

Der TGF- β_1 /PI3K γ -Signalweg in Kardiomyozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lisa Schulz

aus Gardelegen

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachter: PD Dr. Jacqueline Heger

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andre Menke

Tag der Disputation: 25.09.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Begriffserklärung	1
1.1.2	Progredienter Verlauf der Herzinsuffizienz	2
1.2	TGF- β_1 und sein Einfluss auf Kardiomyozyten	4
1.2.1	Wirkung von TGF- β_1 im kardialen Remodeling.....	4
1.2.1.1	Mechanismus der Apoptose	5
1.2.2	Wirkung von TGF- β_1 auf die Kontraktion von Kardiomyozyten	8
1.2.2.1	Kontraktionsablauf	8
1.2.2.2	Modulation durch das adrenerge System	8
1.2.2.3	Der Einfluss von TGF- β_1 auf die kontraktile Funktion	10
1.3	TGF- β_1 -Signalwege.....	11
1.3.1	SMAD-Signalweg	11
1.3.2	non-SMAD-Signalwege	13
1.3.2.1	Der Erk-MAPK-Signalweg	13
1.3.2.2	Die Aktivierung von JNK und p38-MAPK.....	13
1.3.2.3	Der PI3K/AKT-Signalweg	14
1.4	Phosphinositid-3-Kinasen (PI3K)	15
1.4.1	Phosphoinositide	15
1.4.2	Einteilung der PI3K-Isoformen	16
1.4.3	Funktionen der PI3K-Isoformen	17
1.4.4	PI3K-Inhibitoren	18
1.4.5	Signalwege von PI3K.....	19
1.4.5.1	Die Aktivierung von AKT durch PI3K	19
1.4.5.2	Weitere Zusammenhänge zwischen TGF- β_1 und PI3K.....	21
1.4.6	PI3K und dessen Einfluss auf Kardiomyozyten.....	22
1.4.6.1	PI3K γ in Kardiomyozyten.....	23
1.5	Zielstellung.....	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Versuchstiere.....	26
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien, Enzyme.....	26

2.1.3	Antikörper	29
2.1.4	Puffer und Lösungen	29
2.1.4.1	DNA-Elektrophorese.....	29
2.1.4.2	Kardiomyozytenpräparation.....	30
2.1.4.3	EMSA.....	32
2.1.4.4	Proteinnachweis	33
2.1.4.5	Weitere Puffer und Lösungen.....	36
2.1.5	Geräte und Laborbedarf	36
2.1.5.1	Kardiomyozytenpräparation.....	36
2.1.5.2	EMSA.....	37
2.1.5.3	Proteinnachweis	37
2.1.5.4	sonstige Geräte	38
2.1.5.5	Verbrauchsmaterialien	38
2.1.5.6	Software	39
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Genotypisierung der Maus mittels Ohrstanzenbiopsie.....	39
2.2.1.1	DNA-Extraktion	39
2.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	39
2.2.1.3	Durchführung der PCR.....	40
2.2.1.4	DNA-Gelelektrophorese.....	41
2.2.2	Real-time Reverse-Transkriptase-PCR bei der Maus	42
2.2.2.1	Isolierung der RNA	42
2.2.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	42
2.2.2.3	DNase-Behandlung und Erstellen der cDNA	43
2.2.2.4	Durchführung der Real-Time RT-PCR	43
2.2.2.5	Prinzip der Real-Time RT-PCR	44
2.2.3	Isolierung adulter Kardiomyozyten.....	45
2.2.3.1	Maus	45
2.2.3.2	Ratte	47
2.2.4	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	49
2.2.4.1	Einführung in die Methode	49
2.2.4.2	Kernextraktion.....	49
2.2.4.3	Proteinmengenbestimmung nach Lowry.....	50
2.2.4.4	Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide	51

2.2.4.5	Probenvorbereitung	52
2.2.4.6	Herstellung des nativen Gels	52
2.2.4.7	Durchführung und Auswertung des Assays	53
2.2.5	Proteinnachweis	54
2.2.5.1	Lyse der Zellen	54
2.2.5.2	Gelelektrophorese	54
2.2.5.3	Western Blot	55
2.2.5.4	Immunfärbung	56
2.2.6	Messung der Myokardzellkontraktion	57
2.2.6.1	Stimulation der Kardiomyozyten im elektrischen Feld	57
2.2.6.2	Messung der Kontraktionsparameter	57
2.2.7	Das Hoe-Assay als Apoptosenachweis	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Der Einfluss von PI3K γ auf die Kontraktion adulter Kardiomyozyten	61
3.1.1	PI3K γ vermittelt die kontraktionshemmende Wirkung von TGF- β_1	61
3.2	Der Einfluss von PI3K γ auf die TGF- β_1 -induzierte Apoptose	65
3.2.1	Die proapoptotische Wirkung von TGF- β_1 wird durch PI3K γ vermittelt	65
3.2.2	Einfluss von TGF- β_1 auf die Apoptose von PI3K γ -KO-Kardiomyozyten	67
3.3	Die Rolle von PI3K γ in der TGF- β_1 -Signalkaskade	69
3.3.1	PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD2-Aktivierung	69
3.3.2	Die PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD-Bindungsaktivität	72
3.3.3	PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD7-Expression	75
4	Diskussion	77
4.1	Der Einfluss von TGF- β_1 auf die kontraktile Funktion des Herzens	77
4.2	Der Einfluss von TGF- β_1 auf die Kontraktion ist abhängig von PI3K γ	79
4.3	Die Bedeutung der PI3K γ für die Kontraktion	81
4.4	PI3K γ ist notwendig für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose	84
4.5	Der PI3K γ -Signalweg existiert unabhängig von dem SMAD-Signalweg	89
4.5.1	PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD-Kaskade	90
4.5.2	PI3K γ hat keinen Effekt auf die SMAD7-Expression	92
4.6	Fazit und Ausblick	93
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	98

7	Abbildungsverzeichnis	99
8	Literaturverzeichnis	100
9	Publikationsverzeichnis	122
10	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....	123
11	Danksagung.....	124

