
3.3.2	Kernextraktion	25
3.3.3	Markierung der Oligonukleotide durch Fluoreszenz	27
3.3.4	Gelelektrophorese	28
3.3.5	Probenvorbereitung	29
3.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)	30
3.4.1	Vorbereitung der Proben	30
3.4.2	Herstellung eines Gels	31
3.4.3	Western-Blot Verfahren	33
3.4.4	Immunologischer Nachweis des TGF β ₁	34

3.5	Nachweis der TGFβ-Protein-Freisetzung im Dot-Blot-Verfahren	36
3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
3.6.1	RNA-Isolation	38
3.6.2	DNase-Behandlung der isolierten RNA	38
3.6.3	Messung des RNA-Gehalts	39
3.6.4	Synthese der cDNA (Reverse Transkription)	40
3.6.5	Durchföhrung der Realtime-PCR	41
3.6.6	HPRT als Housekeeping-Gen	43
3.6.7	Realtime-PCR Auswertung	43
3.7	Quantitativer Apoptosenachweis isolierter Kardiomyozyten mittels der Hoechst 33258 Propidiumiodid Doppelfärbung	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA unter Apoptose, Hypertrophie und TGFβ₁-Stimulation in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte	46
4.1.1	Bindungsaktivität von GATA unter SNAP, AngII und PE	46
4.1.2	GATA-Bindungsaktivität ist unter AngII-Stimulation transient erhöht	49
4.1.3	Identifikation der aktivierten GATA-Isoformen in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratta	51
4.1.4	Abnahme der GATA-Bindungsaktivität nach Transformation der Kardiomyozyten mit GATA-decoy-Oligonukleotid	52
4.2	GATA erhöht die TGFβ₁-Expression unter AngII	54
4.2.1	Beteiligung des Transkriptionsfaktors GATA an der AngII-Induzierten TGF β ₁ -Expression	54
4.2.2	Der Transkriptionsfaktor GATA erhöht die TGF β ₁ -mRNA-Expression	57
4.2.3	GATA erhöht die AngII-induzierte TGF β ₁ -Freisetzung	59
4.3	Die Aktivierung von AP-1 und GATA wird über p38 MAPK vermittelt	62
4.3.1	Beteiligung der p38 MAPK an der Bindungsaktivitätssteigerung	

	von AP-1 nach AngII-Stimulation	62
4.3.2	Steigerung der GATA-Bindungsaktivität unter AngII-Stimulation wird über die p38 MAPK vermittelt65
4.4	Der Wachstumsfaktor TGFβ₁ aktiviert die Bindungsaktivität von SMAD	67
4.4.1	Die Bindungsaktivität von SMAD nach Inhibition des Transkriptionsfaktors TGFβ ₁	67
4.5	Apoptose-Induktion über den TGFβ/SMAD-Signalweg	69
5	Diskussion	71
5.1	Bedeutung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA für die AngII-stimulierte Apoptose	72
5.2	Bedeutung von TGFβ für die Apoptose-Induktion unter AngII	76
5.3	Schlußfolgerung	77
6	Zusammenfassung	79
7	Summary	81
8	Literaturverzeichnis	82
9	Anhang92
9.1	Publikation92
9.2	Erklärung93
9.3	Danksagung94

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
ACE	Angiotensinkonversionsenzym
APS	Ammonium-Persulfat
aqua bidest	aqua bidestillata
AT-1-Rezeptor	Angiotensin-1-Rezeptor
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calve serum (fetales Kälberserum)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
Hoe	Hoechst Farbstoff H33258
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IE	internationale Einheiten
K	Kontrollbedingung
kDa	Kilo-Dalton
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Versuche
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Diphosphatnukleotid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium

NCS	neonatales Kälberserum
NO	Stickstoffmonoxid
Oligo-dT ₍₁₅₎	Oligo-desoxy-Thymidin (15 Nukleotide)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR [®]	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Reverse Transkription
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SNAP	(±)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor β
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz in Europa ist hoch. Nach Schätzungen der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie leiden mehr als 10 Millionen Patienten unter Herzinsuffizienz, die Tendenz ist steigend. Allein in Deutschland sind 1,3 – 1,5 Millionen Menschen betroffen. Die Erkrankung beeinträchtigt die Lebensqualität der Patienten erheblich. Die Mortalität ist hoch, die Herzinsuffizienz gehört zu den Haupttodesursachen Europas. Die allgemeine Definition der Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens, eine ausreichende Pumpleistung zu vollbringen, die den Bedürfnissen des Organismus gerecht wird. Dabei kann sich die Insuffizienz auf bestimmte Teile beschränken (Linksherzinsuffizienz) oder das gesamte Herz betreffen (Globalinsuffizienz). Zu den häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz zählen vor allem Hypertonie und koronare Herzerkrankungen. Weitere Ursachen können Kardiomyopathien als auch Herzklappenerkrankungen sein, ebenso können entzündliche als auch toxische Ursachen zur Herzinsuffizienz führen.

Unabhängig von der Art der Schädigung, kommt es durch eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion über eine erhöhte Wandspannung, durch Aktivierung von Barorezeptoren und die Minderperfusion des Gewebes zur Aktivierung von verschiedenen Gegenregulationen wie einer Herzmuskelhypertrophie. Kurzfristig erlauben diese Anpassungsmechanismen eine Stabilisierung der Myokardfunktion und damit die Perfusion lebenswichtiger Organe. Bei chronischer Aktivierung tragen die selben Mechanismen jedoch zur Progression der Herzinsuffizienz bei und es entsteht ein *circulus vitiosus* (siehe Abb 1.1). Daher ist eine Klärung der pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen, von besonderem Interesse, um bestimmte Wirkstoffe und Substanzgruppen gezielt therapeutisch einsetzen zu können und somit die Lebensqualität der Patienten zu verbessern bzw. die Letalität zu senken.

1.1.1 Herzmuskelhypertrophie

Die Herzmuskelhypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Zunahme des Zellvolumens von Herzmuskelzellen. Die Entstehung kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden und ist häufig die Reaktion des Myokards auf eine erhöhte Belastung. Diese Belastung kann in einer erhöhten Druckbelastung liegen, wie zum Beispiel bei arterieller Hypertonie oder einer Aortenstenose. Auch eine erhöhte Volumenbelastung, wie bei einer Aorteninsuffizienz, kann zu einer Hypertrophie führen. Es wird vermutet, dass die mechanische Belastung des Herzens eine Kaskade von Signaltransduktionsmechanismen anstößt, welche auf zellulärer Ebene zur Hypertrophie führen.

Durch Anstieg der Wandspannung kommt es kompensatorisch zu einer Zunahme der Wanddicke, um die Myokardfunktion aufrecht zu erhalten. Bei diesem adaptiven Vorgang kommt es nach Überschreiten des kritischen Herzgewichts jedoch zu einer ungenügenden Eigenversorgung des Herzens mit nachfolgender struktureller Schädigung. Durch eine anschließende Dilatation der Herzkammern kann das Herz seine Funktion nicht mehr aufrechterhalten und es kommt zur funktionellen Dekompensation. Hierdurch entsteht eine Minderversorgung aller peripheren Organe. Die Herzmuskelhypertrophie gilt als Prädiktion einer sich später entwickelnden Herzinsuffizienz (Levy et al, 1990). Durch die chronisch progressive Erkrankung kommt es nach initialer Schädigung und Kontraktilitätsverlust zur Aktivierung neuroendokriner Mechanismen, insbesondere des Renin-Angiotensin-Systems (RAS).

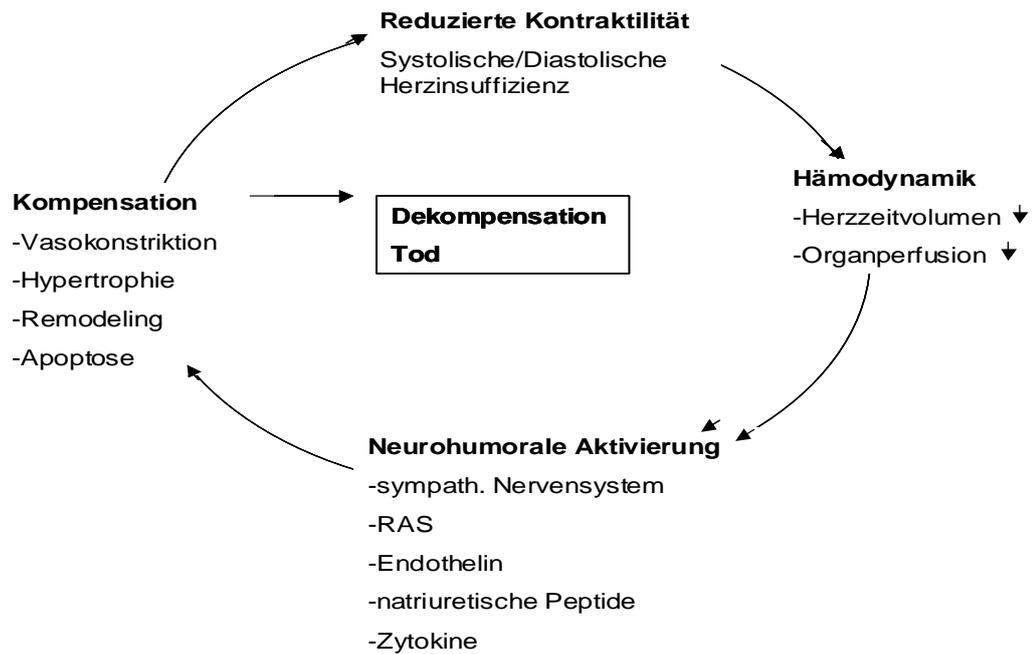


Abb.1.1 Darstellung des circulus vitiosus in der progressiven Herzinsuffizienz. Durch reduzierte Kontraktilität kommt es zu einer Veränderung der Hämodynamik mit verringertem Herzeitvolumen und mangelnder Organperfusion. Als Gegenregulation findet man eine neurohumorale Aktivierung, wie zum Beispiel das Renin-Angiotensin-System (RAS), welches die Myokardfunktion aufrechterhalten soll. Nach chronischer Aktivierung können diese Mechanismen die verminderte Herzfunktion nicht mehr kompensieren und es kommt zur Dekompensation der Herzfunktion, die im Tod münden kann (Abb. entnommen aus Weil et al., 2006).

1.1.2 Herzmuskelhypertrophie und Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) kann man zum einen in ein zirkulierendes Hormonsystem einteilen, bei dem in der Leber synthetisiertes Angiotensinogen durch in der Niere freigesetztes Renin in Angiotensin I umgewandelt wird. Das hauptsächlich im Gefäßendothel lokalisierte Angiotensinkonversionsenzym (ACE) wandelt Angiotensin I in das stark vasopressiv wirkende Angiotensin II (AngII) um. Außerdem besteht ein gewebeständiges RAS im Herzen.

Bei myokardialen Umbauprozessen besitzt das RAS essenzielle Bedeutung. Die Bedeutsamkeit des RAS im kardialen Remodeling wurde in zahlreichen Studien untersucht. In Folge eines hämodynamischen Bluthochdrucks kommt es zu einer Aktivierung des RAS, welches zur Ausbildung von myokardialer Hypertrophie, Fibrose und einer nachfolgenden Funktionsstörung beiträgt. Im insuffizienten Myokard konnte eine gesteigerte ACE-Aktivität festgestellt werden (Studer et al., 1994). Ebenso konnte eine Heraufregulation der ACE-Aktivität nach Myokardinfarkt (Hirsch et al., 1991) sowie nach chronischer Druckbelastung des Myokards (Schunkert et al., 1990) nachgewiesen werden. Eine ursächliche Verwicklung von AngII in die Prozesse der Hypertrophie- und Insuffizienzentwicklung wurde in zahlreichen Tiermodellen beschrieben.

Im hypertrophen und insuffizienten Myokard konnten ebenso Erhöhungen der AngII-Expression festgestellt werden. Ein wesentlicher Grad der Hypertrophie und kardialen Fibrose wurde durch Stimulation des RAS in hypertensiven Ren-2-transgenen Ratten (Ren-2-Ratten) verursacht (Villarreal et al., 1995). Dies konnte über den AT-1-Rezeptor-Antagonisten Losartan geblockt werden (Pinto et al., 2000). Weitere Hinweise, die auf eine wesentliche Beteiligung von AngII an der Entwicklung von Herzhypertrophie hindeuten, zeigt eine klinische Studie, bei der eine Hemmung von AngII durch den AngII-Antagonisten Losartan und durch den ACE-Hemmer Captopril ein fortschreitendes Herzversagen verhindert werden konnte (Pitt et al., 2000).

In einer experimentellen Studie an Dahl salt-sensitiven Ratten mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Valsartan und ACE-Hemmer Benazepril konnten linksventrikuläre Veränderungen verhindert und die Herzfunktion verbessert werden (Kim et al., 2001).

Trotz dieser Befunde an Tiermodellen und klinischer Studien konnten Wada et al. (1996) in adulten Kardiomyozyten jedoch keine direkte Steigerung der Proteinsynthese, und somit keinen direkten wachstumssteigernden Effekt durch Wirkung von AngII allein nachweisen. Ein direkter wachstumssteigernder Effekt konnte nur in neonatalen Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Sadoshima et al., 1993), wobei AngII das Zellwachstum über Aktivierung von „immediate early genes“ (Schnee et al., 2000) und der „early response kinase“ (ERK) vermittelte (Yamazaki et al., 1999). In adulten Kardiomyozyten hingegen scheint hypertrophes Wachstum, das zum Beispiel durch α -adrenerge Stimulation ausgelöst wird, nicht über ERK reguliert zu werden (Schluter et al., 2000). Eine direkte wachstumsinduzierende Wirkung im adulten Myokard von AngII allein scheint daher unwahrscheinlich. Die wachstumssteigernde Wirkung von AngII lässt sich somit nur über die Induktion einer erhöhten hypertrophen Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten auf andere Stimuli erklären, wie sie zum Beispiel durch TGF β ₁ ausgelöst werden kann (Schlüter et al., 2000).

1.1.3 Herzhypertrophie und Expression des Transforming Growth Faktor β ₁

Die Entwicklung einer Herzhypertrophie ist in vivo neben einer Aktivierung des RAS und einer erhöhten Sympathikuseinwirkung auch durch eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren gekennzeichnet. Ein bedeutender Wachstumsfaktor ist der Transforming Growth Faktor β ₁ (TGF β ₁), der im hypertrophierten Myokard im Übergang von der kompensierten zur dekompenzierten Form der Myokardhypertrophie vermehrt exprimiert wird (Villarreal et al., 1992, Boluyt et al., 1994). In verschiedenen Organsystemen wurde das lokal gebildete Zytokin TGF β ₁ als bedeutsam für die Entwicklung von Gewebe-Fibrose beschrieben (Border et al., 1994). Im druckbelasteten menschlichen Myokard korreliert die Hochregulation des Angiotensin Converting Enzymes (ACE) und TGF β ₁ mit dem Grad der Fibrose. Weiterhin konnte eine gesteigerte Expression von TGF β ₁-mRNA bei hypertropher Kardiomyopathie und dilatativer Kardiomyopathie im Myokard gefunden werden (Li et al., 1997; Li et al., 1998).

Zahlreiche Studien liefern indirekte Beweise für eine funktionelle Verbindung zwischen AngII und TGF β ₁ im insuffizienten Herzen. So wurde eine Heraufregulation von TGF β ₁ über AngII in cardialen Fibroblasten, Myofibroblasten und Myozyten gefunden (Moriguchi et al., 1999; Everett et al., 1994; Lee et al., 1995).

In verschiedenen Studien wurden indirekte Wachstumseffekte von AngII auf Kardiomyozyten über die Stimulation von TGF β ₁ vermittelt. Durch AngII wird TGF β ₁ aus den Kardiomyozyten freigesetzt, welches in einer autokrinen Schleife wirkt und eine hypertrophe Ansprechbarkeit auf β -Adrenozeptor Stimulation in den Kardiomyozyten induziert (Schluter et al., 1995, Rosenkranz et al., 2002). Eine AngII-Typ1-Rezeptorblockade konnte die Genexpression von TGF β ₁ im Herzen von hypertensiven Ratten inhibieren (Kim et al., 1995).

Durch Reduktion linksventrikulärer TGF β ₁-mRNA über eine AngII-Rezeptor-Blockade mit Losartan oder durch nicht-spezifische TGF β ₁-Inhibition mit Tranilast in hypertensiven TGR(mRen2)²⁷-transgenen Ratten konnte linksventrikulärer Fibrose und Hypertrophie vorgebeugt, und damit das Überleben der Tiere verbessert werden (Pinto et al., 2000). Dass TGF β ₁ nachfolgend von AngII wirkt und Myozytenwachstum und Fibrose im Herzen fördert, wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine AT1-Rezeptorblockade mit Telmisartan eine TGF β ₁-vermittelte Herzhypertrophie und Dysfunktion in TGF β ₁-transgenen Mäusen nicht verhindern konnte. Wurde jedoch TGF β ₁ über Applikation des TGF β ₁-Antagonisten (sTGF β R-Fc) gehemmt, konnte der Entwicklung von cardialer Hypertrophie vollständig vorgebeugt werden (Rosenkranz et al., 2003).

Weitere Untersuchungen haben intrazelluläre Signaltransduktionsschritte identifiziert, über die AngII eine Expressionssteigerung von TGF β ₁ vermittelt. Der initiale Schritt ist dabei zunächst eine Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, gefolgt von einer Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase (p38 MAPK). Es folgt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, die in einer vermehrten Expression von TGF β ₁ mündet (Wenzel et al., 2001).

Insgesamt zeigen diese Studien eine enge Korrelation zwischen AngII, TGF β ₁-Induktion und auto-/parakriner Zellantwort in cardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten, welche die Entwicklung einer cardialen Hypertrophie fördern.

1.1.4 Kardiomyozyten und Apoptose

Neben Hypertrophie und Fibrose zählt das Auftreten von Apoptose in Kardiomyozyten zu den Hauptgründen der progredienten Herzinsuffizienz.

Apoptose beschreibt einen Vorgang, bei dem sich Zellen einem induzierbaren zellulären Suizid unterziehen - man spricht auch von einem programmierten Zelltod. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod ist die Apoptose von einer Neusynthese von Proteinen abhängig, die auf bestimmte Stimuli reagieren und durch Aktivierung von endogenen Proteinasen den zellulären Suizid einleiten. Die Integrität der Zellmembran bleibt dabei zunächst erhalten (Kerr et al., 1972). Der gesamte Ablauf der Apoptose geht zunächst einher mit einer Chromatinkondensation, es folgt eine Kernfragmentation, anschließend Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran und die Abschnürung dieser Ausstülpungen. Es bilden sich sogenannte „apoptotic bodies“ (Ellies et al., 1991). Darauf folgt eine Schrumpfung der Zelle und eine Ablösung von ihrem Untergrund. Der gesamte Vorgang ist zu keiner Zeit mit einer Entzündungsreaktion assoziiert (Kerr et al., 1972).

Die Apoptose besitzt im physiologischen Bereich vor allem eine Bedeutung in der Beseitigung von geschädigten, infizierten oder transformierten Zellen im Organismus. Eine weitere Aufgabe liegt in der Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen in der Wachstumsphase als auch in der Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen. In der Pathophysiologie kommt es hingegen bei vielen Krebsarten zu einer Inaktivierung der Apoptose und somit zu einer Zellwucherung (Wyllie et al., 1997). Zu degenerativen Erkrankungen kommt es in Folge eines überschüssigen Ablaufs von Apoptose.