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
ABD	adapter-bindingdomain
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ALK5	activin receptor-like kinase 5
AngII	Angiotensin 2
AP-1	Activator protein-1
APAF-1	Apoptotic Protease-activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	cyclic Adenosine monophosphat
cDNA	complementary Desoxyribonukleinacid
CLL	chronisch lymphatischer Leukämie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobalt(II)-chlorid
Con _{max}	maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
Con-Vel	Kontraktionsgeschwindigkeit
Co-SMADs	common SMADs
dest	destilliert
dL/L	Zellverkürzung
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EMT	epithelial-mesenchymal-transition
Erk	extracellular-signal regulated kinases
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FasL	Fas-Liganden
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FOXO-3	Forkhead-Box-Protein O3
g	Gramm
Gadd45β	growth arrest and DNA damage-inducible 45 beta
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
hnRNPE1	heterogeneous core ribonucleoprotein E1
HRP	horse radish peroxidase

hyps34	human-vacuolar-protein-sorting 34
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
I-SMADs	inhibitorische SMADs
JNK	c-Jun amino terminale Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	knockout
Ktr	Kontrolle
l	Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MH1/ MH2	major histocompatibility complex1/2
min	Minute
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
mTORC	mammalian target of rapamycin complex
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCX1	natrium-calcium exchanger 1
NF-κB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NHL	non-Hodgkin Lymphomen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p110	katalytischen Untereinheit der PI3K
p38-MAPK	p38-mitogenactivated protein kinase kinase
PAF	platelet-activating-factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase-chain-reaktion
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDK1	3-phosphoinositide-dependent kinase-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PH	pleckstrin homology
PHLPP	pleckstrin homology domaine leucine-rich repeat protein phosphatase
PI	phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP	Phosphatidylinositol-3-phosphonat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphonat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PLB	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin

P-SMAD	phosphoryliertes SMAD
PTEN	phosphatase and tensin homologue
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAF	rapidly growing fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RBD	Ras-Bindungsdomäne
Rel _{max}	maximale Relaxationsgeschwindigkeit
Rel-Vel	Relaxationsgeschwindigkeit
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
R-SMAD	rezeptoraktiven SMAD-Proteine
RT	Real-Time
s	Sekunde
S6K	S6 kinase
SBE	smad-binding-elements
SERCA2A	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2A
SH2	cellular und sarcoma-homologie 2
SHIP	SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase
SMAD	small mothers against decapentaglegic
SR	sarkoplasmatischen Retikulum
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TAK1	TGF- β -aktiviert kinase 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TGF- β ₁	Transforming growth factor- β 1
TKR	Tyrosinkinase-Rezeptoren
TNFR-1	Tumor-Nekrose-Faktor- α 1-Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF4	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierten Faktor 4
TRAF6	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierten Faktors 6
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TSC	Tuberous-Sclerosis-Complex
USP4	ubiquitin-specific-peptidase 4
UCP	Uncoupling Protein
UV	Ultraviolett
V	Volt
vol	volume
vs	versus
wt	weight
WT	Wildtyp
Δ L	Längenänderung

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Herz-/Kreislaufkrankungen gelten in Deutschland als die häufigste Todesursache. Laut des Statistischen Bundesamtes waren im Jahr 2019 35,3% der Todesfälle in Deutschland darauf zurückzuführen (Statistisches Bundesamt 2020). Die Herzinsuffizienz fasst alle Zustände zusammen, bei denen die Leistung des Herzens in Ruhe und unter Belastung nicht ausreichend ist, um zu gewährleisten, dass alle Organe ohne Einschränkungen arbeiten können (Opie et al. 2006). Auf der Grundlage einer kardialen Funktionsstörung sind Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention typisch. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist altersabhängig. So zeigt sich bei den 65- bis 69-jährigen eine Jahresprävalenz von 6,9%. Bei den 80- bis 84-jährigen sind 24,3% betroffen (Kaduszkiewicz et al. 2014). Aufgrund des demografischen Wandels, der steigenden Lebenserwartung sowie der verbesserten medizinischen Versorgung nach einem Herzinfarkt oder bei Herzklappenerkrankungen, ist eine steigende Inzidenz der Patienten mit Herzinsuffizienz zu erwarten.

1.1.1 Begriffserklärung

Die Leistungsfähigkeit des Herzens kann aufgrund unterschiedlicher Faktoren eingeschränkt sein. Häufig lässt sich der pathogenetische Ablauf erkennen, an dessen Beginn die arterielle Hypertonie steht. Diese führt über die koronare Herzerkrankung zum Myokardinfarkt, welcher die Herzinsuffizienz zur Folge hat. Weitere ätiologische Ursachen sind Herzrhythmusstörungen, Vitien und Kardiomyopathien. Klinisch lässt sich die Herzinsuffizienz nach der Klassifikation der New-York-Heart-Association in verschiedene Stadien einteilen, die in Tabelle 1 dargestellt sind (Programm für nationale Versorgungsleitlinien 2021).

Man unterscheidet zwischen Links- oder Rechtsherzinsuffizienzen. Die Linksherzinsuffizienz führt durch ein Rückwärtsversagen zu einem erhöhten venösen Druck im pulmonalen Kreislauf. Dyspnoe, Tachypnoe und Lungenödeme können die Folge sein. Man spricht von einem Vorwärtsversagen, wenn die Leistungsminderung des

linken Ventrikels eine Minderperfusion des systemischen Kreislaufs zur Folge hat. Das Herzzeitvolumen ist reduziert und es liegt eine Hypotonie vor. Rechtsherzinsuffizienzen imponieren durch periphere Ödeme. Im klinischen Verlauf liegt oft eine globale Herzinsuffizienz vor, die Symptome beider Typen aufweist.

Tabelle 1: NYHA-Klassifikation

NYHA-Stadium	Subjektive Beschwerden	Herzminutenvolumen
I	keine Beschwerden	bei Belastung normal
II	Beschwerden bei starker Belastung	bei leichter Belastung ausreichend
III	Beschwerden bei leichter Belastung	bei Belastung reduziert
IV	Beschwerden in Ruhe	in Ruhe reduziert

In Anlehnung an: Programm für nationale Versorgungsleitlinien

1.1.2 Progredienter Verlauf der Herzinsuffizienz

Eine Nachfrage der peripheren Organe nach einem erhöhten Herzzeitvolumen kann unter physiologischen Bedingungen zu einer Zunahme der Zellgröße der Kardiomyozyten führen, wie es bei Ausdauersportlern der Fall ist. Davon abzugrenzen ist eine erhöhte Herzarbeit als Ausgleich eines verringerten Herzzeitvolumens, verursacht durch eine Abnahme des intakten kardialen Gewebes. Um der Abnahme des Herzzeitvolumens entgegenzuwirken, reagiert der Organismus mit kardialen und peripheren Adaptationsmechanismen. Der Körper ist durch diese Mechanismen kurzzeitig in der Lage, die Insuffizienz zu kompensieren. Dauert der pathologische Zustand jedoch an, wie es bei einer chronischen Herzinsuffizienz der Fall ist, folgt eine ventrikuläre Dilatation. Langfristig reagiert der Körper mit kardialem Remodeling, welches Fibrose, Hypertrophie und Zunahme der Apoptose einschließt. Schlussendlich führt die Gegenregulation im Zuge des Remodelings auf den unterschiedlichen Ebenen zur Progression der Erkrankung (siehe Abbildung 1) (Cohn et al. 2000).

Zu Beginn der Herzinsuffizienz und der damit verbundenen Minderperfusion der peripheren Organe wird der Sympathikustonus erhöht. Die daraus folgende Katecholaminausschüttung bewirkt eine Erhöhung der Herzfrequenz. Im Rahmen der Kompensation wird des Weiteren das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert

(RAAS) (Cohn et al. 1981). Aldosteron bewirkt eine vermehrte Natriumresorption, welche mit einer Wasserretention und Volumenzunahme einhergeht. Der Organismus reagiert damit auf den peripheren Blutdruckabfall. Die Problematik ergibt sich aus der Tatsache, dass der Blutdruckabfall nicht auf eine Volumenabnahme zurückzuführen ist, sondern auf die verringerte Leistungsfähigkeit des Herzens. Die Kompensation führt zu einer gesteigerten Vorlast. Durch die Angiotensin II (AngII)-Produktion resultiert außerdem eine Vasokonstriktion und damit eine Erhöhung des peripheren Widerstandes. Man spricht von einer gesteigerten Nachlast. Die Regulationsmechanismen führen daher zu einer erhöhten Herzarbeit. Die Wirkung des AngII wird auf zellulärer Ebene u.a. durch TGF- β_1 vermittelt. (Swynghedauw 1999; Wenzel et al. 2001)

AngII gilt als G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR)-Agonist. Es sind verschiedene Rezeptoren bekannt, die die Signaltransduktion von AngII vermitteln. Die Mehrzahl der bisherigen Erkenntnisse beschränkt sich auf den AngII-Typ-1 und -Typ-2-Rezeptor (AT1R, AT2R). Der AT1R wird in verschiedenen Geweben einschließlich glatter Gefäßmuskulatur und im Herzen exprimiert (Gasparo et al. 2000). Eine AngII-induzierte Aktivierung des Rezeptors vermittelt eine gesteigerte Aktivität intrazellulärer Proteinkinasen (Forrester et al. 2018). Unter anderem findet eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und AKT statt. Dieser Signalweg führt zu Hypertrophie und trägt damit entscheidend zur Herzinsuffizienz bei (Oudit et al. 2004, S. 457; Naga Prasad et al. 2000). Schröder et. al zeigten, dass aus der AngII-Produktion über Aktivierungskaskaden, die die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase (p38-MAPK), GATA und AP-1 einschließen, eine gesteigerte Expression von TGF- β_1 resultiert (Schröder et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass SMAD-Proteine, als Signalmoleküle von TGF- β_1 , in ventrikulären Kardiomyozyten die Apoptose auslösen (Schneiders et al. 2005).

Diese Prozesse sind damit entscheidend am kardialen Remodeling beteiligt und führen durch Apoptose, Fibrose, Ventrikeldilatation und Hypertrophie langfristig zu myokardialer Dysfunktion. Versagen die physiologischen Kompensationsmechanismen, spricht man von einer kardialen Dekompensation. Dies kann sich in einem Lungenödem mit respiratorischer Insuffizienz manifestieren. Dabei handelt es sich um einen lebensbedrohlichen Zustand.

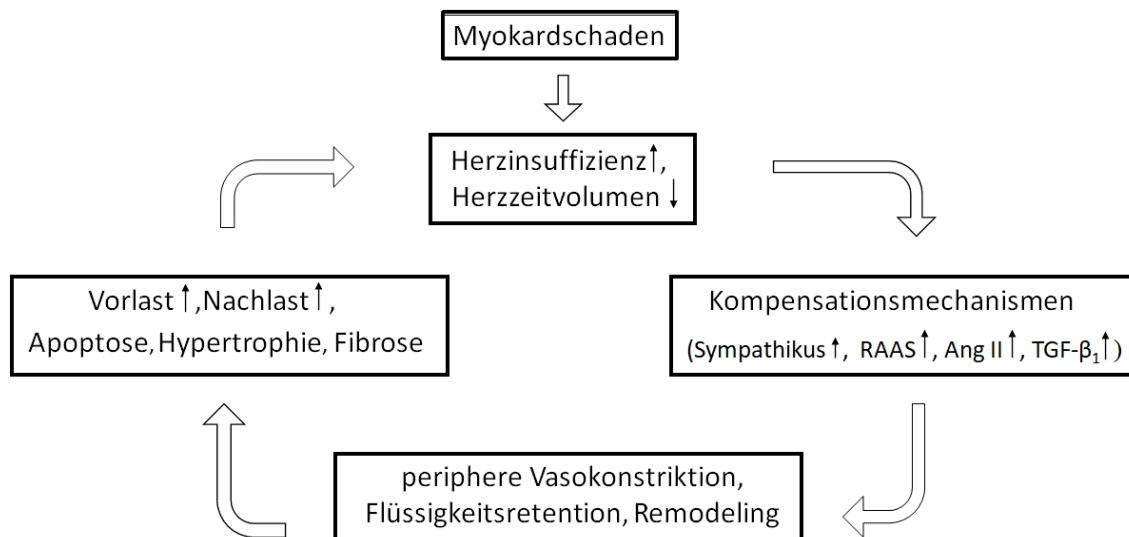


Abbildung 1: Circulus vitiosus bei chronischer Herzinsuffizienz (verändert nach Böhmer 2014)

1.2 TGF- β_1 und sein Einfluss auf Kardiomyozyten

Der Transforming Growth Faktor- β (TGF- β) ist ein Zytokin und unterteilt sich in die Subtypen TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 . Gemeinsam mit den Aktivinen, den Bone Morphogenic Proteins (BMPs) und anderen Zytokinen bilden sie die TGF- β -Superfamilie. Es wird als Vorstufe sezerniert und ist erst nach der Aktivierung biologisch aktiv. TGF- β ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt und reguliert u.a. die embryonale Zelldifferenzierung, die Proliferation sowie das Zellwachstum. Das Zytokin kann von Kardiomyozyten, Endothelzellen, Makrophagen und von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Diese Zellen stellen ebenso den Wirkungsort von TGF- β dar (Dennler et al. 2002). Es konnte festgestellt werden, dass TGF- β_1 in ventrikulären Kardiomyozyten die Apoptose auslöst und im Zusammenspiel mit AngII am kardialen Remodeling beteiligt ist (Rosenkranz 2004; Schneider; Schneiders et al. 2005).