Das Auftreten von Apoptose in Herzmuskelzellen wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben. So wurde das Vorkommen apoptotischer Kardiomyozyten im menschlichen insuffizienten Myokard untersucht. Am menschlichen explantierten Herzen mit insuffizientem Myokard zeigte sich ein Aufkommen von apoptotischen Kardiomyozyten zwischen 5% und 30% (Narula et al., 1996).

Durch Experimente an isolierten adulten Kardiomyozyten wurde eine mögliche Bedeutung von AngII bei der Induktion des programmierten Zelltods deutlich. Durch Stimulation mit AngII und dessen Bindung an den AT1-Rezeptor konnte Apoptose in Kardiomyozyten induziert werden, die sich durch den AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan völlig verhindern ließ (Kajstura et al., 1997). Die AngII-induzierte Apoptose ließ sich auch in neonatalen Kardiomyozyten nachweisen und über Zugabe von Losartan blockieren (Cigola et al., 1997). Ebenso konnte eine erhöhte Apoptoserate in AngII-infundierten Ratten durch Zugabe von Losartan aufgehoben werden (Diep et al., 2002). Auch die nach einem Myokardinfarkt in Rattenkardiomyozyten beobachtete Zunahme der Apoptosehäufigkeit war durch eine AT1-Rezeptorblockade hemmbar (Horiuchi et al., 1998). Weiterhin konnte auch in spontan-hypertensiven Ratten (SHR) einem Übermaß an Apoptose durch Losartan vorgebeugt werden (Ravassa et al., 2000). Die Signaltransduktionswege, über die AngII Apoptose in Kardiomyozyten stimuliert, sind noch weitgehend unbekannt. Weitaus besser untersucht ist die NO-abhängige Apoptose-Induktion in Kardiomyozyten. Diese ist cGMP-abhängig und wird über die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD vermittelt (Schneiders et al., 2005). Im Hinblick auf die AngII-vermittelten Signale ist der Transkriptionsfaktor AP-1 besonders interessant, da von Wenzel et al. (2001) gezeigt wurde, dass AngII über AP-1 die TGF β -Induktion in Kardiomyozyten steigert. Zusätzlich kommt AP-1 eine zentrale Rolle bei der direkten Hypertrophievermittlung nach α -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten zu (Taimor et al., 2004).

Zusammengenommen geben diese Befunde Hinweise auf eine bedeutende Beteiligung von AngII an der Entwicklung von Hypertrophie, Fibrose und Apoptose, den Hauptgründen für eine progrediente Herzinsuffizienz.

1.1.5 Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an Hypertrophie und Apoptose

Die unterschiedlichen Wirkungen von AP-1 auf Hypertrophie und Apoptoseinduktion im gleichen Zelltyp deuten auf eine zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz hin.

Der Grund für die unterschiedliche Wirkungsweise von AP-1 könnte zum einen in seiner Zusammensetzung liegen. AP-1 ist ein Dimer und besteht aus zwei Untereinheiten. Zu den Bindungspartnern für dieses Homo- oder Heterodimer gehören die Mitglieder aus der b-ZIP-Super-Proteinfamilie, zu der die Proteinfamilien Jun, Fos, Maf oder Nrl gehören (Kaminska et al., 2000; Kataoka et al., 1995). Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch eine gleiche oder ähnliche Zusammensetzung des AP-1-Dimers unter Apoptose und Hypertrophie (Schneiders et al., 2005).

Auch die Wechselwirkung von AP-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren kann Einfluß auf die transkriptions-aktivierende Wirkung von AP-1 nehmen und zu unterschiedlichen Resultaten wie Hypertrophie und Apoptose führen. So wurde eine gemeinsame Signalkaskade von AP-1 und dem Transkriptionsfaktor SMAD (3/4) identifiziert, die unter NO-Induktion zu Apoptose führte (Schneiders et al., 2005). SMADs sind typische Signalmoleküle der TGF β -Familie. Da durch AngII die Freisetzung von TGF β induziert wird, stellte sich die Frage, ob SMADs auch unter AngII induziert werden und somit über diesen Weg Apoptose in Kardiomyozyten auslösen können.

Ein weiterer Faktor, der mit AP-1 interagieren könnte, ist der Transkriptionsfaktor GATA. Es ist bereits bekannt, dass GATA zu der Entwicklung von Herzhypertrophie beitragen kann (Molkentin et al., 1998). Weitgehend ungeklärt ist, ob unter AngII-Stimulation neben AP-1 GATA induziert wird und damit zur TGF β ₁-Freisetzung oder Apoptose-Induktion unter AngII beitragen kann.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie lag in der Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte unter AngII-Stimulation mit AP-1 interagieren und somit die TGF β ₁-Expression oder Apoptoserate erhöhen können. Dazu wurde untersucht,

1. ob der Transkriptionsfaktor GATA unter AngII-Stimulation induziert wird und somit die AP-1-Aktivität über kooperative Bindung beeinflussen könnte.
2. inwiefern GATA zu der AngII-induzierten TGF β ₁-Expression und Apoptose-Induktion beiträgt.
3. über welche Signalwege die erhöhte GATA-Aktivität unter AngII reguliert wird.
4. ob im Anschluss an eine durch AngII erhöhte TGF β ₁-Expression über den Transkriptionsfaktor SMAD Apoptose ausgelöst wird.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin II	Bachem, Heidelberg
Ammonium-Persulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BCIP	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase; Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cy 3-dc TP-Farbstoff	Ammersham Bioscience, Freiburg
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithioreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fetal calve serum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe

HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Hoechst Farbstoff 33258 (Hoe 33258)	Riedel de Haën, Seelze
Medium 199/Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Riedel de Haën, Seelze
Mercaptopropanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
NBT	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Poly-(dIdC)	Roche Diagnostics, Mannheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Taufkirchen
SB 202190	Calbiochem, Bad Soden
SDS	Merck, Darmstadt
Sephadex G50	Calbiochem, Bad Soden
SNAP	Calbiochem, Bad Soden
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Terminale Transferase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TGF β_1	Oncogene, Darmstadt
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Chemikalien

2.1.2.1 Reverse Transkription

Reverse Transkriptase (M-MLV)	Gibco, BRL Eggenstein
DTT	Sigma, Taufkirchen

5xRT-Puffer

dNTP-Mix

RNAsin

Promega, Mannheim

Oligo-dT₍₁₅₎

Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.2.2 Realtime-PCR

Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*)

Gibco, BRL Eggenstein

10xPCR-Puffer

dNTP-Mix

MgCl₂

1%W-1

Primer

Reverser Primer

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

2.2 Antikörper

TGFβ- Antikörper

Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Antisense Oligonukleotide

GATA

Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Decoy-Oligonukleotide

AP-1	Invitrogen, Karlsruhe
GATA	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg
SBE1/2	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Geräte und Laborbedarf

2.5.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.5.1.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität, Gießen
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Nylonnetz Porengröße 200 um	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop, TMS-F	Nikon, Düsseldorf

2.5.1.2 Retardation Assay

Glasmörser	B. Braun, Melsungen
Hamiltonspritze (50ul)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefler-Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefler-Glasplatte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Hoefel-Spacer	Amersham Freiburg	Pharmacia	Biotech,
Hoefel-Kamm	Amersham Freiburg	Pharmacia	Biotech,
Hoefel-Plattenklemme	Amersham Freiburg	Pharmacia	Biotech,
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen		
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid		

2.5.1.3 RT-PCR

Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
--------------	-----------------------------

2.5.1.4 SDS-Gelelektrophorese

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

2.5.1.5 Hoechst 33258/Propidiumiodid Doppelfärbung

Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Japan
----------------------	----------------

2.5.1.6 Sonstige Geräte

Anlage zur Demineralisierung von Wasser	Millipore, Eschborn
Belichtungsgerät	Molecular-Packard, Frankfurt a. M.
Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen

Hybridisierungsöfen	Techne, Wertheim-Bestenheid
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Phosphor-Imager	Molecular Dynamics, Krefeld
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Krefeld
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Video-Dokumentation	Intas, Göttingen
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.5.1.7 Verbrauchsmaterialien

Immobilon P	Millipore, Eschborn
Hybond-N Nylon, 0,45 Micron	Amersham, Braunschweig
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, 3004, 3083 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

2.6 Auswertungs-Software

Corel Photo Paint	Corel Inc., USA
Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld

2.7 EDV

Microsoft Excel 2000

Microsoft Corp., USA

Microsoft Windows XP

Microsoft Corp., USA

Microsoft Word 2000

Microsoft Corp., USA

3 Methoden

3.1 Isolierung ventrikulärer Kardiomyozyten

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Wistar-Ratten aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere verfügten über freien Zugang zur Nahrung (Standardfutter: Altromin®) und Wasser. Die verwendeten Kardiomyozyten wurden aus 3-4 Monate alten männlichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 300–400 g isoliert.

3.1.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus dem Rattenherz (Piper et al.,1982)

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

Nach einer kurzen Diethylethernarkose von etwa 1-2 Minuten wurde den Ratten durch Zug das Rückenmark durchtrennt. Der Thorax der Ratten wurde eröffnet und das Zwerchfell entfernt. Es wurden Lunge und Herz entnommen und beides in eine bereitstehende, mit circa 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Petrischale, überführt. Dort wurde das dem Herzen anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt.

Mit der freipräparierten Aorta ascendens wurde das Herz an die Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und mit 40 ml Powell-Medium blutfrei gespült. Anschließend wurde das Herz über 25 Minuten mit 50 ml Kollagenasepuffer rezirkulierend perfundiert. Die Flussrate lag dabei bei circa 1 Tropfen pro Sekunde.

Powell-Medium (Carbogen begast)

NaCl	110 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Glukose	11 mmol/l
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2 mmol/l

Kollagenase-Puffer

Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20 mg (chargenabhängig)
Calcium-Stammlösung (100 mmol/l)	12,5 µl

Im Anschluß an die Perfusion wurden Vorhöfe und Aorta vom Herzen entfernt. Das verbleibende Ventrikelgewebe wurde mit Hilfe eines Gewebehackers mit einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert und der entstandene Gewebebrei in 30 ml Kollagenasepuffer bei einer Temperatur von 37°C über fünf Minuten nachverdaut. Es wurde mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um eine Trennung in einzelne Zellen zu unterstützen.

Die gewonnene Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und für drei Minuten bei 25 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Kollagenase-Lösung von den intakten Zellen abzutrennen. Die Trennung wurde durch Resuspension in 10 ml Powell-Medium (Powell mit CaCl₂, 200 µM) und erneute Zentrifugation (25 x g, 2 min) erleichtert und zudem eine langsame Gewöhnung der Herzmuskelzellen an Kalzium eingeleitet.

Das gewonnene Zellpellet wurde erneut in Powell-Medium mit einem CaCl₂-Anteil von 400 µmol/l aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. In eine bestimmte Anzahl von Reagenzgläsern, die sich nach der Zahl der präparierten Herzen richtete, wurde eine circa zehn Zentimeter hohe Flüssigkeitssäule (1 mM CaCl₂-Lösung) gegeben. In diese vorbereiteten Reagenzgläser wurde die homogene Suspension von Herzmuskelzellen aufgeteilt. Nach einer erneuten Zentrifugation (25 x g, 1 min) erhielt man eine Zellpopulation, die zu ca. 40–60 % aus intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.2 Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten

3.2.1 Vorinkubation der Kulturschalen

Um das Anheften der Herzmuskelzellen zu gewährleisten, wurden die verwendeten Kulturschalen für mindestens vier Stunden mit Vorinkubationsmedium bei 37°C beschichtet. Das Vorinkubationsmedium wurde kurz vor dem Ausplattieren der Zellen abgesaugt.

Vorinkubationsmedium

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

3.2.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausplattiert. Dabei lag der Anteil der lebenden, stäbchenförmigen Zellen auf der Schale bei 40-60%.

CCT-Kulturmedium

M199/HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mmol/l
Carnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytodin-β-Arabinofuranosid	10 µmol/l

auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert

3.2.3 Kultivierung der Kardiomyozyten

Die ausplattierten Kardiomyozyten wurden für zwei bis vier Stunden bei 37°C unter CO₂-freien Bedingungen inkubiert, um ein Anheften der intakten Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden hyperkontrahierte, nicht angeheftete Zellen durch zweimaliges Waschen mit CCT-Kulturmedium entfernt. Auf Schalen Typ Falcon 3001 (Ø 3cm) wurden je 1 ml, auf Schalen Typ Falcon 3004 (Ø 6cm) je 2 ml als Endvolumen gegeben.

Nach den Waschungen ergab sich ein Anteil von etwa 90% intakten, stäbchenförmigen Zellen, die für die nachfolgenden Versuche verwendet werden konnten.

Bei Versuchen, die eine Inkubation der Zellen über 24 Stunden erforderten, wurde dem CCT-Medium zusätzlich Gentamycin (10 µg/ml) zugegeben.

3.2.4 Behandlung der Zellen

3.2.4.1 Stimulation der Kardiomyozyten

Für die unterschiedlichen Versuchsvorhaben wurden die Kardiomyozyten nach den Waschungen und einer zehnmütigen Ruhephase mit verschiedenen Reagenzien behandelt. Dazu wurden die Reagenzien auf die Kulturschale gegeben und durch leichtes Schwenken im Kulturmedium verteilt.

Zur Induktion von Apoptose wurden die Zellen mit (+)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) in einer Konzentration von 100 µM behandelt.

Um die Zellen zu einer gesteigerten TGFβ-Expression anzuregen, wurden diese mit Angiotensin II (100 µM) behandelt.

Als Hypertrophiestimulus diente der α-Adrenorezeptor-Agonist Phenylephrin (10 µM) als Zugabe zu den Kardiomyozyten.

Die Kulturschalen wurden dann in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und normoxen Bedingungen über zwei Stunden inkubiert, bevor sie einer Zellernte unterzogen wurden.

Um den Verlauf einer Bindungsaktivitätssteigerung nach unterschiedlich langer Inkubationszeit zu untersuchen, wurden mit Angiotensin II stimulierte Zellen nach 2, 8 und 24 Stunden geerntet.

Zum Nachweis von Apoptose mittels Hoe-Assay wurden Kardiomyozyten über 24 Stunden mit Angiotensin II inkubiert.

Außerdem wurden jeweils unbehandelte Zellen als Kontrollproben herangezogen, die zeitgleich ausplattiert und geerntet wurden.

3.2.4.2 Transformation von Kardiomyozyten mit Oligonukleotiden

Zur Transformation der Kardiomyozyten mit Oligonukleotiden (500 nM) wurden die Zellen über einen Zeitraum von 5 Stunden mit dem Oligonukleotid vorinkubiert. Dieses wurde direkt nach dem Waschen der Zellen in das Kulturmedium gegeben und die Kulturschalen dann im Brutschrank bei 37°C und ca. 95% Luftfeuchte unter normoxen Bedingungen inkubiert. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Inkubationszeit von 5 Stunden ausreicht, damit Kardiomyozyten die Oligonukleotide aufnehmen können (Taimor et al., 2001). Um eine Stabilität des Oligonukleotides vor intrazellulären Exonukleasen in den Zellen zu erreichen, besaß das Oligonukleotid an den vier endständigen Basen Phosphothioester.

Decoy-Oligonukleotid

GATA-Decoy 5`-ACTAGTAGATAAGATG-3`

Das verwendete GATA-Decoy-Oligonukleotid bildet eine Konsensus-Bindungssequenz für GATA-Protein. Durch diese Konsensus-Bindungssequenz ist das GATA-Oligonukleotid in der Lage, GATA spezifisch zu binden und es intrazellulär abzufangen. Die im Retardation-Assay eingesetzten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide können somit nicht mehr an GATA-Protein binden. Zudem wird die Bindung des GATA-Proteins an seine spezifische DNA-Bindungsstelle verhindert und somit die Wirkung gehemmt.

Nach der Transformation mit dem GATA-Oligonukleotid wurden die Zellen mit Angiotensin II über 2 Stunden stimuliert.

3.3 Retardation-Assay

3.3.1 Zellernte

Es wurden jeweils zwei Schalen des Typs Falcon 3004 verwendet, die, wie in 3.2 beschrieben, ausplattiert und entsprechend den Versuchsbedingungen induziert und inkubiert wurden.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten von 2, 8 und 24 Stunden geerntet.

Die Zellen wurden dazu mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 2000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml 1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und erneut bei 2000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet direkt einer Kernextraktion unterzogen, bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

3.3.2 Kernextraktion

Das Zellpellet wurde in 400 μl Schwellungspuffer aufgenommen und sorgfältig in Suspension gebracht. Die Suspension wurde für 30-40 Minuten auf Eis gestellt und anschließend zehn Minuten bei 900 x g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

10 x Schwellungspuffer

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

Das verbliebene Zellpellet wurde in 400 μl Homogenisierungspuffer aufgenommen, vollständig in Suspension gebracht und 5-7 Minuten auf Eis gestellt.

10 x Homogenisierungspuffer

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

Mit Hilfe eines Glasmörsers wurde die Suspension mit 8 Stößen homogenisiert und im Anschluss bei 900 x g und 4°C über 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde erneut der Überstand abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde mit 40 µl Storagepuffer resuspendiert.

10 x Storagepuffer

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

Die Suspension wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Eis gestellt und währenddessen durch mehrmaliges Schütteln gründlich durchmischt. Um die übrigen, nicht benötigten Zellbestandteile abzutrennen, wurde die Suspension über 5 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den Kernextrakten wurde vorsichtig abpipettiert und direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3 Markierung der Oligonukleotide durch Fluoreszenz

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden zunächst in entsprechender Menge Tris/HCl/EDTA (TE)-Puffer gelöst, dann in jeweils äquimolaren Anteilen miteinander vermischt und im Thermo-Cycler auf 95°C erhitzt. Durch Abkühlung des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur innerhalb mehrerer Stunden durchliefen die Oligonukleotide ihre Schmelz- und Hybridisierungstemperatur und konnten somit einen Doppelstrang bilden.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

GATA	5`-ACTAGTAGATAAGATG-3`
AP-1	5`-ATCCGCTTGAT GAGTCAGCCGGAA -3
SBE	5`-GTACATTGTCAG TCTAGACATACT -3

Zur Fluoreszenzmarkierung wurden folgende Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben.

- 10 µl 10x NEPuffer
- 10 µl 2,5mM CoCl₂
- 20 ng Oligonukleotid
- 5 µl Cy3-dCTP
- 1 µl Terminale Transferase

Dabei wurden 12 µl GATA-Oligonukleotid (100 µM), bzw. 12 µl SBE-Oligonukleotid (100 µM) oder 2 µl AP-1-Oligonukleotid (100 µM) eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde mit 62 µl H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und anschließend über 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,3 M; pH 8) wurde die Reaktion abgestoppt.

Die auf diese Weise behandelten Oligonukleotide konnten nun während einer Gelelektrophorese das jeweilige spezifische Protein binden und durch Fluoreszenz markieren.

3.3.4 Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Retardation-Gels wurden zunächst zwei Glasplatten mit Spülmittel gereinigt und dann einer Entfettung mit Ethanol (100 %) unterzogen. Das Zusammenbauen der Gelkammer erfolgte mit Hilfe von zwei Kunststoff-Spacern, die seitlich zwischen den Glasplatten eingespannt wurden. Diese dienten als Abstandhalter und als seitliche Begrenzung der beiden Glasplatten. Nach unten wurde die Kammer mit Parafilm abgedichtet und in einer Plattenhalterung eingespannt.

Die Retardation-Gel-Lösung wurde frisch angesetzt. Dazu wurden folgende Reagenzien in einen Glas-Meßzylinder (50 ml) gegeben:

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

Die Reagenzien wurden gründlich durchmischt und sofort luftblasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gegossen.