1.2.1 Wirkung von TGF- β_1 im kardialen Remodeling

Nach Aktivierung des RAAS kommt es zur Bildung von AngII. Dies führt über die Aktivierung der p38-MAPK und der Transkriptionsfaktoren GATA und AP-1 zur Bildung von TGF- β_1 (Schröder et al. 2006). Mehrere Untersuchungen machten deutlich, dass TGF- β_1 durch pathologische Zustände aktiviert wird, aber ebenso zu dessen

Progression beiträgt. Die Stellung von TGF- β_1 im Fortschreiten der Herzinsuffizienz stellten u.a. Schultz et al. dar (Schultz et al. 2002). Sie zeigten, dass bei TGF- β_1 -KO-Mäusen keine hypertrophen Veränderungen nach AngII-Stimulation stattfinden. Des Weiteren konnte durch Boluyt et al. gezeigt werden, dass im hypertrophen Myokard beim Übergang einer stabilen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz eine gesteigerte TGF- β_1 -Expression erkennbar ist (Boluyt et al. 1994).

Auch nach einem Myokardinfarkten lässt sich eine gesteigerte Expression von TGF- β_1 feststellen (Deten et al. 2001). Ikeuchi et al. machten zwar in ihren Untersuchungen deutlich, dass eine Hemmung der TGF- β_1 -Signalkaskade unmittelbar nach dem Infarkt ereignis die Mortalität erhöht, die Inhibition zu einem späteren Zeitpunkt schützt jedoch vor kontraktile Dysfunktion, Myokardhypertrophie und interstitielle Fibrose des Myokards, welches nicht von dem Infarkt betroffen ist (Ikeuchi et al. 2004). Weitere Darstellungen konnten beweisen, dass eine Inhibition des TGF- β_1 -Rezeptors I zu einem verminderten Remodeling nach Myokardinfarkt führt (Tan et al. 2010). Neben einer erhöhten TGF- β_1 -Aktivität konnte auch gezeigt werden, dass es bei Herzinfarkten zu einer verstärkten Expression der SMAD-Proteine kommt (Hao et al. 2000). Abgesehen von einer Fibrosierung mündet dieser Signalweg in der Apoptose der Herzmuskelzellen. Daher ist eine erhöhte TGF- β_1 - und SMAD-Expression ein Prädiktor für die Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz, die in einem Herzversagen endet.

1.2.1.1 Mechanismus der Apoptose

Es sind verschiedene Formen des Zelltods bekannt. Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod. Er wird im Gegensatz zur Nekrose unter Energiebedarf von den Zellen selbst eingeleitet, kontrolliert und löst kein Entzündungsgeschehen aus (Kerr et al. 1972). Weitere Formen des Zelltods stellen die Pyroptose und die Nekroptose dar. Während die Pyroptose eine pro-inflammatorische Form der Apoptose ist, handelt es sich bei Nekroptose um eine kontrolliert ablaufende Nekrose. Sie mündet ebenfalls in der Destruktion der Zellmembran und löst nachfolgend eine Entzündungsreaktion aus (Holler et al. 2000; Wang et al. 2014; D'Souza und Heitman 2001). Auf diesen Wegen werden beschädigte oder infizierte Zellen aus dem Organismus entfernt. Pathologische Veränderungen im Ablauf dieser Prozesse können zu malignen Entartungen führen.

Auslöser für die Apoptose stellen sowohl interne Stimuli wie Hypoxie, als auch externe Auslöser wie Strahlung dar. Man unterscheidet einen extrinsischen (siehe Abbildung 2) und einen intrinsischen (siehe Abbildung 3) Apoptoseweg. Beide Signalwege münden in einer gemeinsamen Effektorphase, in der die Caspasen, eine Gruppe von Cysteinproteasen, eine entscheidende Rolle spielen (Srivastava et al. 1998).

Die Aktivierung des extrinsisch ausgelösten Apoptoseweges beginnt mit der Bindung eines Liganden an die Rezeptoren, welche in der Zellmembran lokalisiert sind. In Kardiomyozyten befindet sich der Tumor-Nekrose-Faktor- α_1 -Rezeptor (TNFR-1). An diesen bindet das extrazelluläre Protein TNF α und aktiviert über ein Adapterprotein die Caspase 8. Es ist ebenfalls nachgewiesen, dass die Caspase 8 in Kardiomyozyten über die Bindung des Fas-Liganden (FasL) an den Fas-Rezeptor und der damit einhergehenden Aktivierung des Adapterproteins FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) aktiviert wird (Swanton et al. 1999). Über die Caspasenkaskade wird die Effektorphase der Apoptose eingeleitet.