100 x RA-Puffer

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

Um Taschen zu erhalten, in die später der Reaktionsansatz eingebracht werden sollte, wurde direkt ein Profilformer in das noch flüssige Gel eingesetzt. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Nach vollständiger Polymerisation erfolgte der Einbau des Gels in die Elektrophoresekammer. Dazu wurde der Profilformer entfernt, die Glasplatten aus der Halterung gelöst und in die Elektrophoresekammer eingebaut.

Anschließend wurde die Kammer mit 1 x RA-Puffer aufgefüllt. Die Glas-Gel-Platte hatte somit im oberen sowie unteren Teil Kontakt zum Puffer.

Die Geltaschen wurden mit einer Einmalspritze gespült, um Luftblasen zu entfernen. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Netzgerät angeschlossen und für 20 Minuten bei 60 V einem Vorlauf unterzogen, bevor die Reaktionsansätze (vgl. 3.3.5) nach erneuter Spülung der Taschen eingebracht wurden. Zusätzlich wurde ein Laufstreckenindikator (TAE-Puffer, 1 µl, gefärbt) in eine Tasche gegeben.

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

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

Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V und 4°C über 2 Stunden im GATA, bzw. SMAD-Bindungs-Assay und 2,5 Stunden im AP-1-Bindungs-Assay.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit den Glasplatten aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und im Fluoreszenz-Imager gescannt. Die unterschiedlichen Banden konnten durch Erfassung der verschiedenen Grauabstufungen mit Hilfe der „Quantity One“-Software densitometrisch ausgewertet werden.

3.3.5 Probenvorbereitung

Zur spezifischen Bindung der Oligonukleotide an das entsprechende Protein wurden 10 µl der in 3.3.2 extrahierten Kernextrakte mit 1,5 µl Bindungspuffer und 1 µl unspezifischer DNA (poly-(dIdC); 1 µg/µl) versetzt und 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Dabei wurden unspezifisch DNA-bindende Proteine abgefangen.

Bindungspuffer

10% (vol/vol) Glycerin
20 mM Tris/HCl
5 mM KCl
5 mM MgCl ₂

3 mM DTT

0,2 mM PMSF

Im Anschluss wurde dem Reaktionsansatz 1 µl des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidfragments (vgl. 3.3.3) und 3 µl Bindungspuffer zugegeben und erneut bei 30°C über 30 Minuten inkubiert.

Die Reaktionsansätze zur Untersuchung der GATA- und SMAD-Bindungsaktivität konnten nun in die Geltaschen eingebracht werden. Der Reaktionsansatz zur Messung der AP-1-Bindungsaktivität wurde zur Stabilisierung einer weiteren Inkubation über 30 Minuten mit 5 µl BSA unterzogen.

3.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde zum Nachweis der Proteinexpression durchgeführt. In einem Polyacrylamidgel erfolgte die Auftrennung des Gesamtproteinextraktes der Kardiomyozyten nach ihren Molekulargewichten. Die Proben konzentrieren sich dabei zunächst in einem großporigen Sammelgel, im Trenngel mit geringerer Porengröße und höherem pH-Wert findet die Auftrennung der Proben statt.

3.4.1 Vorbereitung der Proben

Zum Proteinnachweis wurden Kardiomyozyten verwendet, die wie in 3.2.4 beschrieben behandelt wurden. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wurde das Medium der Kulturschalen (Typ Falcon 3001) abgesaugt und jeweils 100 µl Lysispuffer zu den Kardiomyozyten hinzugegeben, um die Zellmembranen aufzulösen. Die Schalen wurden auf einen Schüttler gestellt und über einen Zeitraum von 15 Minuten geschüttelt.

Lysispuffer (SDS-Page)

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

Zur Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen diente Natrium-ortho-Vanadat, Mercaptopropandiol spaltete Disulfidbrücken.

Anschließend wurden zum Verdau der Nukleinsäuren 10 µl Benzonase[®] (50 U/ml Endkonzentration) pro Schale hinzugefügt. Nach weiterem Schütteln der Schalen über 10 Minuten konnten die aufgelösten Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgeschabt werden. Die Lösung wurde in ein 0,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und mit 20 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt.

2xLaemmli-Puffer

Tris/HCl	0,5 mol/l (pH 6,8)
Glycerin	25 % (vol/vol)
SDS 10 %ig	4 % (wt/vol)
β-Mercaptoethanol	1 % (vol/vol)
Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)

Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben in einem Thermoblock über 15 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden direkt verarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei –20°C tiefgefroren.

3.4.2 Herstellung eines Gels

Zur Herstellung eines Gels wurden zwei gründlich gereinigte und entfettete Glasplatten verwendet, von denen eine eine Aussparung (etwa 22 x 125 mm) an der oberen Seite besaß. An den seitlichen Rändern wurden zwei Spacer als Abstandhalter zwischen den Glasplatten eingesetzt, als untere Begrenzung diente ein Silikonschlauch mit entsprechender Dicke. Die Platten wurden mit Metallklammern an einer Gelkammer befestigt, wobei die Glasplatte mit der Aussparung der Innenseite der Kammer zugewandt war. Anschließend wurde das Trenngel (15%) frisch angesetzt und bis auf eine Höhe von 2/3 luftblasenfrei in den Zwischenraum gegossen.

4 x Trenngelpuffer

Tris/HCl	1,5 mol/l (pH 8,8)
SDS	0,4 % (wt/vol)

Trenngel (15%)

AA/BAA (30:1)	10 ml
Trenngelpuffer	5 ml
aqua bidest.	5 ml
APS 10 % (wt/vol)	50 µl
TEMED	40 µl
SDS 10 % (wt/vol)	200 µl

Das Trenngel wurde direkt mit Puffer beschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 30 Minuten wurde der Puffer dekantiert und das Trenngel mit dem frisch angesetzten Sammelgel überschichtet.

Sammelgelpuffer

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

Sammelgel

AA/BAA (30:1)	1,7 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
aqua bidest.	6,75 ml
APS 10 % (vol/vol)	100 µl
Temed	20 µl
SDS 10 % (wt/vol)	100 µl

Zur Taschenbildung wurde direkt ein Profilformer in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Nach Auspolymerisation wurden der Profilformer und der Silikonschlauch entfernt und die Glas-Gel-Platte vertikal in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde in der oberen sowie unteren Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Probenaschen wurden mit einer Spritze gespült. Anschließend konnten die vorbereiteten Proben (vgl. 3.4.1) aufgetragen werden. Es wurde jeweils 20 µl Probe je Tasche eingebracht.

Zur Molekulargewichtsbestimmung des zu untersuchenden Proteins wurden Protein-Molekulargewichtsmarker zwischen 29 und 205 kDa gleichzeitig auf das Gel aufgetragen.

Laufpuffer (SDS-PAGE)

Glycin	1,44 % (wt/vol)
Tris/HCl	0,3 % (wt/vol)
SDS	0,1 % (wt/vol)

Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V über zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4.3 Western-Blot-Verfahren

Das „Semi Dry Blotting-Verfahren“ nach Kyhse-Andersen (1984) wurde angewendet, um die in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine (vgl. 3.4.2) elektrophoretisch auf PVDF-Membranen zu transferieren. Als Pufferreservoir wurden in Puffer getränkte Filterpapiere verwendet. Anschließend konnten die nach dieser Methode fixierten Proteine mit Hilfe eines speziellen Antikörpers detektiert werden.

Die PVDF-Membran und neun Filterpapiere wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Jeweils drei Filterpapiere wurden in Kathodenpuffer, Anodenpuffer und konzentrierten Anodenpuffer getränkt.

Kathodenpuffer

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

Anodenpuffer

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

Konzentrierter Anodenpuffer

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

Zunächst wurden drei Filterpapiere in konzentriertem Anodenpuffer getränkt und dann auf die Anode der Blotkammer aufgelegt. Auf diese Filterpapiere wurden drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere in gleicher Weise aufgebracht. Die PVDF-Membran wurde für einige Minuten mit Methanol (100%) benetzt, kurz in Anodenpuffer geschwenkt und dann auf die bereits angebrachten Filterpapiere gelegt. Auf diese Schichten wurde das Polyacrylamidgel, bei dem zuvor das Sammelgel entfernt wurde, vorsichtig aufgebracht. Als letzte Schicht dienten drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere, bevor der Kathodendeckel aufgesetzt wurde. Alle Schichten wurden sorgfältig luftblasenfrei aufeinander aufgebracht, um einen guten Kontakt während der Elektrophorese zu gewährleisten. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (bzw. ca 90 mA) durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte nach etwa zwei Stunden.

3.4.4 Immunologischer Nachweis des TGF β ₁

Im Anschluß an den elektrophoretischen Proteintransfer auf eine PVDF-Membran, wie in 3.4.3 beschrieben, konnte TGF β mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden.

Zunächst wurde die PVDF-Membran mit einer BSA-Lösung (3%) in 1xTBS über zwei Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert. Durch diesen Prozess wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt.

10xTBS-Puffer

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l

Nach diesem Vorgang wurde die Membran zweimal mit 1xTBS über 5 Minuten gewaschen, bevor eine TGF β -Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben wurde und diese bei dauerndem Schwenken über zwei Stunden inkubiert wurde.

Erst-Antikörper-Lösung (pH 7,4)

Antikörper gegen TGF β	1 μ g/ml
BSA	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)
gelöst in TBS	

Nach der Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Waschung erfolgte mit 1xTBS, welches mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100 versetzt wurde. Zur Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe folgte die Inkubation mit der Zweit-Antikörper-Lösung über einen Zeitraum von zwei Stunden unter ständigem Schwenken.

Zweit-Antikörper-Lösung (pH 7,4)

Antiserum gegen Rabbit IgG, alkalische Phosphatase konjugiert	1 μ g/ml
BSA	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)
gelöst in TBS	

Nach Inkubation wurde die Membran erneut mit 1xTBS plus 0,5 % (wt/vol) Triton X-100 gründlich gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen.

Anschließend wurde die Membran durch Inkubation für zehn Minuten in alkalischem Phosphatasepuffer äquilibriert.

Alkalischer Phosphatasepuffer

Tris/HCl	100 mmol/l (pH 9,5)
MgCl ₂	25 mmol/l
NaCl	10 mmol/l

Die Farbreaktion zur Detektion von TGF β erfolgte mit Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Dabei wurde das zugesetzte Substrat 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) durch die Reaktion mit dem Farbstoff NBT und die an den Zweit-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase in ein violette Präzipitat umgesetzt. Dazu wurden 2,6 mg BCIP und 6,6 mg NBT in 20 ml alkalischem Phosphatase-Puffer vollständig gelöst und die Membran für ca.15 Minuten in dieser Lösung lichtgeschützt gefärbt. Im Anschluß wurde die Membran mit Wasser gespült und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

Die nun sichtbaren Banden konnten mit einem Scanner eingescannt und dem Computer-Programm Image Quant ausgewertet werden.

3.5 Nachweis der TGF β -Protein-Freisetzung im Dot-Blot-Verfahren

Die Freisetzung von TGF β wurde auch mit Hilfe des Dot-Blot-Verfahrens untersucht. Dieses Verfahren basiert auf einem Proteintransfer, bei dem Proteine durch Bildung eines Vakuums und der dabei entstehende Sogwirkung auf eine PVDF-Membran transferiert werden.

Zunächst wurde die untere Platte der Dot-Blot-Kammer mit drei Lagen Filterpapier, welche zuvor mit 1 x PBS getränkt wurden, ausgelegt. Auf dieses Filterpapier wurde eine auf entsprechende Größe zugeschnittene PVDF-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Die Deckplatte mit den Probenvertiefungen wurde auf die Membran aufgesetzt und an der Bodenplatte befestigt. Anschließend wurde eine Vakuumpumpe an die zusammengesetzte Dot-Blot-Kammer angeschlossen und eingeschaltet. Die Probenvertiefungen wurden mit 1 x PBS gespült.

Die Proben wurden einer Verdünnung von 1:10 mit 1 x PBS unterzogen, da die Ausgangsmenge an TGF β für die spätere Auswertung zunächst zu groß war. Es wurden jeweils 20 μ l der entsprechenden Probe (vgl. 3.4.2) eingesetzt. Die Probenansätze konnten nun in die entsprechenden Probenvertiefungen pipettiert werden. Nach etwa einer Minute wurden die Vertiefungen erneut mit 1 x PBS gespült.

Im Anschluß konnte die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen entnommen werden. Der Nachweis von TGF β erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und nachfolgender Anfärbung, wie in 3.4.4 beschrieben.

3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die Expression von TGF β auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die Realtime-PCR angewendet.

Die Durchführung der PCR ermöglicht eine schnelle Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleinsäuren. Somit bietet die PCR eine einfache Möglichkeit, die Menge der zu quantifizierenden Sequenzen durch deren Amplifikation einer quantitativen Analyse zugänglich zu machen.

Das Grundprinzip der PCR basiert auf einer Denaturierung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls durch Hitzeeinwirkung. Die Einzelstränge dienen als Matrize für Desoxyribonukleotide (Primer). Diese binden bei Temperaturabsenkung an den spezifischen komplementären Sequenzabschnitt (Hybridisierung) und dienen somit als Starter für die Produktzunahme (Polymerisation). Durch Wiederholung des Temperaturprofils nimmt die Gesamtproduktmenge exponentiell zu. Bei der Realtime-PCR wird die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen. Dabei wird die Produktzunahme mit Hilfe von Fluoreszenzlicht gemessen.

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist der dsDNA-sensitive Farbstoff SYBR[®] Green, ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff. Dieser bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Durch Bindung an die neugebildete doppelsträngige DNA wird die Fluoreszenz stark erhöht. Das generierte Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur DNA-Konzentration. Bei jedem PCR-Zyklus wird am Ende der Extensionsphase das Fluoreszenzsignal detektiert. Zu diesem Zeitpunkt haben die meisten SYBR[®] Green-Moleküle an die amplifizierte doppelsträngige DNA gebunden und das Fluoreszenzsignal ist somit am höchsten.

3.6.1 RNA-Isolation (Chomczynski and Sacchi, 1987)

Die behandelten Kardiomyozyten (vgl. 3.2.4) wurden wie in 3.3.1 geerntet und anschließend einer RNA-Isolation unterzogen. Es wurden jeweils fünf Schalen des Typs Falcon 3004 pro Versuchsbedingung verwendet, um genügend RNA zu gewinnen. Das gewonnene Zellpellet wurde mit 1000 µl und 4°C kühlem Trizol versetzt und gründlich geschüttelt. Nach vollständiger Auflösung des Pellets wurde die Suspension mit 200 µl gekühltem Chloroform versetzt und dann in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge über 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation erhielt man drei sichtbar unterscheidbare Phasen, bei denen sich RNA von DNA und Proteinen abtrennen ließ. In der unteren Chloroform-Phase setzten sich Proteine ab, in der mittleren Phase DNA und leichte Proteine. Die obere RNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in sterile 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die zuvor mit UV-Licht bestrahlt wurden, um eine RNase-Freiheit zu erhalten. Zur Fällung der RNA wurde Isopropanol in gleicher Menge hinzugefügt. Nach kurzer gründlicher Vermischung wurden die Proben für mindestens 20 Minuten bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben erneut über 15 Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die im Zellpellet befindliche gefällte RNA wurde mit 1000 µl 70%igem Äthanol gewaschen. Die Proben wurden wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Das Äthanol wurde vorsichtig abgegossen und das verbliebene Zellpellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach vollständiger Verflüchtigung des Äthanol wurde das Zellpellet in 10 µl kaltem nukleasefreiem Aqua bidest resuspendiert.

Die RNA-enthaltende Lösung konnte nun bis zur weiteren Verwendung bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.6.2 DNase-Behandlung der isolierten RNA

Um eine Amplifikation von noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen zu vermeiden, wurde die isolierte RNA einer DNase-Behandlung unterzogen, bevor sie in der RT-PCR eingesetzt wurde.

Zu jeder Probe (vgl. 3.6.1) wurde 17µl Mastermix hinzupipettiert und mit 23 µl DEPC auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Mastermix zur DNase-Behandlung

5 µl	10 x DNase-Puffer
5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
5 µl	DTT (0,1M)
1 µl	DNase
1 µl	RNAsin

Der Reaktionsansatz wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert.

Anschließend wurden 450 µl DEPC hinzugegeben und der Ansatz mit 500 µl Phenol/Chloroform vermischt. Die Lösung wurde bei 12000 x g über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in neue sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht. In diese wurde Chloroform zu einem Mischungsverhältnis von 1:1 hinzugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde erneut bei 12000 x g über 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde in neue sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht. Zur Fällung wurden 50 µl 3M NaAcetat (Mischungsverhältnis 1:10) und 1000 µl Äthanol (99%) hinzugefügt und vermischt. Nach einer Zentrifugation bei 12000 x g über 30 Minuten konnte der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet durch Zugabe von 500 µl Äthanol (70%) gewaschen werden.

Zum Abschluss wurde wieder bei 12000 x g über 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 10 µl DEPC resuspendiert.

Der RNA-Gehalt der Lösung konnte nun quantitativ photometrisch bestimmt werden.

3.6.3 Messung des RNA-Gehaltes

Im Anschluss an die DNase-Behandlung wurde der RNA-Gehalt quantitativ photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Es

wurden 3 µl der RNA-Lösung entnommen und in 1000 µl aqua bidest. gelöst. Nach Überführung in Halbmikro-Quarz-Küvetten konnte der RNA-Gehalt im Photometer bestimmt werden. Zur Überprüfung der RNA-Reinheit wurde zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, wobei das Verhältnis der beiden Extinktionswerte zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte, um eine möglichst reine RNA-Lösung vorliegen zu haben.

Nach der photometrischen Bestimmung wurde das Volumen berechnet, in dem 1 µg RNA gelöst war, da diese Menge zum Einsatz in der Reversen Transkription benötigt wurde. Ein Volumen von 5 µl RNA-enthaltende Lösung wurde dabei nicht überschritten.

3.6.4 Synthese der cDNA (Reverse Transkription)

Zur Herstellung der cDNA wurde pro Ansatz 1 µg RNA verwendet. Das zuvor berechnete Volumen der 1 µg RNA-enthaltenden Lösung wurde mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zur Denaturierung im Thermocycler über 10 Minuten auf 60°C erhitzt.

Währenddessen wurde der Reaktionsmix hergestellt.

Reaktionsmix für einen Ansatz

2,0 µl	5 x RT-Puffer
1,0 µl	Oligo-dT (0,1 mg/ml)
1,0 µl	dNTPs (10 mmol/l je Nukleotid)
0,2 µl	RNAsin (25 U/µl)
0,5 µl	Dithiotreitol (DTT, 0,1 mol/l)
0,3 µl	M-MLV-RT (200 U/µl)

Nach der Denaturierung im Thermocycler wurden die Proben auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurde 5 µl des Reaktionsmixes hinzupipettiert und dann kurz anzentrifugiert.

Die Reaktionsansätze wurden zur Reversen Transkription für eine Stunde bei 37°C in einen Thermocycler gestellt, anschließend wurde die gebildete cDNA über fünf

Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden nun direkt zur Amplifikation in der RT-PCR eingesetzt oder konnten bis zur weiteren Verwendung bei –80°C eingefroren werden.

3.6.5 Durchführung der Realtime-PCR

Die Amplifikation der synthetisierten cDNA wurde in einem iCycler der Firma Biorad® mit der Taq DNA-Polymerase durchgeführt. Es wurde der iQTM SYBR® Green Supermix verwendet, um Pipettierfehler und Kontaminationsgefahren zu vermeiden. Dieser enthielt alle notwendigen Ingredienzen in entsprechender Konzentration. Zunächst wurde der PCR-Reaktionsansatz vorbereitet. Dazu wurden folgende Reagenzien in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

PCR-Reaktionsansatz je Probe

iQTM SYBR® Green Supermix	10 µl
forward-Primer	0,3 µl (100 µmol/l)
reverse-Primer	0,3 µl (100 µmol/l)
aqua bidest.	6,4 µl

Als Primer wurde folgende Sequenz der Ratte eingesetzt:

TGFβ-fw	5'-AAT ACG TCA GAC ATT AGG GAA- 3'
TGFβ-rev	5'-GTG GAG TAG ATT ATC TTT GCT- 3'

Zunächst wurde 17 µl des Supermix in jedes Reaktionsgefäß vorpipettiert, dann wurden jeweils 3µl der entsprechenden Probe dazugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und zur Amplifikation in den iCycler gestellt. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bei einer maximalen Temperatur von 4°C.

Programmierung des iCyclers®

Die DNA-Synthese verläuft über drei Schritte. Bei der Denaturierung kommt es durch Hitzeeinwirkung zu einem Aufschmelzen der cDNA in ihre Einzelstränge. Durch Absenken der Temperatur hybridisieren die Primer mit den zu ihnen komplementären Abschnitten (Annealing). Während der folgenden, durch die thermostabile DNA-Polymerase katalysierten Polymerisationsreaktion, werden die Primer verlängert und es entstehen wieder doppelsträngige Produkte (Amplifikation).

Es erfolgte eine Programmierung des iCyclers®, bei der die unterschiedlichen Temperaturanforderungen für die verschiedenen Schritte der PCR festgelegt wurden. Die spezifische Annealingtemperatur für den TGFβ-Primer von 53°C wurde dabei berücksichtigt.

Zyklus 1: (1x)

Schritt 1:	95°C	für 3 min
------------	------	-----------

Zyklus 2: (45x)

Schritt 1: (Denaturierung)	95°C	für 30 sek
Schritt 2: (Annealing)	53°C	für 30 sek
Schritt 3: (Amplifikation)	72°C	für 30 sek

Schmelzvorgang: Temperatursteigerung in 0,5°C-Schritten bis 100°C

Zyklus 3: (100x)

Schritt 1:	50°C	für 10 sek
------------	------	------------

Nach erfolgtem PCR-Lauf wurde zunächst eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese diente zur Kontrolle der Amplifikationsreaktion, da der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green auch an doppelsträngige DNA unspezifischer Produkte binden kann. Unspezifische Produkte oder Primerdimere schmelzen jedoch unterhalb der spezifischen Schmelztemperaturen und können somit detektiert werden. Anschließend konnte der PCR-Lauf ausgewertet werden (vgl. 3.6.7).

3.6.6 HPRT als Housekeeping-Gen

Die Expression des zu untersuchenden Gens wurde in der RT-PCR auf ein zweites ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Als sogenanntes Housekeeping-Gen wurde HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) eingesetzt, welches unter Ang II-Induktion keine Regulation zeigte. Die Annealingtemperatur des HPRT liegt bei 65°C.

Primersequenz von HPRT

HPRT-fw 5'-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT - 3'
HPRT-rev 5'-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC - 3'

3.6.7 Realtime-PCR Auswertung

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit der $2\Delta\Delta CT$ -Methode (Pfaff et al., 2001). Bei dieser Methode wird die relative Expression eines Gens im Vergleich zu einem Referenzgen (Housekeeping-Gen) kalkuliert. Dazu wurde der Schwellenwert („Threshold“) mit Hilfe der iCycler-Software ermittelt.

Zunächst wurde zwischen den Zyklen 2 bis 10 die Standardabweichung der Fluoreszenz ermittelt, in denen die Kurve noch keinen Anstieg durch die Amplifikation zeigt. Der Mittelwert aller Standardabweichungen der verschiedenen Proben wurde mit dem Faktor 10 multipliziert. Dieser Wert wird als „threshold“ bezeichnet.

Anschließend wurde der „threshold cycle“ CT bestimmt. Dies ist der Zyklus, an dem die Amplifikationskurve einer Probe den „threshold“ schneidet.

Um die relative Expression zu berechnen, wurde der CT-Wert des Target-Gens von dem CT-Wert des HPRT-Gens subtrahiert:

$$CT (\text{Target}) - CT (\text{HPRT}) = \Delta CT$$

Dann wurde die Differenz zwischen den Δ CT-Werten der behandelten Zellen und der entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen berechnet:

$$\Delta\text{CT (induzierte Zellen)} - \Delta\text{CT Kontrolle} = \Delta\Delta\text{CT}$$

Der Wert $\Delta\Delta$ CT wurde in die Formel für die relative Expression eingesetzt:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.7 Quantitativer Apoptosenachweis isolierter Kardiomyozyten mittels der Hoechst 33258/Propidiumiodid-Doppelfärbung

Der zellmembrangängige DNA-Farbstoff HOE 33258 färbt alle Zellen bzw. deren Chromatin und wird im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 340-360 nm angeregt. Er zeichnet sich durch intensiv blaue Fluoreszenz aus. Die für die Spätphase der Apoptose typische Kondensation der Kerne, mit oder ohne Fragmentierung, kann durch intensiv blaue Fluoreszenz besonders gut erkannt werden.

Der zweite Farbstoff Propidiumiodid ist im Gegensatz zu HOE 33258 nicht membrangängig. Er färbt nur die Zellkerne nekrotischer Zellen, bei denen die Zellmembran bereits geschädigt ist. Bei einem Spektrum von 510-550 nm wird Propidiumiodid angeregt und zeigt dabei eine intensiv rote Fluoreszenz.

Zum Nachweis von Apoptose wurde etwa 20 Stunden nach Apoptose-Induktion (vgl. 3.2.4.1) das Kulturmedium mit HOE 33258 (5 μ g/ml) und Propidiumiodid (PI) (1 μ g/ml) versetzt. Die Kultur wurde im Brutschrank bei 37°C und einem Zeitraum von 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in zufällig gewählten Gesichtsfeldern im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Zunächst wurde unter Durchlicht die Zellzahl eines Gesichtsfeldes ausgezählt und dann, bei entsprechender Wellenlänge, deren Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen bestimmt. Insgesamt wurden 200 Zellen pro Schale ausgezählt.

3.8 Statistik

Die Meßwerte wurden als Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Einzelne Gruppen wurden dabei durch ANOVA (One way Analysis of Variance) und anschließend über Tukey-Test verglichen. Als statistisch signifikant unterschiedlich wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angesehen. Die Einordnung der Gruppen erfolgte in homogene Untergruppen (a,b,c).

Die Datenerfassung wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2000® als auch SPSS® Version 1.5.1 (SAS Institute Inc., Cary, N.C.,USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA unter Apoptose, Hypertrophie und TGF β 1-Stimulation in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde in früheren Studien als ein Vermittler von Apoptose, Hypertrophie und TGF β 1-Expression beschrieben. Eine Stimulation von Kardiomyozyten mit Angiotensin II führte zu einer gesteigerten TGF β 1-Expression (Wenzel et al., 2001). Unter α -adrenerger Stimulation durch den Rezeptoragonisten Phenylephrin (PE) wurde Hypertrophie ausgelöst (Taimor et al., 2002), Apoptose wurde nach Stimulation mit dem NO-Donor SNAP gefunden (Taimor et al., 2001). Es stellte sich daher die Frage, warum eine Aktivierung von AP-1 unter diesen Stimuli zu diesen unterschiedlichen Resultaten führen kann. Eine Aktivierung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren, die synergistisch mit AP-1 interagieren können, könnte Einfluss auf das Resultat der AP-1-Aktivierung nehmen. Ein möglicher Transkriptionsfaktor, der mit AP-1 interagieren könnte, ist GATA. Um eine mögliche Beteiligung von GATA an einem der durch AP-1 vermittelten Ereignisse festzustellen, wurde zunächst die GATA-Bindungsaktivität unter dem Einfluss der drei ausgewählten Stimuli untersucht.

4.1.1 Bindungsaktivität von GATA unter SNAP, AngII und PE

Um eine mögliche GATA-Aktivität festzustellen, wurden Kardiomyozyten über einen Zeitraum von zwei Stunden jeweils mit SNAP (100 μ M), PE (10 μ M) und AngII (100 nM) stimuliert. Die isolierten Kernextrakte aus den stimulierten Zellen wurden im Retardation-Assay auf ihre GATA-Bindungsaktivität überprüft. Dazu wurden die Kernextrakte mit einem fluoreszenzmarkierten GATA-Oligonukleotid inkubiert und elektrophoretisch im Retardation-Assay getrennt. Durch Bindung des GATA-Oligonukleotids an GATA entsteht ein „Bandshift“ (GATA + GATA-Oligonukleotid [Abb.4.1.1.a]).

Eine erhöhte Bindungsaktivität wird durch eine Verstärkung der Bande dargestellt. Kernextrakte aus PE- und AngII-induzierten Zellen zeigen, im Vergleich mit der Kontrollbedingung (C), eine deutliche Verstärkung der Bande. Somit erhöhen PE und AngII die Bindungsaktivität von GATA. Die Bindungsaktivität von GATA wurde durch Stimulation mit SNAP in einer Konzentration von 100 μ M nicht erhöht.

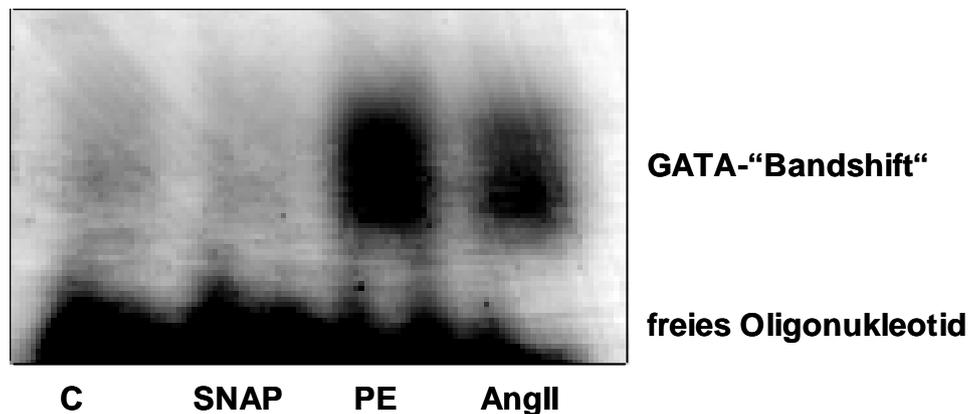


Abb. 4.1.1a Erhöhte GATA-Bindungsaktivität unter PE- und AngII-Stimulation. Kardiomyozyten wurden über einen Zeitraum von zwei Stunden mit SNAP, PE und AngII inkubiert. Das aus den jeweiligen Zellen gewonnene Kernextrakt wurde mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität untersucht. Dargestellt sind die Bandshifts eines repräsentativen Retardation-Gels.

Die quantitative Auswertung der Gele ist in Abb.4.1.1b dargestellt. Die Induktion der Zellen mit PE (10 μ M) über 2 Stunden zeigt eine deutliche Bindungsaktivitätssteigerung von GATA (124,9 \pm 11,5%). Nach Zugabe von AngII (100 nM) in das Kulturmedium und Inkubation der Zellen über zwei Stunden kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der GATA-Bindungsaktivität (110,5 \pm 10,9%). Durch Zugabe des NO-Donors SNAP (100 μ M) in das Kulturmedium konnte die GATA-Bindungsaktivität nicht gesteigert werden (103,8 \pm 10,7%).

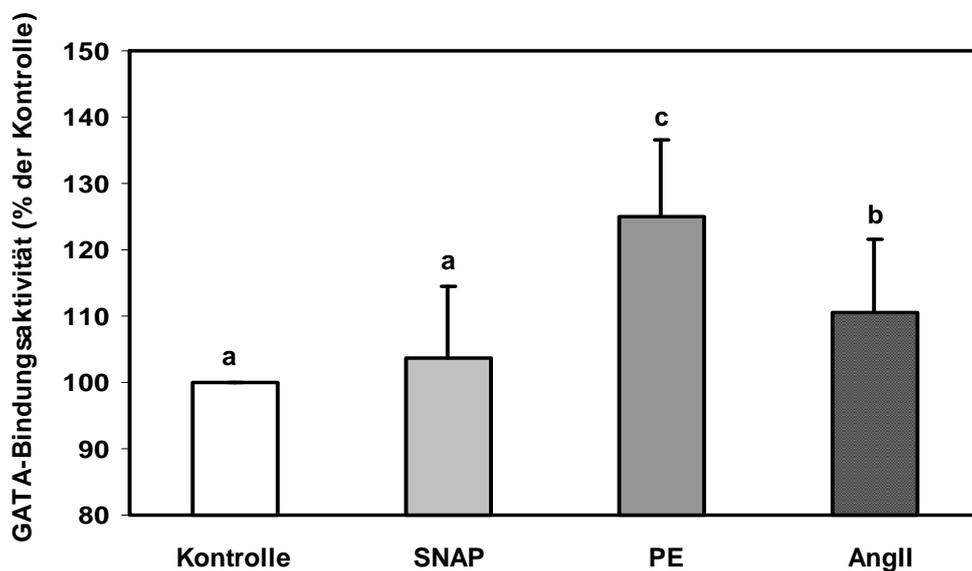


Abb. 4.1.1b Erhöhte GATA-Bindungsaktivität unter PE- und AngII-Stimulation. Kardiomyozyten wurden mit SNAP, AngII und PE stimuliert und über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Das aus den jeweiligen Zellen gewonnene Kernextrakt wurde mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität untersucht.

Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der Bandshifts aus den Retardation-Assays. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 unabhängigen Präparationen (n=8). Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander.

4.1.2 GATA-Bindungsaktivität ist unter AngII-Stimulation transient erhöht

Um den Zeitpunkt der höchsten Aktivierung der GATA-Bindungsaktivität festzustellen, wurden Kardiomyozyten mit AngII inkubiert und nach 2, 8 und 24 Stunden geerntet. Die isolierten Kernextrakte aus den stimulierten Zellen wurden im Retardation-Assay auf ihre GATA-Bindungsaktivität überprüft. Die GATA-Bindungsaktivität wurde mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten GATA-Oligonukleotids ermittelt, welches eine spezifische GATA-Bindungsstelle besitzt.

Eine maximale Aktivierung der GATA-Bindungsaktivität zeigte sich 2 Stunden nach AngII-Stimulation. Hier zeigte sich eine deutliche Verstärkung der Bande im Vergleich zur Kontrollbedingung. Nach einem Zeitraum von 8 und 24 Stunden nahm die GATA-Bindungsaktivität stetig ab. Dies zeigte sich in einer Abnahme der Bandenintensität.

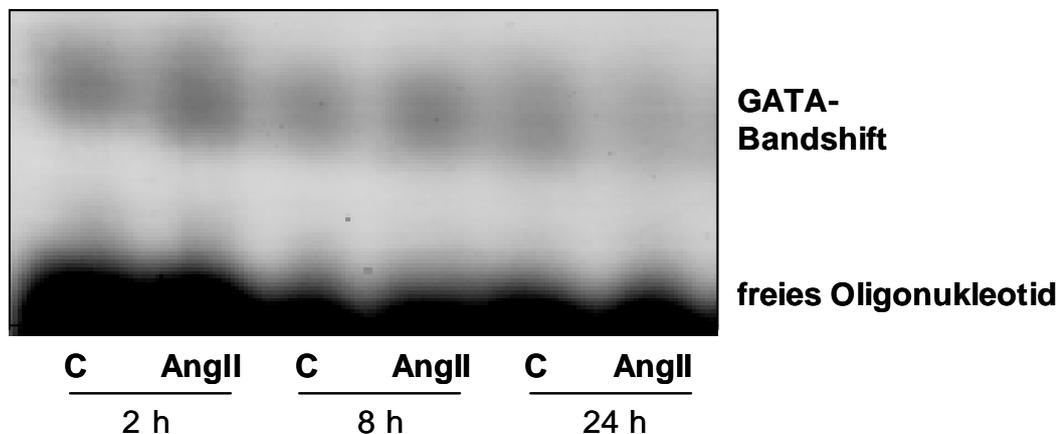


Abb. 4.1.2.a GATA-Bindungsaktivität in Kardiomyozyten unter Kontrollbedingung (C) und Inkubation mit AngII über 2, 8 und 24 Stunden. Das aus den jeweiligen Zellen gewonnene Kernextrakt wurde mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität untersucht. Die Abbildung zeigt die Bandshifts eines repräsentativen Gels.

In der quantitativen Auswertung der Bandshifts ergaben sich die in Abb.4.1.2.b gezeigten Resultate. Nach zweistündiger AngII-Stimulation kommt es zu einer maximalen Aktivierung der GATA-Bindungsaktivität ($170,7 \pm 9,8\%$). Diese Aktivierung ließ sich nach einer Inkubationszeit von AngII über 8 Stunden nicht mehr nachweisen ($125,6 \pm 8,2\%$). Nach 24 Stunden nahm die GATA-Bindungsaktivität nochmals ab ($119 \pm 12,9\%$).

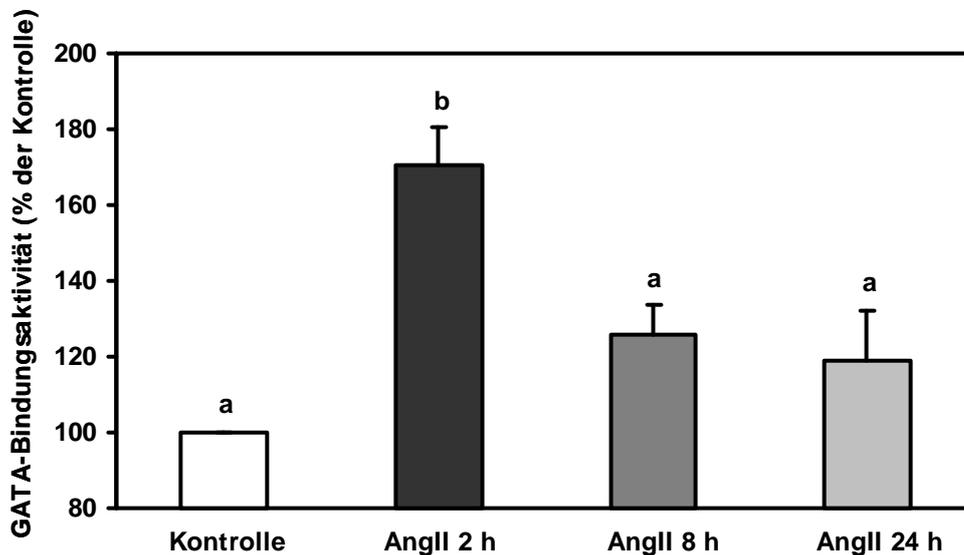


Abb. 4.1.2.b Gesteigerte GATA-Bindungsaktivität nach zweistündiger AngII-Stimulation. Kardiomyozyten wurden mit AngII stimuliert und nach 2, 8 oder 24 Stunden geerntet. Die isolierten Kernextrakte wurden im Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft. Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der Bandshifts aus den Retardation-Assays. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 unabhängigen Präparationen ($n=8$). Gruppen, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander.

4.1.3 Identifikation der aktivierten GATA-Isoformen in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte

In vorangegangenen Studien sind bereits sechs verschiedene GATA-Isoformen identifiziert worden. Um zu untersuchen, welche Isoformen zu der unter AngII gesteigerten GATA-Bindungsaktivität führen, wurden Kardiomyozyten über einen Zeitraum von zwei Stunden mit AngII stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, Gesamtzellextrakte gewonnen und die Ansätze einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Zur Identifikation der GATA-Isoformen wurden die GATA-Antikörper 4, 5 und 6 im Western-Blot eingesetzt. Denn von diesen Isoformen war bereits bekannt, dass sie im Herzen vorkommen.