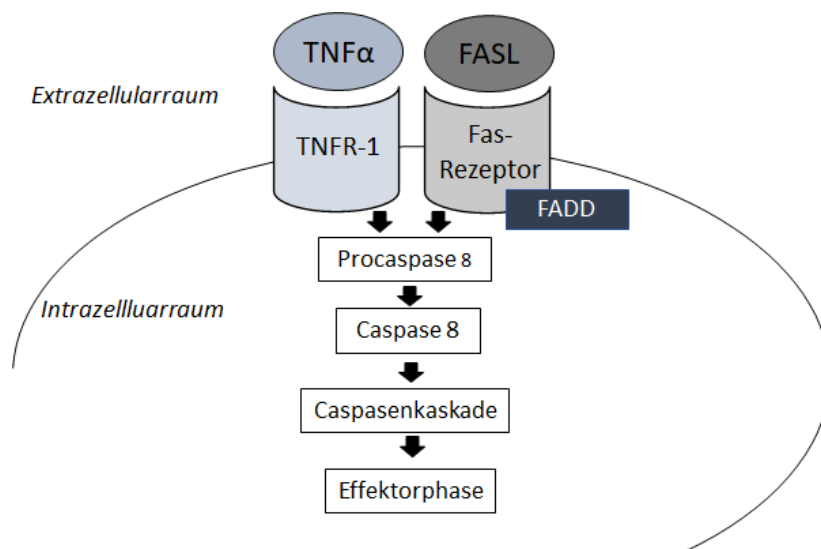


Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrinsischen Apoptoseweges (verändert nach Partsch 2010)

Der intrinsische Weg der Apoptose wird auch als mitochondrialer Weg bezeichnet. Er tritt ein, wenn die Mitochondrien, speziell ihre Membran, beispielsweise durch Strahlung oder Toxine geschädigt werden. Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität und zur Öffnung der Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore. Es wird das an der Atmungskette beteiligte Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt, welches dort einen Komplex mit dem Protein Procaspase 9 und Cofaktor APAF-1 bildet. Hierbei handelt es

sich um ein Apoptosom (Bishopric et al. 2001). Dies wiederum führt zur Aktivierung der Effektor-Caspasen. Damit wird die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges eingeleitet.

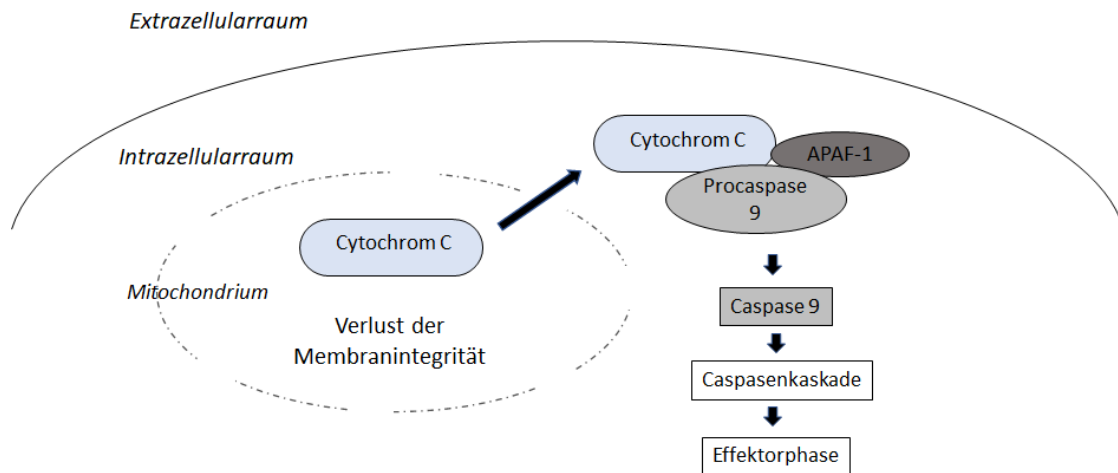


Abbildung 3: Schema des intrinsischen Apoptoseweges (verändert nach Partsch 2010)

Caspasen liegen in der Zelle als Proenzyme vor. Durch eine enzymatische Spaltung kommt es zur Aktivierung. Die aktivierten Caspasen selbst fungieren als Enzyme und regen die Bildung weiterer Caspasen an. So kommt es zu einer kaskadenförmigen Verstärkung des Apoptosesignals innerhalb der Zelle und damit zur Einleitung der Effektorphase (Cohen 1997). Innerhalb dieser behält die Zelle zunächst ihre Integrität und aktiviert gleichzeitig das körpereigene Immunsystem. Ein entscheidender Schritt hierbei ist die Translokation des Zellmembranproteins Phosphatidylserin (PS). Dies befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran. Durch die Translokation auf die Membranaußenseite wird die Zelle nun als körperfremd wahrgenommen und kann durch Makrophagen phagozytiert werden.

Im Zytosol kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zelle, die die Phagozytose vorbereiten. Dies beinhaltet eine Chromatin-Kondensation sowie die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen, so dass DNA-Abschnitte ähnlicher Größe entstehen (Elmore 2007). Des Weiteren findet eine Schrumpfung des Zytoskelettes, ausgelöst durch einen Anstieg an Kaliumionen im intrazellulären Raum, statt (Kerr et al. 1972). Die Zelle kann somit besser phagozytiert werden.

1.2.2 Wirkung von TGF- β_1 auf die Kontraktion von Kardiomyozyten

1.2.2.1 Kontraktionsablauf

Am Beginn des Kontraktionsprozesses steht die Erregung der Herzmuskelzellen. Diese führt zur Erhöhung des intrazellulären Calciums, welches eine hohe Affinität zu Troponin und Tropomyosin aufweist. Diese Moleküle blockieren in der unstimulierten Zelle die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin und verhindern so eine Interaktion, die zur Kontraktion führt. Steigt die Konzentration von Calcium, findet eine Komplexbildung aus Calcium und Troponin bzw. Tropomyosin statt und die Bindungsstellen werden freigegeben. Durch ein Abknicken des Myosinköpfchens ist es den Aktin- und Myosinfilamenten möglich, ineinander zu gleiten. Das Lösen der beiden Filamente ist ein energieabhängiger Prozess. Das Myosinköpfchen beinhaltet eine ATPase-Aktivität, die Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) dephosphoryliert und damit die benötigte Energie bereitstellt. Ist die intrazelluläre Calciumkonzentration nach dem Lösungsvorgang hoch genug, kann an dieser Stelle eine erneute Bindung zwischen Aktin und Myosin stattfinden und die Kontraktion verstärkt werden. Ein Konzentrationsabfall bedeutet dementsprechend, dass sich die Komplexe aus den Calcium und Troponin bzw. Tropomyosin auflösen, und die beiden Moleküle erneut die beschriebenen Bindungsstellen blockieren. In diesem Fall tritt die Relaxation ein.

1.2.2.2 Modulation durch das adrenerge System

Das vegetative Nervensystem beeinflusst die Kontraktionskraft des Herzens. Als Rezeptoren, die die Wirkung des vegetativen Nervensystems im Herzen vermitteln gelten Adrenorezeptoren. Man unterscheidet zwischen α - und β -Adrenorezeptoren und unterteilt diese wiederum in die Subtypen α_1 und α_2 sowie β_1 , β_2 und β_3 . Alle Adrenorezeptoren wirken über den GPCR-Signalweg.