Durch Anlagerung der spezifischen GATA-Antikörper an die in den Proben enthaltene GATA-Isoform und anschließender Farbreaktion (vgl. 3.4.4) kommt es zur Bildung einer sichtbaren Bande. Dabei zeigt eine vermehrte Schwärzung eine gesteigerte GATA-Expression an.

Ein repräsentatives Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 4.1.3 dargestellt. Es zeigte sich eine Expression von GATA 4 und 6 in den Kardiomyozyten, die unter AngII-Stimulation leicht erhöht wurde. Eine signifikante Erhöhung konnte jedoch nicht erfasst werden. Eine Expression von GATA 5 wurde nicht festgestellt.

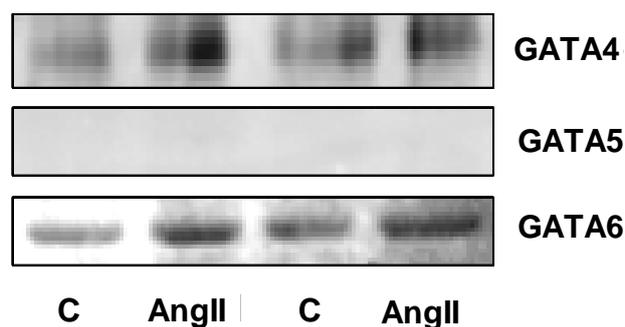


Abb. 4.1.3 Expression der GATA-Isoformen 4 und 6 in ventrikulären Kardiomyozyten nach AngII-Stimulation. Die Zellen wurden mit AngII (100 nM) stimuliert, nach zwei Stunden geerntet und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Die Expression der GATA-Isoformen wurde anschließend auf Proteinebene im Western-Blot bestimmt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der Western-Blots. Eine Expression der Isoformen 4 und 6 ist deutlich erkennbar, die Isoform 5 wurde hingegen nicht exprimiert.

4.1.4 Abnahme der GATA-Bindungsaktivität nach Transformation der Kardiomyozyten mit GATA-decoy-Oligonukleotid

Kardiomyozyten wurden durch Zugabe von GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) in das Kulturmedium über einen Zeitraum von 5 Stunden transformiert und dann über 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte gewonnen und die GATA-Bindungsaktivität im Retardation-Assay überprüft.

Einen repräsentativen Ausschnitt eines Retardation-Gels zeigt Abb. 4.1.3a. Unter AngII-Induktion zeigt sich eine deutliche Schwärzung der Bande und somit eine Bindungsaktivitätssteigerung von GATA im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe. Diese Aktivitätssteigerung ließ sich durch Abfangen der GATA-Aktivität mittels decoy-Oligonukleotiden reduzieren, die Schwärzung der Bande ist hier geringer. Nach alleiniger Transformation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotiden ist keine Bande zu erkennen.

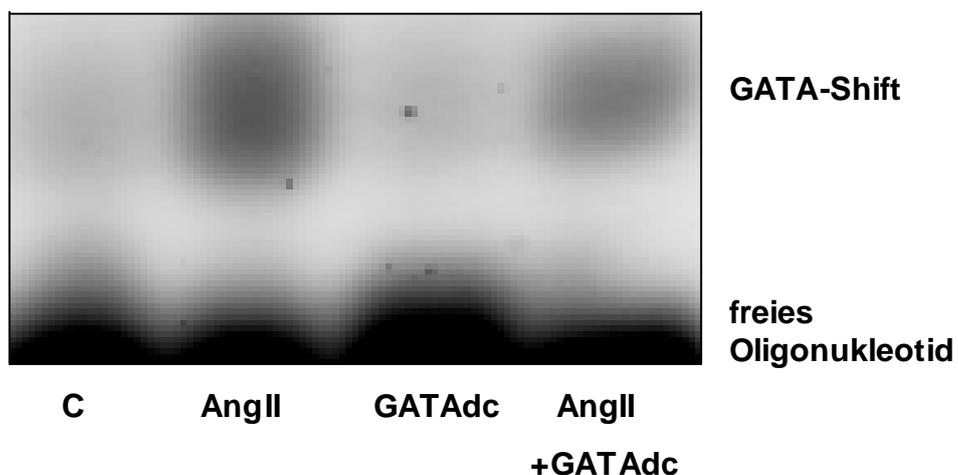


Abb. 4.1.3a GATA-Bindungsaktivität unter AngII nimmt nach Transformation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid ab. Die Zellen wurden über 5 Stunden mit dem decoy-Oligonukleotid (500 nM) vorinkubiert und anschließend 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte gewonnen und diese mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft. Dargestellt ist ein Ausschnitt eines repräsentativen Retardation-Gels.

Die quantitative Auswertung der Gele ist in Abb.4.1.3b dargestellt. Nach Stimulation der Zellen mit AngII (100 nM) über 2 Stunden zeigt sich eine signifikante Steigerung der Bindungsaktivität von GATA (143,1±10,8%) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe (C). Durch Vorinkubation mit dem spezifischen GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) konnte die AngII-induzierte Bindungsaktivitätssteigerung von GATA nicht mehr nachgewiesen werden (108,9±8,0%).

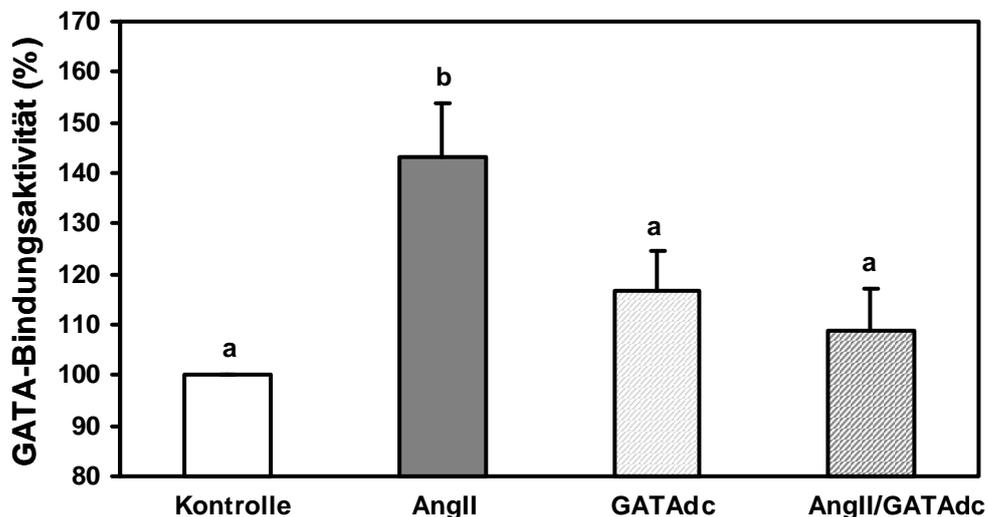


Abb. 4.1.3.b GATA-Bindungsaktivität nach AngII-Stimulation und Vorinkubation mit GATA-decoy-Oligonukleotid. Die Zellen wurden über 5 Stunden mit dem decoy-Oligonukleotid (500 nM) vorinkubiert und anschließend 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte gewonnen und diese im Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft

Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Bandshifts aus 6 unabhängigen Präparationen (n=6). Die Ergebnisse sind in Mittelwerten ± SEM dargestellt. Die Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.2 GATA erhöht die TGF β ₁-Expression unter AngII

4.2.1 Beteiligung des Transkriptionsfaktors GATA an der AngII-induzierten TGF β -Expression

Um eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors GATA an der AngII-induzierten, über AP-1 verlaufenden TGF β ₁-Expression zu überprüfen, wurden Kardiomyozyten mit GATA-decoy-Oligonukleotid transformiert. Wie zuvor gezeigt (siehe 4.1.3), ist dieses in der Lage, GATA abzufangen und somit die intrazelluläre GATA-Aktivität zu blockieren.

Kardiomyozyten wurden durch Zugabe von GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) in das Kulturmedium über einen Zeitraum von 5 Stunden vorinkubiert und anschließend 20 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Nach der Zellernte wurden die Gesamtzellextrakte gewonnen und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Die TGF β ₁-Expression wurde anschließend auf Proteinebene im Western-Blot bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis der Untersuchung ist in Abb.4.2.1a dargestellt. Wie in 3.4.4 beschrieben, kommt es durch Anlagerung von spezifischen TGF β ₁-Antikörpern an das in den Proben enthaltene TGF β und einer anschließenden Farbreaktion zu einer sichtbaren Bande. Eine vermehrte Expression stellt sich durch eine verstärkte Bande dar. Die mit AngII stimulierten Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Schwärzung der Bande und somit eine erhöhte TGF β ₁-Expression. Durch Abfangen der GATA-Aktivität mit einem GATA-decoy-Oligonukleotid konnte die TGF β ₁-Expression auf Kontrollniveau gesenkt werden.

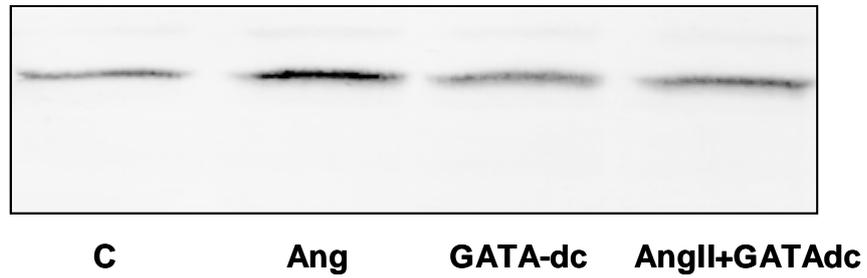


Abb. 4.2.1a TGF β ₁-Expression nach Inkubation mit GATA-decoy-Oligonukleotid. Die Zellen wurden 5 Stunden mit GATA-decoy (500 nM) transformiert und dann mit AngII (100 nM) über 20 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und anschließend die TGF β -Expression auf Proteinebene im Western-Blot bestimmt. Nach Stimulation mit AngII findet man eine stärkere Bande im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe. Diese erhöhte TGF β ₁-Expression ließ sich durch Präinkubation mit GATA-decoy-Oligonukleotiden auf Kontrollniveau senken.

Bei der quantitativen Auswertung der Banden zeigten sich die in Abb.4.2.1b gezeigten Verhältnisse. Eine Zugabe von AngII in das Kulturmedium bewirkte eine signifikante Steigerung der TGF β ₁-Expression (146,8±11,8%). Diese Expression ließ sich durch vorherige Transformation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid bis auf Kontrollniveau senken (108,9%±8,2%). Zur Überprüfung, ob dieser Effekt eindeutig auf die Hemmung durch das GATA-decoy-Oligonukleotid zurückzuführen ist, wurde zusätzlich ein mutiertes GATA-decoy-Oligonukleotid eingesetzt, welches keinen Einfluß auf die GATA Aktivität nehmen kann. Es zeigte sich, dass durch Transformation der Zellen mit dem mutierten GATA-decoy-Oligonukleotid die AngII-induzierte Bindungsaktivitätssteigerung von GATA nicht inhibiert werden konnte (144,5±2,9%). Daraus lässt sich schließen, dass GATA an der AngII-induzierten TGF β ₁-Expression beteiligt ist.

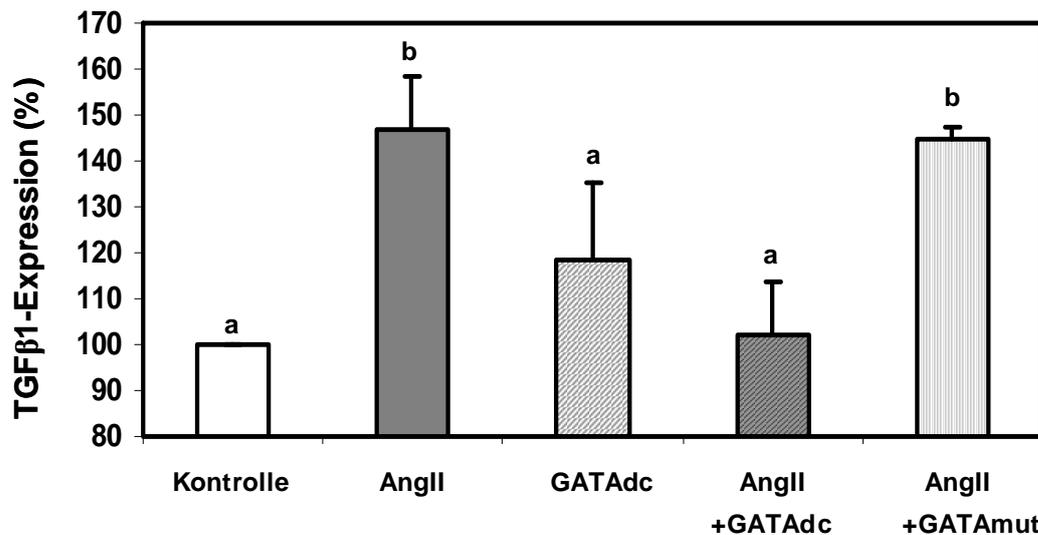


Abb. 4.2.1.b Gesteigerte TGF β ₁-Expression nach AngII-Stimulation. Kardiomyozyten wurden zunächst 5 Stunden mit GATA-decoy-Oligonukleotid oder mutiertem GATA-Oligonukleotid transformiert und anschließend über 20 Stunden mit AngII stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und anschließend die TGF β ₁-Expression auf Proteinebene im Western-Blot bestimmt. Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der Western-Blots aus 10 unabhängigen Präparationen (n=10). Die Ergebnisse sind in Mittelwerten ± SEM dargestellt. Die Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.2.2 Der Transkriptionsfaktor GATA erhöht die TGF β ₁-mRNA-Expression

Die im Western-Blot identifizierte, durch AngII stimulierte und über GATA vermittelte TGF β ₁-Expression wurde über die Realtime PCR verifiziert. Dazu wurden Kardiomyozyten mit GATA-decoy-Oligonukleotid über 5 Stunden vorinkubiert und anschließend 20 Stunden mit AngII stimuliert. Nach Zellernte wurde eine RNA-Isolation durchgeführt. Aus der Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte im iCycler® (vgl. 3.6).

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit der $2\Delta\Delta CT$ Methode (Pfaff et al., 2001). Mit dieser Methode wurde die relative Expression von TGF β ₁ im Vergleich zu HPRT als Housekeeping-Gen kalkuliert (vgl.3.6.6). Nach AngII Stimulation erhöhte sich die TGF β ₁-mRNA-Expression um das $1,8\pm 0,2$ -fache im Vergleich zur Kontrolle. Durch Transformation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid konnte AngII die TGF β ₁-mRNA-Expression nicht mehr stimulieren ($1,2\pm 0,3$ -fach). Die gemessene TGF β ₁-mRNA-Expression der lediglich mit GATA-decoy transformierten Zellen blieb unterhalb des Wertes der nicht stimulierten Kardiomyozyten. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in folgender Abbildung dargestellt.

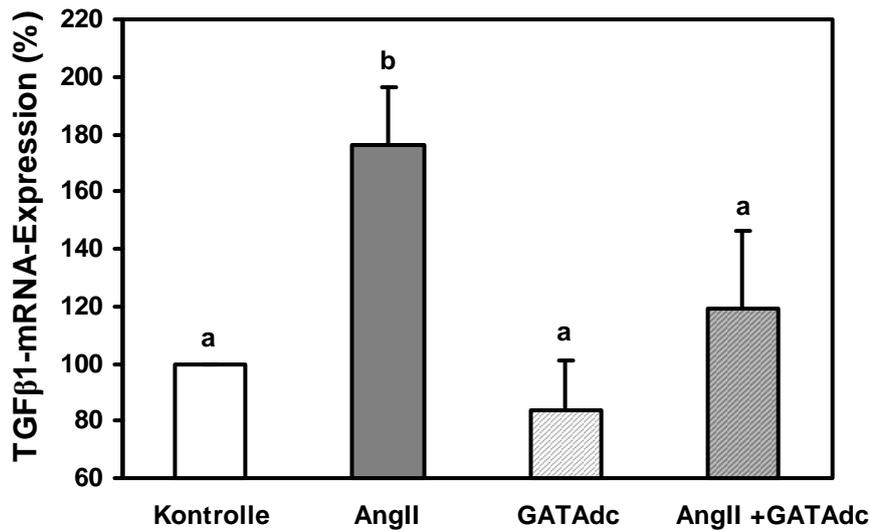


Abb. 4.2.2 Bestimmung der relativen Expression von TGFβ1-mRNA durch Realtime PCR. Kardiomyozyten wurden mit GATA-decoy-Oligonukleotid über 5 Stunden vorinkubiert und dann über 20 Stunden mit AngII stimuliert. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und einer Realtime PCR-Analyse unterzogen.

Nach Stimulation der Zellen mit AngII kommt es zu einem signifikanten Anstieg der TGFβ-Expression. Dieser Anstieg konnte durch Vorinkubation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid und Abfangen der GATA-Aktivität nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten ± SEM aus 8 unabhängigen Präparationen (n=8) dargestellt. Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die bereits auf Protein-Ebene im Western-Blot festgestellte Beteiligung von GATA an der AngII-stimulierten TGFβ1-Expression konnte somit auch auf mRNA-Ebene in der Realtime PCR bestätigt werden.

4.2.3 GATA erhöht die AngII-induzierte TGF β ₁-Freisetzung

Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors GATA an der AngII-induzierten TGF β ₁-Expression wurde bereits in den vorausgehenden Versuchen festgestellt. Im Folgenden wurde untersucht, ob es unter AngII-Induktion der Kardiomyozyten auch zu einer vermehrten Freisetzung von TGF β ₁ aus den stimulierten Zellen kommt und GATA auf die Freisetzung Einfluss hat.

Um die Freisetzung von TGF β ₁ unter AngII und die Beteiligung von GATA zu überprüfen, wurden Kardiomyozyten durch Zugabe von GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) in das Kulturmedium über 5 Stunden transformiert. Anschließend wurden die Zellen mit AngII (100 nM) über 20 Stunden stimuliert. Von den Kulturschalen wurde der Überstand entnommen und im Dot-Blot-Verfahren auf TGF β ₁-Freisetzung überprüft (vgl. 3.5). Durch Bindung des spezifischen Antikörpers und nachfolgender Anfärbung kommt es zu einer punktuellen Schwärzung. Diese wird umso stärker, je mehr Protein nachgewiesen werden kann.

Ein repräsentatives Ergebnis eines Dot Blots aus einer Zellpräparation ist in Abb.4.2.3a dargestellt. Es zeigt sich eine verstärkte Freisetzung von TGF β ₁ unter AngII-Stimulation im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe (C). Nach Transformation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid, welches die intrazelluläre GATA-Aktivität abfangen kann, konnte AngII die TGF β ₁-Freisetzung nicht mehr stimulieren. Die Schwärzung des Dots erreicht hier nur Kontrollniveau. Durch alleinige Transformation der Zellen mit GATA-decoy kommt es zu einer geringeren Schwärzung des Dots im Vergleich zur Kontrolle, die TGF β ₁-Freisetzung liegt hier unter Kontrollniveau. Es zeigt sich somit eine Beteiligung von GATA an der TGF β ₁-Freisetzung.

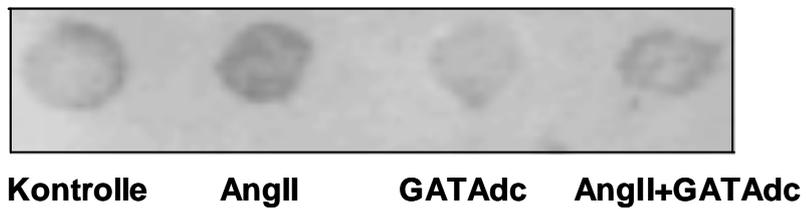


Abb. 4.2.3a TGF β ₁-Freisetzung unter AngII-Induktion wird durch GATA-decoy-Oligonukleotide (GATAdc) gehemmt. Kardiomyozyten wurden mit GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) transformiert und nach 5 Stunden mit AngII (100 nM) über 20 Stunden stimuliert. Der Kulturüberstand wurde im Dot-Blot-Verfahren eingesetzt. Der Nachweis von TGF β ₁ erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und nachfolgender Anfärbung. Gezeigt ist die Färbung eines repräsentativen Dot Blots.

Die quantitative Auswertung der Dot Blots ist in Abb.4.2.3b gezeigt. Eine Stimulation der Zellen mit AngII (100 nM) führte zu einer verstärkten TGF β ₁-Freisetzung (240,5±50,4 %) im Vergleich zur Kontrollprobe. Durch Vorinkubation der Zellen mit GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) konnte AngII die TGF β -Freisetzung nicht mehr stimulieren (130,47±22,11%).

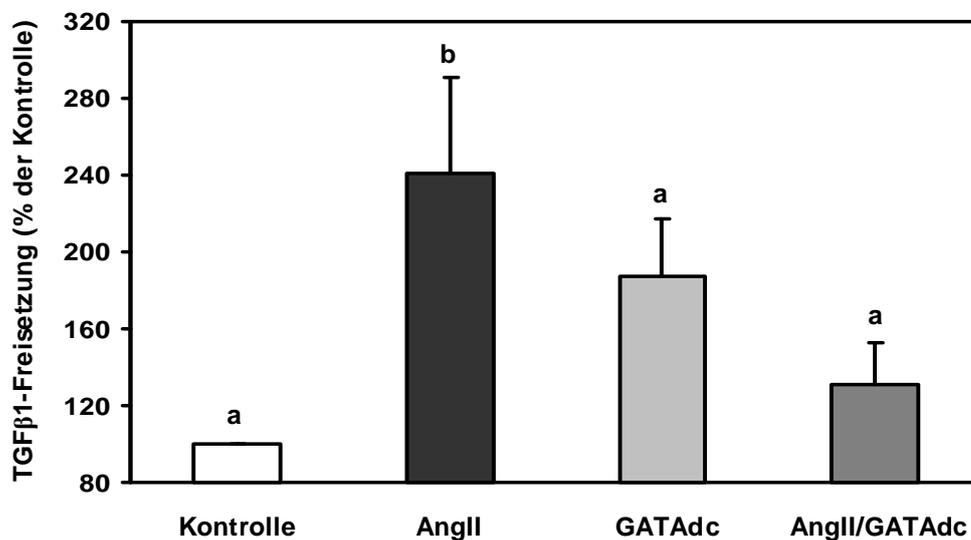


Abb. 4.2.3b TGF β ₁-Freisetzung unter AngII-Induktion wird durch GATA-decoy-Oligonukleotide gehemmt. Kardiomyozyten wurden mit GATA-decoy-Oligonukleotid (500 nM) transformiert und nach 5 Stunden mit AngII (100 nM) über 20 Stunden stimuliert. Der Kulturüberstand wurde im Dot-Blot-Verfahren eingesetzt. Der Nachweis von TGF β ₁ erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und nachfolgender Anfärbung. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Banden aus den Dot Blots. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten ± SEM aus 15 unabhängigen Präparationen (n=15) angegeben. Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.3 Die Aktivierung von AP-1 und GATA wird über p38 MAPK vermittelt

Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Stimulierung von Kardiomyozyten mit AngII (100 nM) über die p38 MAPK zu einer gesteigerten TGF β ₁-Expression führt (Wenzel et al., 2001). Es stellte sich daher die Frage, ob die p38 MAPK die AngII-induzierte Bindungsaktivitätssteigerung von GATA und AP-1 vermittelt.

4.3.1 Beteiligung der p38 MAPK an der Bindungsaktivitätssteigerung von AP-1 nach AngII-Stimulation

Um zu überprüfen, ob die p38 MAPK die AP-1-Bindungsaktivitätssteigerung durch AngII-Induktion vermittelt, wurden Kardiomyozyten zunächst mit SB 202 190 (1 μ M), einem spezifischen Inhibitor der p38 MAPK, 20 Minuten vorinkubiert und dann über 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte isoliert und diese im Retardation-Assay auf ihre AP-1-Bindungsaktivität überprüft. Die Kernextrakte wurden dazu mit einem fluoreszenzmarkierten AP-1-Oligonukleotid inkubiert. Es kommt dabei zu einer Bindung des AP-1-Oligonukleotids an das AP-1-Protein aus den Kernextrakten. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Retardation-Assay entsteht ein Bandshift (Abb. 4.3.1a).

Die Stimulation der Zellen mit AngII führte zu einer verstärkten Schwärzung der Bande und somit zu einer gesteigerten Bindungsaktivität von AP-1. In Gegenwart von SB 202 190 wurde die Aktivität von AP-1 reduziert, der Bandshift stellt sich hier nicht stärker dar als in der Kontrollprobe. Eine alleinige Induktion mit SB 202 190 ergab keinen Anstieg der AP-1-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen.

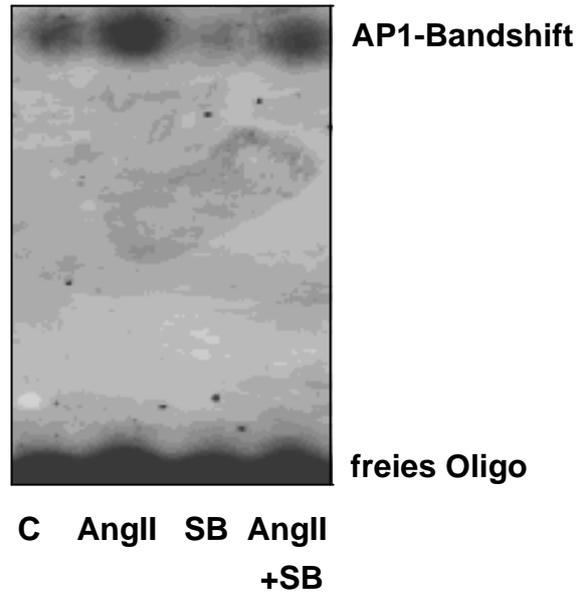


Abb. 4.3.1a Reduktion der AngII-induzierten AP-1-Bindungsaktivität durch Inhibition der p38 MAPK. Kardiomyozyten wurden 20 Minuten mit SB 202 190 (1 μ M), einem spezifischen Inhibitor der p38 MAPK, vorinkubiert und anschließend 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Die gewonnenen Kernextrakte wurden im Retardation-Assay auf ihre AP-1-Bindungsaktivität überprüft. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Retardation-Gel.

Die quantitative Auswertung der Retardation-Gele ist in Abb.4.3.1.b dargestellt. Eine Stimulation der Kardiomyozyten mit AngII über 2 Stunden führte zu einer signifikant gesteigerten Bindungsaktivität von AP-1 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe ($168,6 \pm 23,9\%$). In Gegenwart des spezifischen Inhibitors der p38 MAPK (SB 202 190, $1 \mu\text{M}$) und AngII-Stimulation wurde die Bindungsaktivität von AP-1 auf $90,2 \pm 12,1\%$ reduziert. Die alleinige Induktion der Zellen mit SB 202 190 erhöhte die Bindungsaktivität von AP-1 ebenfalls nicht ($81,4 \pm 27,0\%$). Somit zeigt sich eine Beteiligung der p38 MAPK an der AngII-induzierten AP-1-Bindungsaktivitätssteigerung.

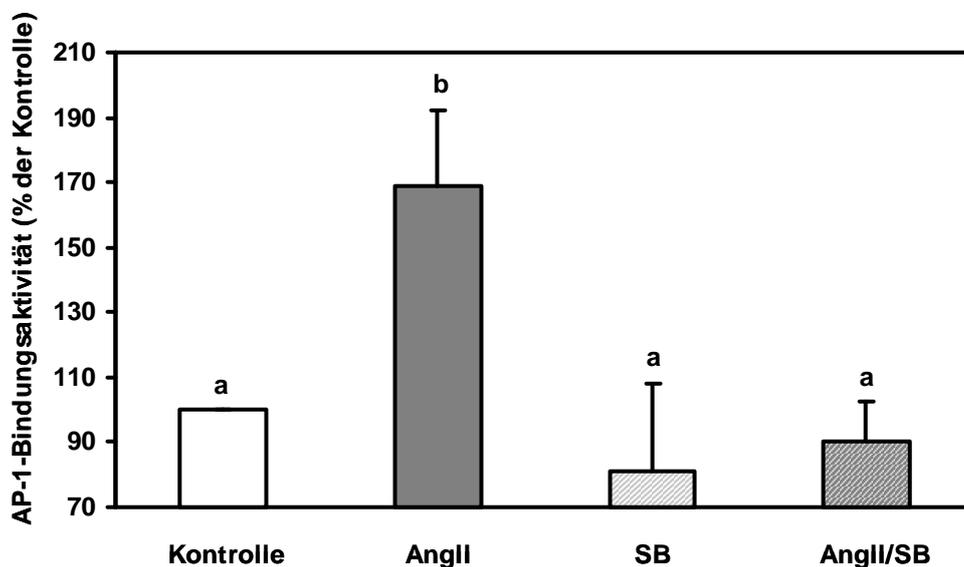


Abb. 4.3.1b Reduktion der AngII-induzierten AP-1-Bindungsaktivität durch Inhibition der p38 MAPK. Kardiomyozyten wurden mit SB 202 190 ($1 \mu\text{M}$) über 20 Minuten vorinkubiert und dann 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Das gewonnene Kernextrakt wurde mittels Retardation-Assay auf AP-1-Bindungsaktivität untersucht. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Bandshifts aus den Retardation-Assays.

Die Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM aus 4 unabhängigen Präparationen ($n=4$) dargestellt. Gruppen, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander.

4.3.2 Steigerung der GATA-Bindungsaktivität unter AngII-Stimulation wird über die p38 MAPK vermittelt

Durch vorherige Untersuchungen (siehe 4.3.1) hat sich gezeigt, dass die Aktivierung der p38 MAPK der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 unter AngII-Stimulation vorausgeht. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Aktivierung der p38 MAPK auch an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA beteiligt ist. Dazu wurden Kardiomyozyten mit einem spezifischen Inhibitor der p38 MAPK (SB 202 190, 1 μ M) über 20 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen über 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Nach Gewinnung der Kernextrakte wurden diese mit einem fluoreszenzmarkierten GATA-Oligonukleotid inkubiert und dann im Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft.

Durch AngII-Stimulation kommt es zu einer verstärkten Schwärzung des Bandshifts und somit zu einer Erhöhung der GATA-Bindungsaktivität. Durch Inhibition der p38 MAPK wurde die Aktivitätssteigerung von GATA reduziert.

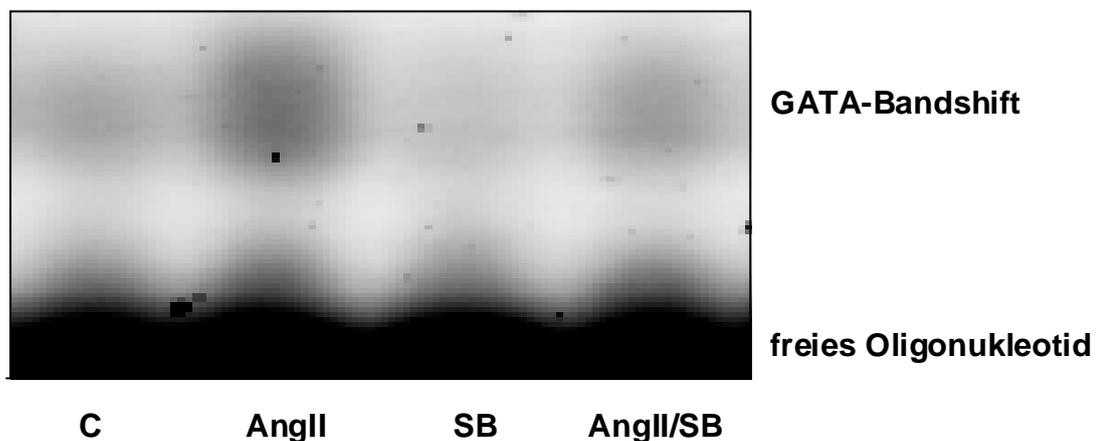


Abb. 4.3.2a Reduktion der AngII-induzierten GATA-Bindungsaktivität durch Inhibition der p38 MAPK. Kardiomyozyten wurden 20 Minuten mit einem spezifischen Inhibitor der p38 MAPK vorinkubiert und dann 2 Stunden mit AngII stimuliert. Die aus den Zellen gewonnenen Kernextrakte wurden mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft. Dargestellt ist ein repräsentatives Retardation-Gel.

Bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse zeigten sich die in Abb. 4.3.2b gezeigten Verhältnisse. Die Bindungsaktivität von GATA ließ sich durch AngII-Stimulation signifikant erhöhen ($155,4 \pm 21,2\%$). Durch Inhibition der p38 MAPK wurde die Bindungsaktivität von GATA reduziert ($71,8 \pm 16,1\%$).

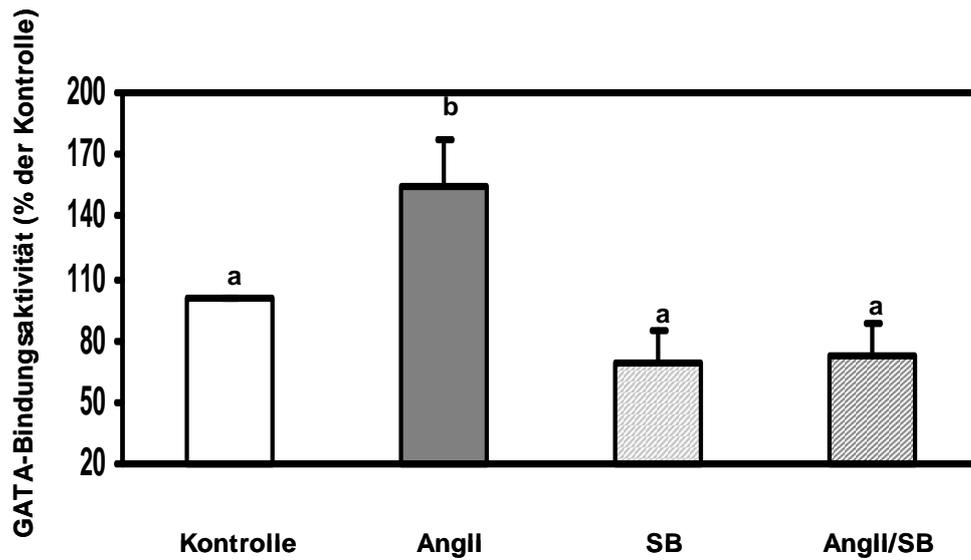


Abb. 4.3.2b Reduktion der AngII-induzierten GATA-Bindungsaktivität durch Inhibition der p38 MAPK. Kardiomyozyten wurden mit SB 202 190 ($1 \mu\text{M}$) über 20 Minuten vorinkubiert und dann 2 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert. Die gewonnenen Kernextrakte wurden mittels Retardation-Assay auf GATA-Bindungsaktivität überprüft. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Bandshifts aus den Retardation-Assays.

Die Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM aus 13 unabhängigen Präparationen ($n=13$) dargestellt. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander.

4.4. Der Wachstumsfaktor TGF β ₁ aktiviert die Bindungsaktivität von SMAD

Aus vorausgegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die Bindungsaktivität von SMAD durch Induktion der Kardiomyozyten mit TGF β ₁ erhöht wird (Schneiders et al., 2005). Die Bindung von TGF β ₁ an TGF β -Rezeptoren mit anschließender SMAD-Aktivierung ist dabei ein klassischer Signalweg. Da die TGF β ₁-Expression und -Freisetzung innerhalb von 24 Stunden unter AngII-Stimulation erhöht ist, stellte sich nun die Frage, ob TGF β ₁ in einer autokrinen Schleife wirken kann und nach Freisetzung, über Bindung an TGF β -Rezeptoren, eine SMAD-Bindungsaktivitätssteigerung induzieren kann.

4.4.1 Die Bindungsaktivität von SMAD nach Inhibition des Transkriptionsfaktors TGF β ₁

Um zu überprüfen, ob AngII über TGF β ₁ die SMAD-Bindungsaktivität in Kardiomyozyten steigern kann, wurden die Zellen mit AngII (100 nM) über 20 Stunden stimuliert. Dabei wurde einem Teil der Kulturschalen TGF β ₁-AK (1 μ g/ml) zugesetzt, um freigesetztes TGF β ₁ zu inhibieren. Einem weiteren Teil der Zellen wurde ein Cytochromoxidase-AK (anti-cox, 1 μ g/ml) zugesetzt, um mögliche unspezifische Interferenzen von Antikörpern auszuschließen. Aus den Zellen wurden Kernextrakte isoliert und die Bindungsaktivität von SMAD im Retardation-Assay untersucht.

Die Kernextrakte wurden dazu mit einem fluoreszenzmarkierten SBE-Oligonukleotid inkubiert, welches mit seiner spezifischen Bindungsstelle an das SMAD-Protein bindet und somit einen Bandshift bilden konnte.

Unter AngII-Stimulation zeigt sich eine erhöhte SMAD-Bindungsaktivität, im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe. Nach Inhibition der TGF β ₁-Aktivität durch TGF β ₁-AK wurde die SMAD-Bindungsaktivität unter AngII-Stimulation nicht erhöht. Eine Zugabe von Cytochromoxidase-AK reduzierte die SMAD-Bindungsaktivität in AngII-stimulierten Zellen nicht. Demnach ist die Reduktion der SMAD-Bindungsaktivität ein spezifischer Prozess und keine Folge von Antikörper-Interferenzen.

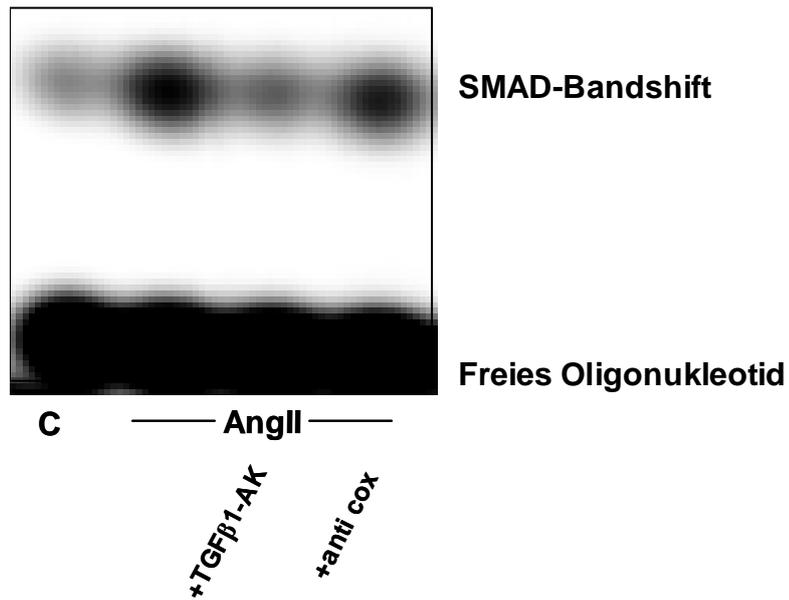


Abb. 4.4.1a Reduktion der SMAD-Bindungsaktivität unter AngII durch TGFβ₁-AK. Kardiomyozyten wurden TGFβ₁-AK (1 μg/ml) und Cytochromoxidase-AK (anti-cox, 1 μg/ml) zugesetzt und anschließend über 20 Stunden mit AngII stimuliert. Die aus den Zellen gewonnenen Kernextrakte wurden mittels Retardation-Assay auf SMAD-Bindungsaktivität überprüft. Dargestellt ist ein repräsentatives Retardation-Gel.