G-Proteine liegen als heterotrimerer Komplex vor und bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand liegt ein Komplex vor, der dadurch gekennzeichnet ist, dass GDP an die $G\alpha$ Untereinheit gebunden ist. Kommt es zur Aktivierung des GPCR bewirkt die intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha$ einen Austausch von GDP zu GTP. Anschließend dissoziiert der Komplex in die $G\alpha$ -Untereinheit und den heterodimeren Komplex $G\beta\gamma$ (Gudermann et al. 1995). $G\beta\gamma$ kann Kinasen wie PI3K γ aktivieren (Stoyanov et al. 1995; Kurosu et al. 1997). Von $G\alpha$ sind verschiedene Subtypen bekannt.

Die $G\alpha_s$ Untereinheit wirkt stimulierend und die $G\alpha_i$ Untereinheit inhibierend. Der im Myokard exprimierte β_1 -Adrenorezeptor ist $G\alpha_s$ gekoppelt und wird durch den Sympathikus aktiviert.

Wie beschrieben ist die intrazelluläre Calciumkonzentration ein entscheidender Faktor im Kontraktionsvorgang. Die Depolarisation der Herzmuskelzellen initiiert die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-Typs. Es resultiert ein Calciumeinstrom, der wiederum zu einer Öffnung von konzentrationsabhängigen Calciumkanälen im intrazellulären Calciumspeicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), führt. Es handelt sich bei diesen Kanälen um Ryanodin-Rezeptoren, die durch ihre selbstverstärkenden Eigenschaften einen immensen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration von 10^{-7} mol/l auf 10^{-6} bis 10^{-5} mol/l hervorbringen (Endoh 2006). Eine Sympathikusaktivierung fördert diesen Calciumanstieg und wirkt sich damit positiv inotrop auf die Herzaktivität aus.

Mit dem Anstieg der Konzentration schließen sich die membranständigen Ionenkanäle. Die Calciumkonzentration im Zytosol wird durch einen aktiven Transport in das SR gesenkt. Die Aktivierung der $G\alpha_s$ -gekoppelten β_1 -Adrenorezeptoren führt ebenfalls zur Stimulation der Adenylatcyclase und aktiviert dessen second messenger cAMP. Dieser aktiviert seinerseits die Proteinkinase A (PKA), welche Einfluss auf den Calciumhaushalt nimmt (Crackower et al. 2002). Als Calcium-Transporter wirkt die Calcium-ATPase des sarcoplasmischen/endoplasmischen Retikulums 2A (SERCA2A). Die Regulation der SERCA2A findet über die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) statt, welches an den Transporter gebunden ist (Glaves et al. 2019).

Im inaktiven Zustand läuft der Calciumtransport in das SR nur langsam ab. Die Konsequenz sind eine verlängerte Relaxationszeit und gering gefüllte Calciumspeicher. Da ein schneller Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Voraussetzung für eine starke Kontraktion darstellt, ist das Resultat gering gefüllter Calciumspeicher eine verringerte Kontraktilität. Eine Sympathikusaktivierung führt zur Phosphorylierung des PLBs durch die PKA. Die Calcium-ATPase SERCA2A wird dadurch aktiv und sorgt für einen schnellen Rücktransport und einen intrazellulären Konzentrationsabfall des Calciums (Toyoshima 2009; Møller et al. 2010). Damit hat der Sympathikus eine positiv lusitrope Wirkung auf Kardiomyozyten. Die aufgefüllten Calciumspeicher ermöglichen eine hohe Kontraktilität. Folglich hängt die Kontraktionskraft des Myokards u.a. von der

intrazellulären Calciumkonzentration und der Fülle intrazellulären Speicher ab. (Maier und Bers 2002).

1.2.2.3 Der Einfluss von TGF- β_1 auf die kontraktile Funktion

Studien legten dar, dass die adrenerge Signalübertragung als nachgeschalteter Mediator der AngII/TGF- β_1 -Signalkette gilt (Schlüter et al. 1995; Rosenkranz et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass es durch eine vermehrte Produktion von TGF- β_1 , vermittelt durch eine Erhöhung des AngII-Spiegels, zu Veränderungen im adrenergen System des Herzens kommt. Eine Überexpression von TGF- β_1 führt zu einer veränderten Anzahl von β -Adrenorezeptoren in verschiedenen Zelltypen. Iizuka et al. konnten dies für kardiale Fibroblasten nachweisen (Iizuka et al. 1994). Rosenkranz et al. wiesen eine erhöhte myokardiale Rezeptordichte mit hypertrophem Phänotyp als Folge einer TGF- β_1 -Überexpression nach (Rosenkranz et al. 2002). Auch die in vitro Studie von Schlüter et al. zeigte, dass TGF- β_1 eine hypertrophe Reaktion bei β -adrenerger Stimulation induziert (Schlüter et al. 1995). Des Weiteren wurde die schädigende Wirkung einer chronischen Überaktivierung des β -adrenergen Systems in verschiedenen Studien belegt. Eine langfristige Überexpression der β_2 -Adrenorezeptoren induziert eine Kardiomyopathie (Liggett et al. 2000).

Die Ergebnisse von Huntgeburth et al. zeigten ebenfalls die negativen Folgen einer vermehrten TGF- β_1 -Expression. Sie belegten, dass bei Mäusen mit TGF- β_1 -Überexpression zwar keine Veränderung der basalen Kontraktion erkennbar ist, jedoch eine verminderte Inotropie des linken Ventrikels auf eine β -adrenerge Stimulation folgt. Diese Veränderungen ließen sich durch einen TGF- β_1 -Antagonisten vollständig aufheben. Gleichzeitig zeigten die Mäuse mit einer TGF- β_1 -Überexpression einen Anstieg der mitochondrialen Entkopplungsproteine (UCP), was darauf schließen lässt, dass TGF- β_1 den Energiehaushalt der Kardiomyozyten negativ beeinflusst. Eine UCP-Inhibition führte zur Normalisierung der linksventrikuläre Kontraktion.

1.3 TGF- β ₁-Signalwege

TGF- β ₁ ist ein Zytokin, das mit dem TGF- β -Rezeptor interagiert. Es handelt sich um einen heterodimeren Rezeptorkomplex, der aus dem TGF- β -Rezeptor I und dem TGF- β -Rezeptor II besteht. Diese Untereinheiten sind strukturell ähnlich aufgebaut. Es ist ein transmembraner Rezeptor, der eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne und einen intrazellulären Bereich mit Serin/Threonin Kinase-Aktivität besitzt. Im Unterschied zum Typ-2-Rezeptor zeichnet sich der Typ-1-Rezeptor durch eine Domäne aus, welche reich an Glycin- und Serinresten ist (Heldin et al. 1997). Durch die Bindung von TGF- β ₁ als Ligand an den TGF- β -Rezeptor II wird der TGF- β -Rezeptor I phosphoryliert (Shi und Massagué 2003). Der Rezeptorkomplex selbst erlangt eine Kinasen-Aktivität und kann über die Phosphorylierung spezifischer intrazellulärer Signalmoleküle Informationen weitergeben. Es kommt zum einen zur Signalweiterleitung durch SMAD-Proteine. Weiterhin leiten die Rezeptoren auch andere Signalwege ein, die zusammenfassend als non-SMAD-Signalwege bezeichnet werden. Die Weiterleitung findet über Kinasen wie die extrazelluläre signalregulierte Kinase (Erk), c-Jun amino terminale Kinasen (JNK), p38-MAPK sowie PI3K statt (Moustakas und Heldin 2005). Es wurde gezeigt, dass TGF- β ₁ über PI3K den AKT-Signalweg einleiten kann (Gamell et al. 2008). Die non-SMAD-Signalwege sind jedoch nicht unabhängig voneinander zu betrachten, sondern stellen vielmehr ein Netzwerk dar. Sie können sich untereinander und auch die SMAD-Signalkaskade beeinflussen.

1.3.1 SMAD-Signalweg

Die acht verschiedenen SMAD-Proteine lassen eine Differenzierung in drei Gruppen zu. Eine Einheit stellen die rezeptoraktiven SMAD-Proteine (R-SMADs) dar zu denen SMAD1, 2, 3, 5 und 8 gehören. Eine weitere Gruppe sind die common SMADs (Co-SMADs), wozu SMAD4 gehört. Die dritte Einheit bilden die inhibitorischen SMADs (I-SMADs), zu denen sich SMAD6 und 7 zuordnen lassen. Die SMAD-Proteine besitzen eine N-terminale MH1- und eine C-terminale, stark konservierte MH2-Domäne, die über eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Über die MH1-Domäne findet eine Interaktion mit der DNA und DNA-bindenden Proteinen statt. Die MH2-Domäne dient der Wechselwirkung mit anderen SMAD-Proteinen und Rezeptoren.

Durch die phosphorylierende Eigenschaft des TGF- β_1 -Rezeptor-Komplexes nach Stimulation durch seinen Liganden entstehen aus SMAD2 und SMAD3 P-SMAD2 und P-SMAD3. Nakao et al. zeigten, dass dieser Prozess durch die inhibitorische Wirkung von SMAD7 gehemmt werden kann (Nakao et al. 1997). P-SMAD2, P-SMAD3 und SMAD4 bilden im Zytosol einen heterotrimeren Komplex, der durch Translokation in den Nucleus gelangt. Der SMAD-Komplex fungiert als Transkriptionsfaktor (Euler-Taimor und Heger 2006). Heger et al. zeigten, dass sich in adulten Kardiomyozyten der Ratte alle SMAD-Typen nachweisen lassen (Heger et al. 2009). Der durch TGF- β_1 eingeleitete SMAD-Signalweg ist in Abbildung 4 dargestellt.

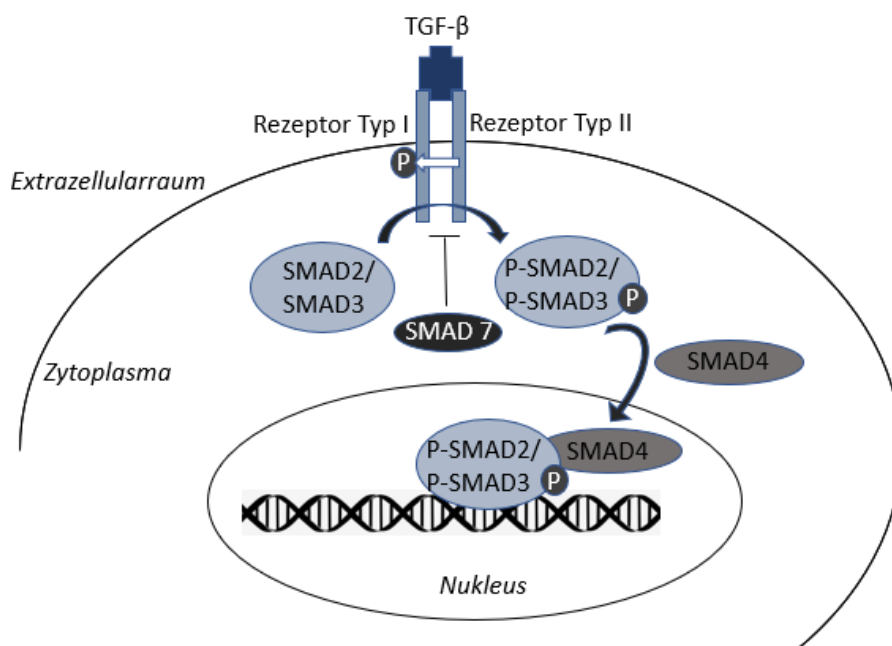


Abbildung 4: Darstellung des TGF- β_1 -induzierten SMAD-Signalweges (Euler-Taimor und Heger 2006)

Im Zellkern reguliert der Komplex die Genexpression auf DNA-Ebene. Dabei ist es SMAD3 und SMAD4 selbst möglich über die MH1-Domäne, an bestimmte Stellen der DNA zu binden. Diese Regionen werden als „smad-binding-elements“ (SBE) bezeichnet. Die Sequenzen sind in der Promotorregion verschiedener TGF- β_1 -Zielgene lokalisiert. Ein Target von TGF- β_1 ist SMAD7, welches den TGF- β_1 -induzierten SMAD-Signalweg inhibiert und dadurch eine negative Rückkopplung darstellt (Gersdorff et al. 2000). Es geht eine Bindung mit dem TGF- β -Rezeptor I, auch als „activin receptor-like kinase 5“ (ALK5) bezeichnet, ein und blockiert die Rekrutierung und

Phosphorylierung der R-SMADs SMAD2 und SMAD3 (Nakao et al. 1997). Die Inhibition durch SMAD7 findet des Weiteren im Zellkern statt, in dem es die Expression von TGF- β_1 -Zielgenen inhibiert. Es interagiert mit dem Komplex aus R-SMADs und SMAD4 und behindert dessen Bindung an die DNA (Zhang et al. 2007).