Die quantitative Auswertung der Untersuchung ist in Abb. 4.4.1 graphisch dargestellt. Durch Zugabe von AngII über einen Zeitraum von 20 Stunden kommt es zu einer Erhöhung der Bindungsaktivität von SMAD ($113,11 \pm 3,17\%$). Nach Blockade des freigesetzten TGFβ₁ durch den TGFβ₁-AK wurde die Bindungsaktivität von SMAD auf Kontrollniveau reduziert ($96,90 \pm 4,60\%$). Eine alleinige Zugabe von TGFβ₁-AK zu den Zellen führte nicht zu einer Bindungsaktivitätssteigerung ($98,61 \pm 3,66\%$). Somit kann TGFβ₁, welches nach AngII-Stimulation vermehrt von Kardiomyozyten

freigesetzt wird, in den Kardiomyozyten in einer autokrinen Schleife wirken und eine SMAD-Aktivierung stimulieren.

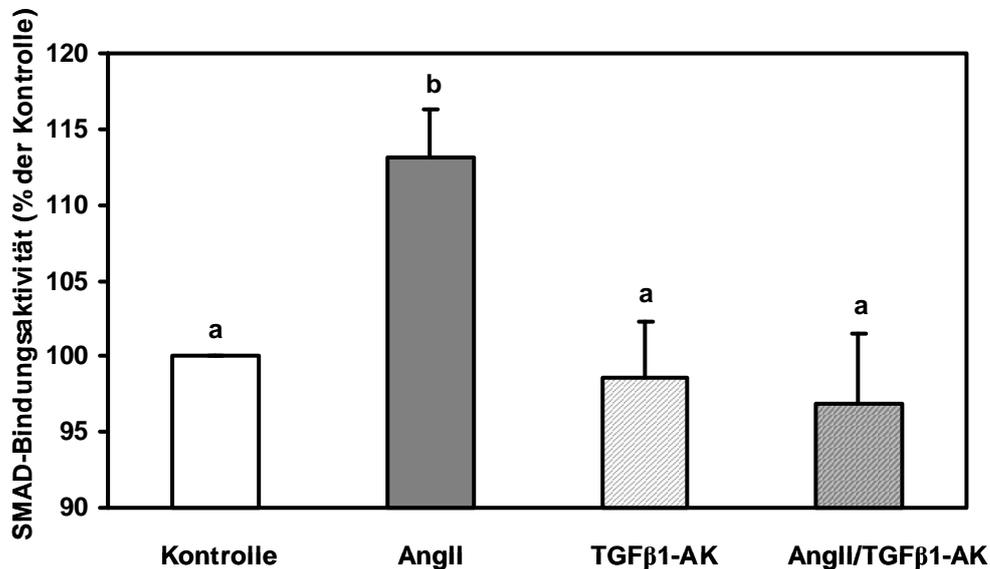


Abb. 4.4.1 Reduktion der SMAD-Bindungsaktivität unter AngII durch TGFβ1-AK. Kardiomyozyten wurden über 20 Stunden mit AngII (100 nM) stimuliert, einem Teil der Kulturschalen wurde TGFβ1-AK (1 µg/ml) zugesetzt. Die gewonnenen Kernextrakte wurden mittels Retardation-Assay auf SMAD-Bindungsaktivität untersucht.

Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung der Retardation-Gele. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten ± SEM aus 4 unabhängigen Präparationen (n=4) dargestellt. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander.

4.5 Apoptose-Induktion über den TGFβ/SMAD-Signalweg

Es wurde bereits gezeigt, dass die AngII-induzierte Bindungsaktivitätssteigerung von SMAD durch Abfangen der TGFβ1-Aktivität reduziert werden konnte (vgl. 4.4). Sowohl SMAD als auch TGFβ1 können Apoptose in Kardiomyozyten induzieren (Schneiders et al., 2005). Es stellte sich deshalb die Frage, ob das nach AngII-Stimulation vermehrt exprimierte TGFβ1 in einer autokrinen Schleife wirken und so zu einem späteren Zeitpunkt an TGFβ-Rezeptoren binden kann und über den SMAD-

Signalweg Apoptose auszulösen vermag. Um diese mögliche Apoptose-Induktion zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden (SMADdc, 500 nM) über 5 Stunden transformiert und anschließend mit AngII (100 nM) stimuliert. Die Apoptoserate wurde nach 24 Stunden quantitativ mit Hilfe der HOE/PI-Doppelfärbung bestimmt.

Die mit AngII-stimulierten Zellen zeigten eine erhöhte Zahl von apoptotisch veränderten Kardiomyozyten ($20,05 \pm 1,24\%$) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollprobe. Diese AngII-induzierte erhöhte Apoptoserate wurde verhindert, wenn die SMAD-Aktivität durch Transformation der Kardiomyozyten mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden inhibiert wurde ($14,88 \pm 1,37\%$).

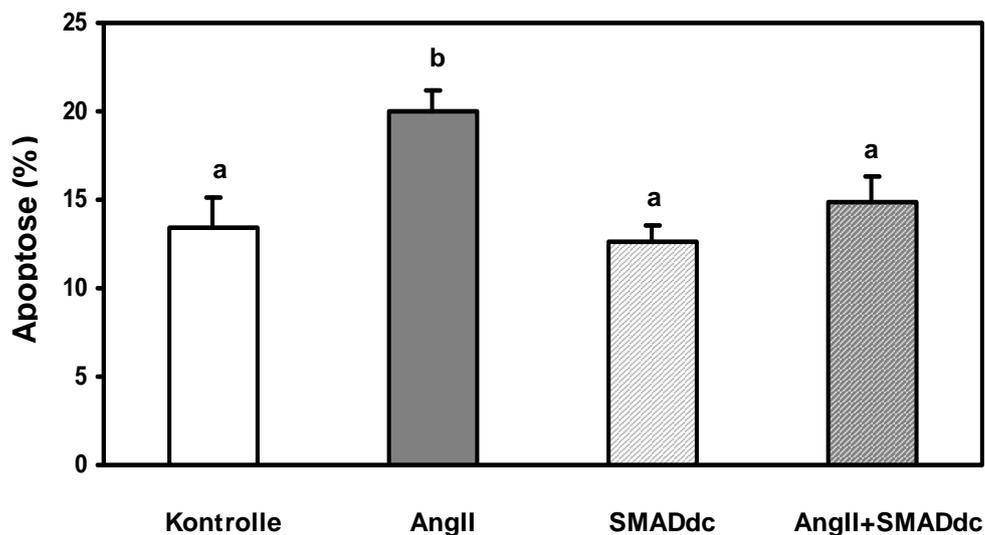


Abb. 4.5.1 Erhöhte Apoptose-Induktion nach AngII-Stimulation wird über SMAD vermittelt. Kardiomyozyten wurden mit SMADdc (500 nM) über 5 Stunden transformiert und anschließend mit AngII (100 nM) stimuliert. Die Quantifizierung der Apoptoserate wurde nach 24 Stunden mit der HOE 33258/PI-Doppelfärbung durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse in Prozent der Gesamtzahl in Form von Mittelwerten \pm SEM aus 4 unabhängigen Präparationen ($n=4$). Die Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

5 Diskussion

Eine Ursache der progredienten Herzinsuffizienz liegt in der Entwicklung von pathophysiologischen Veränderungen wie Herzhypertrophie und Apoptose. Diesen Veränderungen geht eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems voraus. Mit der vorliegenden Studie konnte jetzt ein entscheidender Signaltransduktionsweg identifiziert werden, der unter AngII-Stimulation über Freisetzung des Zytokins TGF β ₁ zu einer Apoptose-Induktion in adulten ventrikulären Kardiomyozyten führt.

Durch Studien, die eine AngII-induzierte Heraufregulation der TGF β ₁-Expression zeigen (Wenzel et al., 2001; Rosenkranz et al., 2004) und die Erkenntnis das AngII und TGF β ₁ Apoptose im gleichen Zelltyp vermittelt (Kajstura et al., 1997; Schneiders et al., 2005), stellte sich die Frage, ob AngII über das TGF β ₁-Signal Apoptose in Kardiomyozyten induzieren kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Untersuchungen in einem Zellkulturmodell von isolierten ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten durchgeführt, um die komplexen systemischen und hämodynamischen Interaktionen zu umgehen. Die isolierten Kardiomyozyten sind von definierten Kulturmedien und Wirkstoffkonzentrationen umgeben und mechanisch inaktiv. Daher kann die Wirkung der Agentien unabhängig von humoralen und mechanischen Einflüssen untersucht werden. Dies ist bei der Untersuchung zur Wirkung von AngII besonders wichtig, da AngII ein starker Vasokonstriktor ist und somit über eine Hypertonie auch indirekt auf das Herz wirkt.

Über den Signalweg der AngII-induzierten Apoptose war bisher wenig bekannt. Kajstura et al. (1997) identifizierten die Protein-Kinase-C als ein frühes Signalmolekül in der AngII-induzierten Apoptose. Die entscheidenden neuen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben nachfolgende, spätere Schritte in der Signalkaskade. Es konnte gezeigt werden, dass die AngII-induzierte TGF β ₁-Expression nach Aktivierung der p38 MAPK über die Transkriptionsfaktoren GATA und AP-1 vermittelt wird. TGF β ₁ wird anschließend aus den Kardiomyozyten freigesetzt, wirkt über eine autokrine Schleife und löst über Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD Apoptose in den Kardiomyozyten aus. Mit dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von TGF β ₁ durch AngII-Stimulation für die späte Apoptose-Induktion in Kardiomyozyten verantwortlich ist.

5.1 Bedeutung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA für die AngII-stimulierte Apoptose

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde in früheren Studien bereits als zentraler Faktor in der Entwicklung von Hypertrophie, TGF β ₁-Expression und Apoptose identifiziert. Unter α -adrenerger Stimulation vermittelt AP-1 hypertrophes Wachstum (Taimor et al., 2004; Omura et al., 2002). Er erhöht zudem die TGF β ₁-Expression über AngII-Stimulation (Wenzel et al., 2001) und induziert eine erhöhte Apoptose-Rate nach NO-Stimulation (Schneiders et al., 2005). Eine Erklärung, warum AP-1 zu diesen gegensätzlichen Effekten führt, kann eine Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren sein, welche mit AP-1 interagieren und dessen Promoter-Spezifität verändern könnten.

Ein möglicher Bindungspartner, der mit AP-1 interagieren und zu den unterschiedlichen Resultaten führen könnte, ist der Transkriptionsfaktor GATA. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ließ sich GATA unter dem Hypertrophiestimulus Phenylephrin, als auch unter AngII-Stimulation, welche eine gesteigerte TGF β ₁-Expression auslöst, nachweisen. Der Apoptose-Stimulus NO konnte die Aktivität von GATA nicht steigern.

Die hypertrophen Effekte von GATA im Herzen sind bereits durch zahlreiche Studien untersucht. So konnte Liang et al. (2001) GATA 4 und 6 als wichtige Regulatoren von hypertrophem Kardiomyozyten-Wachstum identifizieren. In einer Studie mit dehnungsinduzierter Hypertrophie, bei der kultivierte Kardiomyozyten einer mechanischen Dehnung ausgesetzt wurden, konnte das Familienmitglied GATA 4 als wichtiger Vermittler von Hypertrophie identifiziert werden (Pikkarainen et al., 2003). In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass durch Überexpression von GATA 4 und 6 hypertrophes Wachstum über kooperative Bindung mit AP-1 ausgelöst wird (Molkentin et al., 1998; Liang et al., 2001). Herzig et al. (1997) beobachteten eine funktionelle Wechselwirkung von AP-1 und GATA 4 als Reaktion auf Bluthochdruck. Auch in der vorliegenden Arbeit weist die Induktion von GATA unter Phenylephrin auf eine Beteiligung von GATA am hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten hin. Diese wurde aufgrund der bereits durchgeführten und publizierten Studien jedoch nicht weiter untersucht.

An der Apoptose-Induktion über AP-1 durch NO-Stimulation scheint GATA hingegen nicht beteiligt zu sein, da die Stimulation der Kardiomyozyten mit dem NO-Donor SNAP in dieser Untersuchung nicht zu einer gesteigerten GATA-Aktivität führte.

Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA unter AngII-Stimulation. Da, wie zuvor gesagt, im Zusammenhang mit einer Apoptose-Induktion keine erhöhte GATA-Aktivität festzustellen war, könnte GATA für die AngII-induzierte TGF β ₁-Expression notwendig sein. Weiterhin spricht für die Beteiligung von GATA an der AngII-induzierten TGF β ₁-Expression die frühe Aktivierung von GATA innerhalb eines Zeitraums von zwei Stunden. Denn für die Expression von TGF β ₁ wird nach AngII-Stimulation eine Zeitspanne von 24 Stunden benötigt (Wenzel et al., 2001).

Durch Einsatz von Decoy-Oligonukleotiden konnte in dieser Studie jetzt der Nachweis erbracht werden, dass GATA tatsächlich an der erhöhten TGF β ₁-Expression durch AngII-Stimulation funktionell beteiligt ist. Durch Abfangen der GATA-Aktivität mit GATA-decoy-Oligonukleotiden konnte die TGF β ₁-Expression verhindert werden. Auch die Freisetzung des Zytokins wurde durch Abfangen der GATA-Aktivität gehemmt und unterstreicht damit das Ergebnis

In der Literatur wurden bisher sechs verschiedene Isoformen der GATA-Familie beschrieben, von denen die Mitglieder 4/5/6 im Herzen exprimiert werden (Pikkarainen et al., 2004). Das charakteristische Merkmal der GATA-Faktoren sind die zwei benachbarten Zinkfinger-Domänen, wobei der C-terminale Zinkfinger notwendig und ausreichend für die DNA-Bindung ist. GATA 4 und 6 sind bedeutende Regulatoren der Genexpression in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen (Liang et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Familienmitglieder GATA 4 und 6 als bedeutsame Vermittler der TGF β ₁-Expression identifiziert und bestätigen damit die Wichtigkeit dieser beiden GATA-Isoformen für die Herzfunktion.

In einer Studie von Wenzel et al. (2001) wurden Teile des Signaltransduktionswegs zur gesteigerten TGF β ₁-Expression durch AngII identifiziert. In den Untersuchungen kommt es nach Bindung von AngII an den AT₁-Rezeptor über Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und der Proteinkinase C zu einer Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase (p38 MAPK). Die Aktivierung der p38 MAPK führte im weiteren Verlauf zu

einer Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors AP-1 und anschließend zu einer vermehrten Expression von TGF β ₁. Die Notwendigkeit der p38 MAPK für die AP-1-Aktivierung konnte in dieser Studie bestätigt werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von GATA ebenso von der vorangehenden Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAPK abhängig ist. Dies ließ sich durch Versuche beweisen, bei denen sich durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors der p38 MAPK weder die Bindungsaktivität von AP-1, noch die Bindungsaktivität von GATA, durch AngII stimulieren ließ.

Zusammengenommen kommt es nach AngII-Stimulation der Kardiomyozyten zunächst zu einer Aktivierung der p38 MAPK. Diese aktiviert die Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA. Die Aktivierung führt zu einer gesteigerten TGF β ₁-Expression und TGF β ₁-Freisetzung aus den Kardiomyozyten (s. Abb. 5.1).

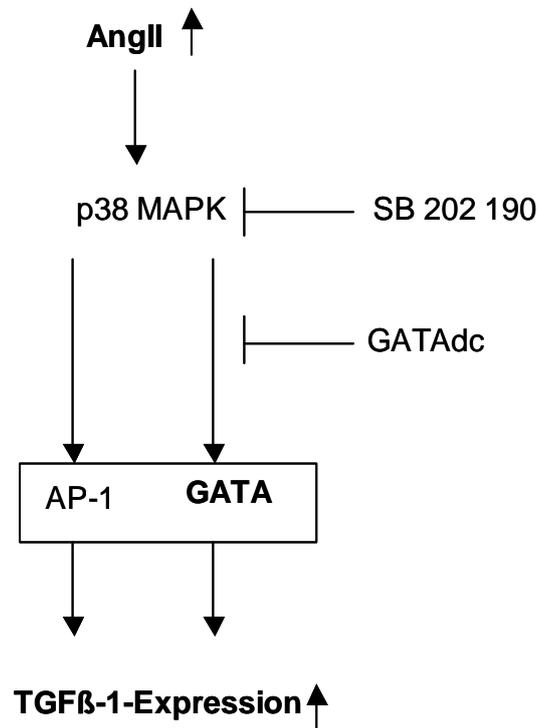


Abb. 5.1 Schematische Darstellung des Signalweges der AngII-induzierten TGFβ1-Expression in isolierten ventikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte. Der Transkriptionsfaktor GATA ist zusätzlich zu AP-1 an der durch AngII-stimulierten TGFβ1-Expression regulierend beteiligt. Die Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren ist von der Aktivierung der p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) abhängig. Dies konnte durch Einsatz eines spezifischen p38 MAPK-Inhibitors (SB 202 190) bewiesen werden. Die Notwendigkeit der GATA-Aktivierung für die AngII-induzierte erhöhte TGFβ1-Expression wurde durch Einsatz von GATA-decoy-Oligonukleotiden (GATAdc) bewiesen.

5.2. Bedeutung von TGF β ₁ für die Apoptose-Induktion unter AngII

In einer Studie von Schneiders et al. (2005) wurde TGF β ₁ als Auslöser von Apoptose über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD beschrieben. Man kann daher vermuten, dass TGF β ₁, welches nach AngII-Stimulation vermehrt in den Kardiomyozyten exprimiert und ausgeschieden wird, autokrin an den Zellen wirken kann und nachfolgend Apoptose über SMAD-Aktivierung auslöst. Hierfür spricht auch die zeitlich verzögerte Aktivierung von SMAD: im Gegensatz zur GATA-Aktivierung, die bereits zwei Stunden nach AngII Zugabe einsetzt, findet man eine erhöhte SMAD-Aktivität nach 24 Stunden. Diese Tatsache spricht dafür, dass die TGF β ₁-Freisetzung, die eine gewisse Zeit benötigt, für die SMAD-Aktivierung zu diesem späteren Zeitpunkt verantwortlich ist.

Der direkte Zusammenhang zwischen der AngII-induzierten TGF β ₁-Expression und der Aktivierung von SMAD konnte in dieser Arbeit durch Verwendung von spezifischen TGF β ₁-Antikörpern nachgewiesen werden; denn durch den Einsatz von TGF β ₁-Antikörpern wurde die SMAD-Aktivierung unter AngII verhindert. Das nach AngII-Stimulation in den Zellen exprimierte TGF β ₁ ist somit an der SMAD-Aktivierung beteiligt. Zusätzlich konnte die AngII-induzierte Apoptose durch Einsatz von SMAD-decoy-Oligonukleotiden verhindert werden. Mit Abfangen der SMAD-Aktivität in den Kardiomyozyten wurde damit bestätigt, dass die Aktivierung von SMAD unter AngII Apoptose in den Zellen auslöst. Da die Apoptose-Induktion unter TGF β ₁ zusätzlich zur SMAD-Aktivierung auch AP-1 benötigt (Schneiders et al., 2005), ist zu vermuten, dass dies unter AngII auch der Fall ist, da Apoptose auch hier durch TGF β ₁ ausgelöst wird. Der Zeitgang der AP-1-Aktivierung und die funktionelle Bedeutung von AP-1 für die Apoptose-Induktion unter AngII-Stimulation wurden jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte TGF β ₁-Freisetzung unter AngII zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD führt und dieser Faktor letztendlich für die Apoptose-Induktion unter AngII in Herzmuskelzellen verantwortlich ist.

5.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde ein Modell erarbeitet, das den komplexen Vorgang der AngII-induzierten Apoptose erklären kann (s. Abb. 5.2). Zunächst kommt es zur TGF β ₁-Freisetzung, die über Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA vermittelt wird. Das exprimierte und freigesetzte TGF β ₁ induziert Apoptose über SMAD und vermutlich über AP-1, wie in früheren Studien nachgewiesen. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass sich unter dem primären Stimulus AngII das Muster der mit AP-1 interagierenden Faktoren verändert. Somit verändert sich auch die Auswirkung der AP-1-Aktivierung zum einen in eine TGF β ₁-Induktion und zum anderen in ein pro-apoptotisches Signal.

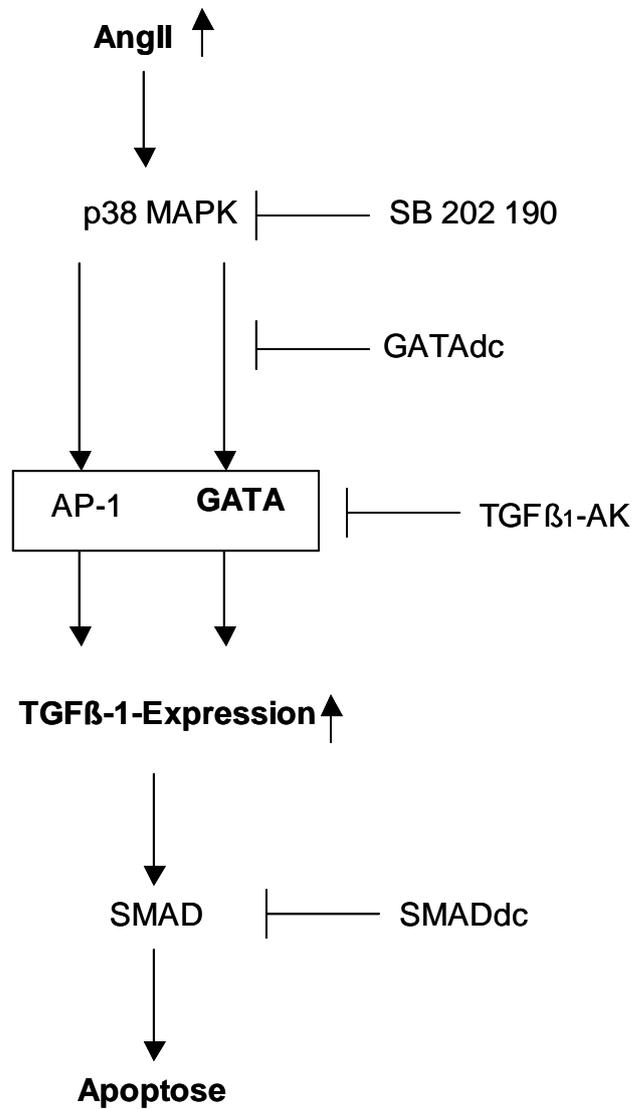


Abb. 5.2 Schematische Darstellung des Signalwegs der AngII-stimulierten Apoptose-Induktion über TGFβ1 in isolierten ventikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte. Der Transkriptionsfaktor GATA ist neben AP-1 an TGFβ1-Expression und Freisetzung regulierend beteiligt. Die Notwendigkeit der GATA-Aktivierung wurde durch Einsatz von GATA-decoy-Oligonukleotiden bewiesen. Die AngII-induzierte TGFβ-Expression und Freisetzung aktivierte autokrin den Transkriptionsfaktor SMAD, welcher das Signal in eine pro-apoptotische Richtung leiten konnte. Die Notwendigkeit der TGFβ1-Freisetzung wurde durch TGFβ1-Antikörper (TGFβ1-AK) und die der SMAD-Aktivierung durch SMAD-decoy-Oligonukleotide (SMADdc) nachgewiesen.

6. Zusammenfassung

Eine Ursache der progredienten Herzinsuffizienz liegt in der Entwicklung von pathophysiologischen Veränderungen wie Herzhypertrophie und Apoptose. Diesen Veränderungen geht eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems voraus. AngII verursacht dabei nicht nur Hypertrophie, sondern auch eine erhöhte TGF β ₁-Expression, die über Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD zu einer vermehrten Apoptose führen könnte. Der Signalweg der AngII-induzierten Apoptose wurde in dieser Studie genauer untersucht.

Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor GATA an der AngII-induzierten, über AP-1 verlaufenden TGF β ₁-Expression regulierend beteiligt ist. Dies ließ sich durch Transformation der Kardiomyozyten mit GATA-decoy-Oligonukleotiden nachweisen. Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern wurden die Isoformen GATA 4 und 6 als Vermittler der TGF β ₁-Expression identifiziert. Für die Aktivierung von GATA und AP1 unter AngII ist die p38 MAPK notwendig. Dies wurde durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors der p38 MAPK gezeigt.

Diese erhöhte TGF β ₁-Expression und -Freisetzung nach AngII-Stimulation konnte im weiteren Verlauf Apoptose in den Kardiomyozyten über den Transkriptionsfaktor SMAD auslösen. Die Aktivierung von SMAD unter AngII-Stimulation durch TGF β ₁ wurde über TGF β ₁-AK nachgewiesen, welche die SMAD-Aktivität inhibieren konnten. Dass SMAD nachfolgend Apoptose in den Zellen auslöst, zeigte sich durch Abfangen der SMAD-Aktivität mittels SMAD-decoy-Oligonukleotiden, mit denen sich die Apoptose signifikant reduzieren ließ.

Im Rahmen dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die AngII-induzierte TGF β ₁-Expression und -Freisetzung nach Aktivierung der p38 MAPK über die Transkriptionsfaktoren GATA und AP-1 vermittelt wird. TGF β ₁ wird anschließend aus den Kardiomyozyten freigesetzt, wirkt über eine autokrine Schleife und löst über SMAD Apoptose in den Kardiomyozyten aus (Abb. 6.1). Damit konnte ein bedeutsamer Signaltransduktionsweg identifiziert werden, der durch AngII-Stimulation zu Apoptose führt und damit neue Erkenntnisse über die Entstehung von Herzinsuffizienz beschreibt.

Frühe AngII und AP-1-Effekte
(2 Stunden)

Späte AngII und AP-1-Effekte
(24 Stunden)

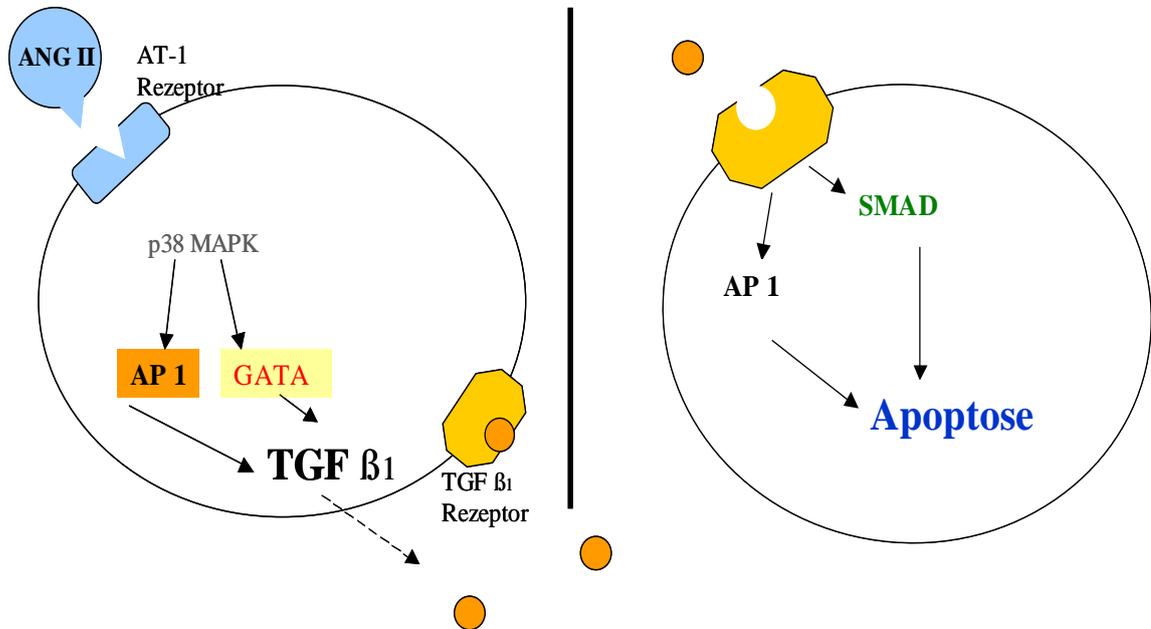


Abb 6.1. Schematische Darstellung der Signalkaskade der AngII-induzierten Apoptose-Induktion in adulten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Nach Bindung von AngII an den AT-1 Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung der p38 MAPK. Daran schließt sich die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und GATA an, die in einer Expression und Freisetzung von TGFβ1 mündet. Das freigesetzte TGFβ1 kann zu einem späteren Zeitpunkt auto- oder parakrin an den TGFβ1-Rezeptor binden und über AP-1 und SMAD Apoptose der Herzmuskelzelle auslösen.

7. Summary

One cause for the development of heart failure is the occurrence of pathophysiologic changes as hypertrophy or apoptosis in the heart. These changes are preceded by an activation of the renin-angiotensin-system. Angiotensin II (AngII) not only causes hypertrophy. It also enhances expression of TGF β 1. This growth factor can induce apoptosis via activation of the transcription factor SMAD. In this study the signalling pathway of AngII-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes was analysed in detail.

It is demonstrated that in addition to AP-1 the transcription factor GATA contributes to the AngII-induced enhancement of TGF β 1 expression. This was shown by use of GATA-decoy oligonucleotides. In western blots GATA isoforms 4 and 6 were identified under AngII stimulation. Using a specific inhibitor of p38 MAPK it could be shown that both, GATA and AP-1, are activated by p38 under AngII stimulation. Furthermore was be demonstrated that the enhanced expression and release of TGF β 1 is responsible for apoptosis induction in AngII stimulated cardiomyocytes. The released TGF β 1 activates the transcription factor SMAD. This process was blocked by addition of antibodies specific for TGF β 1. Using SMAD-decoy oligonucleotides it was shown that the activation of SMAD by TGF β 1 is necessary for induction of apoptosis under AngII stimulation.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that the AngII-induced enhancement of TGF β 1 expression and release is due to activation of GATA and AP-1 by p38 MAPK. The released TGF β 1 then acts via an autocrine loop and induces apoptosis in cardiomyocytes via SMAD signalling (Fig. 6.1). Thus a relevant signalling pathway of AngII-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes was identified and therefore, this study contributes to our understanding of mechanisms contributing to heart failure progression.

8 Literaturverzeichnis

Boluyt, M.O., O'Neill, L., Meredith, A.L., Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Crow, M.T. and Lakatta, E.G. (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

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem. 162, 156-159

Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P.(1997)

Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro.

Exp Cell Res.;231(2):363-71.

Diep QN, El Mabrouk M, Yue P, Schiffrin EL.(2002)

Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension.

Am J Physiol Heart Circ Physiol.; 282(5):H1635-41.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. (1991)

Mechanisms and functions of cell death.

Annu Rev Cell Biol.;7:663-98.

Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA. (1994)

Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression.

Hypertension. (5):587-92.

Hautala N, Tokola H, Luodonpaa M, Puhakka J, Romppanen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. (2001)

Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1.
Circulation.;103(5):730-5.

Hautala N, Tenhunen O, Szokodi I, Ruskoaho H. (2002)

Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways.
Pflugers Arch.;443(3):362-9. Epub 2001

Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkenstein JD, Cowley AW Jr, Izumo S, Markham BE. (1997)

Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload.
Proc Natl Acad Sci U S A.;94(14):7543-8.

Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. (1991)

Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure.
*Circ Res.*69(2):475-82.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. (1998)

Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis.
Endocr Res.; 24(3-4):307-14.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. (1997)

Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro.
J Mol Cell Cardiol.; 29(3):859-70.

Kaminska B, Pyrzynska B, Ciechomska I, Wisniewska M. (2000)

Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity.
Acta Neurobiol Exp (Wars);60(3):395-402.

Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. (1994)

Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun.

Mol Cell Biol. (1):700-12.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer. (4):239-57.

Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, Kawano H, Kimoto M, Zhan Y, Iwao H. (2001)

Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure.

Circulation.;103(1):148-54.

Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. (1996)

Effects of an AT1 receptor antagonist, an ACE inhibitor and a calcium channel antagonist on cardiac gene expressions in hypertensive rats.

Br J Pharmacol.;118(3):549-56.

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

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685

Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, Villarreal FJ. (1995)

Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts.

J Mol Cell Cardiol. (10):2347-57.

Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B. and Castelli, W.P. (1990)
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in
the Framingham Heart Study.

N Engl J Med. 322, 1561-1566

Li G, Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Ball WT, Christakis GT, Cusimano RJ,
Williams WG. (1998)

Elevated insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta 1 and their
receptors in patients with idiopathic hypertrophic obstructive cardiomyopathy. A
possible mechanism.

Circulation.;98(19 Suppl):II144-9; discussion II149-50.

Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT,
Williams WG. (1997)

Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in
patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy.

Circulation.;96(3):874-81.

Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. (2001)

The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in
vitro and in vivo.

J Biol Chem.;276(32):30245-53. Epub 2001.

Lee, Y.A. and Lindpaintner, K. (1993)

Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy.

Eur Heart J. 14(Suppl.J), 42-48

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR,
Olson EN. (1998)

A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.

Cell.;93(2):215-28.

Moriguchi, Y., Matsubara, H., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Oda, K. and Iwasaka, T. (1999)

Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

Circ Res. 84, 1073-1084

Narula A., Haider N., Virmani R. (1996)

Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.

N Engl J Med; 335: 1182-1189.

Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K, Nakamura Y, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J. (2002)

Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine.

Hypertension.;39(1):81-6.

Pfaffl MW (2001)

New mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR.

Nucleic Acids Res; 29.(9)00.

Pikkarainen S, Tokola H, Majalahti-Palviainen T, Kerkela R, Hautala N, Bhalla SS, Charron F, Nemer M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. (2003)

GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program.

J Biol Chem.;278(26):23807-16. Epub 2003.

Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. (2004)

GATA transcription factors in the developing and adult heart.

Cardiovasc Res.;63(2):196-207. Review.

Piper, H.M., Probst, I., Schwartz, P., Hutter, J.F. and Spieckermann, P.G. (1982)

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J Mol Cell Cardiol. 14, 397-412

Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, Engler S, Kossamehl P, Hocher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker HJ, Paul M. (2000)

Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat.

Hypertension;36(5):747-54.

Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. (2000)

Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II.

Lancet.;355(9215):1582-7.

Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, Diez J. (2000)

Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats.

Hypertension.;36(6):1065-71.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD, Bohm M. (2002)

Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1).

Am J Physiol Heart Circ Physiol.;283(3):H1253-62.

Rosenkranz S, Amann K, Caglayan E. (2003)

β-adrenoceptor blockade prevents cardiac hypertrophy and failure in TGFβ transgenic mice.

Eur J Heart 24, p. 665

Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993)

Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype.

Circ Res. 73, 413-423

Schluter, K-D., Zhou, X.J. and Piper, H.M. (1995)

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

Am J Physiol. 269, C1311-C1316

Schluter, K-D., Simm, A., Schafer, M., Taimor, G. and Piper H.M. (1999)

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

Am J Physiol. 276, H1655-H1663

Schluter, K-D., Frischkopf, K., Flesch, M., Rosenkranz, S., Taimor, G. and Piper, H.M. (2000)

Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.

Cardiovasc. Res. 45, 410-417

Schnee JM, Hsueh WA. (2000)

Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis.

Cardiovasc Res.;46(2):264-8. Review.

Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G. (2005)

SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes.

Cardiovasc Res. 1;67(1):87-96. Epub.

Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. (2002)

TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.

J Clin Invest.;109(6):787-96.

Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH. (1995)

Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II.

Circ Res.;76(3):489-97.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. (1990)
Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression
in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance,
contractility, and relaxation.

J Clin Invest.;86(6):1913-20.

Studer R, Reinecke H, Muller B, Holtz J, Just H, Drexler H. (1994)
Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human
heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction.

J Clin Invest.;94(1):301-10.

Taimor G, Schluter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM. (1999)
Autocrine regulation of TGF beta expression in adult cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol.;31(12):2127-36.

Taimor G, Rakow A, Piper HM. (2001)

Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult
cardiomyocytes.

FASEB J.;15(13):2518-20. Epub 2001.

Taimor G, Schluter K, Piper HM. (2001)

Hypertrophy-associated gene induction after beta-adrenergic stimulation in adult
cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol.;33(3):503-11.

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. (2000)

Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and
its impairment after simulated ischemia.

Cardiovasc Res.;45(3):588-94

Taimor G, Schluter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM. (1999)
Autocrine regulation of TGF beta expression in adult cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol.;31(12):2127-36

Villarreal, F.K. and Dillmann, W.H. (1992)

Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen.

Am J Physiol. 262, H1861-H1866

Villarreal FJ, MacKenna DA, Omens JH, Dillmann WH. (1995)

Myocardial remodeling in hypertensive Ren-2 transgenic rats.

Hypertension.;25(1):98-104.

Wada, H., Zile, M.R., Ivester, C.T., Cooper, G. 4th and McDermott, P.J. (1996)

Comparative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiomyocytes in primary culture.

Am J Physiol. 271, H29-H37

Weil J., Schunkert H. (2006)

Pathophysiology of chronic heart failure

Clin Res Cardiol.; 95:1-17

Wenzel S, Muller C, Piper HM, Schluter KD. (2005)

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

Eur J Heart Fail.;7(4):453-60.

Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD. (2001)

Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes.

FASEB J.;15(12):2291-3. Epub 2001 Aug 17.

Wyllie AH. (1997)

Apoptosis and carcinogenesis.

Eur J Cell Biol.;73(3):189-97.

Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, Lodish HF. (2000)
Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -
dependent apoptosis.
J Biol Chem.;275(46):36295-302.

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

9 Anhang

9.1 Publikation

Schröder D, Heger J, Piper HM, Euler G (2006)

Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF- β 1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat.

J Mol Med. 84(11):975-83.

9.2 Poster

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie
Kardiologen Kongress in Mannheim 2004

9.3 Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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.

Dunja Schröder

Linden, Juni 2008

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gerhild Euler für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute und intensive Betreuung, die ich mir nicht besser hätte wünschen können.

Meinen Kollegen, den technischen Assistenten, den Mitdoktoranden und Postdocs im Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die viele Hilfe bei allen Fragen.

Herrn Prof. Dr. J. Roth danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für die Korrektur meiner Doktorarbeit und den unerschütterlichen Optimismus, der mich oft aufgebaut hat, danke ich Andy Schröder.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, die jederzeit an meiner Seite stand, besonders meiner Mutter, für die liebevolle Unterstützung auf dem Weg durch das Studium. Meiner Großmutter, die schon früh davon überzeugt war, dass ich einmal Tierärztin werde. Und meiner Schwester Sylvia für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Henning Kloke danke ich herzlich dafür, mich immer wieder neu ermutigt und vielseitig unterstützt zu haben. Danke, dass Ihr für mich da seid.

Zuletzt danke ich meinen Tieren, ohne die ich diesen Weg nicht gegangen wäre und die mich selbst in schwierigen Zeiten immer wieder aufmuntern können.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5314-1

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



9 783835 119531 4 7