1.3.2 non-SMAD-Signalwege

1.3.2.1 Der Erk-MAPK-Signalweg

Neben der schon beschriebenen Aktivierung des TGF- β_1 -Rezeptors findet auch eine Phosphorylierung an den Tyrosinresten Tyr 259, 336 und 424 beider Rezeptortypen statt (Lawler et al. 1997). Dies führt zur Rekrutierung von Proteinen mit SH2-Domäne sowie weiterer Proteine. (McKay und Morrison 2007). Die Bildung des Rezeptor-Protein-Komplexes führt zu einer Aktivierungskaskade. Über Kinasen und Proteine wie Ras, RAF und MAPKs, mündet diese schließlich in einer SMAD-unabhängigen Aktivierung der Erk1/2.

Dieser Signalweg wurde unter anderem in Epithelzellen und Zellen des Kolonkarzinoms nachgewiesen (Mulder und Morris 1992; Yan et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass bereits Minuten nach TGF- β_1 -Stimulation ein Ras-Anstieg erkennbar ist und Erk1/2 aktiviert wird. Andere Zelltypen zeigten dagegen eine verzögerte Aktivierung der Erk1/2 (Simeone et al. 2001). Die unterschiedliche Aktivierungszeit zeigt, dass die Ausprägung des Signals abhängig vom Zelltyp ist. Erk1/2 reguliert unter anderem die biologische Funktion von TGF- β_1 . Zum einen aktiviert sie die Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Aktivatorproteine (AP-1) sowie p53 und wirkt damit pro-apoptotisch (Yoon und Seger 2006). Diese und weitere Transkriptionsfaktoren interagieren mit SMAD-Proteinen. Gleichzeitig ist Erk1/2 auch selbst in der Lage, R-SMADs zu phosphorylieren und so deren Aktivität auf verschiedenen Ebenen zu kontrollieren (Kretzschmar et al. 1999).

1.3.2.2 Die Aktivierung von JNK und p38-MAPK

Eine Ligandenbindung von TGF- β_1 an seinen Rezeptor hat ebenfalls die Aktivierung der MAPKs JNK und p38-MAPK zur Folge. Diese Signalwege werden eingeleitet als Reaktion auf Zytokinstimulation und extrazelluläre Stressfaktoren (Weston und Davis

2007). Die Bildung des TGF- β_1 -Rezeptorkomplexes hat eine Polyubiquitinierung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktors 6 (TRAF6), der mit dem Rezeptor assoziiert ist, zur Folge (Yamashita et al. 2008). Dies ist auch für TRAF4 bekannt (Zhang et al. 2013). Es folgt die Aktivierung der TGF- β -aktivierten Kinase 1 (TAK1), welche u.a. die MKK3, MKK4 und MKK6 aktiviert. Die JNK-Aktivierung erfolgt durch MKK4 (Frey und Mulder 1997). Die p38-MAPK wird durch MKK3 und MKK6 aktiviert (Hanafusa et al. 1999). Die Aktivierung kann sowohl direkt (Engel et al. 1999), als auch mit einer Verzögerung einsetzen. Der verzögerte Signalweg, wie er in Hepatozyten, Pankreaskarzinomen und Osteoblasten nachgewiesen wurde, erfordert jedoch eine vorherige Aktivierung von SMAD-Proteinen und damit verbundenen Transkriptionsfaktoren (Takekawa et al. 2002).

Es sind weitere Zusammenhänge mit den inhibitorischen SMAD-Proteinen SMAD6 und SMAD7 bekannt. SMAD6 führt zu einer Deubiquitinierung von TRAF6 und inhibiert damit die Aktivierung der JNK und p38-MAPK durch TGF- β_1 (Jung et al. 2013). SMAD7 dagegen erleichtert die Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch TGF- β_1 (Edlund et al. 2003). Es besteht weiterhin ein Zusammenhang, da dieser Signalweg ebenso wie der SMAD-Signalweg die pro-apoptotische Wirkung von TGF- β_1 vermittelt. Unter anderem zeigten Edlund et al., dass eine Überexpression von TAK1 zu einer gesteigerten Apoptose führt (Edlund et al. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des TRAF6 die TGF- β_1 -induzierte Apoptose hemmt (Yamashita et al. 2008).

1.3.2.3 Der PI3K/AKT-Signalweg

Ein weiterer non-SMAD-Signalweg verläuft über die die Aktivierung des PI3K/AKT-Weges. Dieser kann sowohl direkt durch TGF- β_1 , als auch durch zwischengeschaltete Signalwege aktiviert werden. Eine genaue Darlegung des PI3K/AKT Signalweges findet sich in Kapitel 1.4.5.1 wieder. Es besteht ein Zusammenhang zu weiteren non-SMAD-Signalwegen sowie zum SMAD-Signalweg. Der PI3K/AKT-Signalweg kann über die Bindung von TGF- β_1 an seinen Rezeptor eingeleitet werden. Es kommt nachfolgend zu einer Reaktion der regulatorischen Untereinheit der PI3K mit ALK5, welche in der Einleitung des AKT-Signalweges mündet. Die Inhibition von ALK5 verhindert eine Aktivierung der PI3K-vermittelten Einleitung des AKT-Signalweges durch TGF- β_1 (Lamouille und Derynck 2007).

AKT nimmt ebenfalls direkten Einfluss auf den SMAD-Signalweg. Es geht eine Bindung mit SMAD3 ein und hemmt dessen Phosphorylierung durch den TGF- β -Rezeptor Komplex sowie die Translokation von SMAD3 in den Zellkern, in welchem es die Expression der TGF- β -Zielgene reguliert (Remy et al. 2004). Des Weiteren phosphoryliert AKT den Transkriptionsfaktor FoxO, der für die Expression mehrerer Zielgene des SMAD-Signalweges im Nukleus benötigt wird. Seine Phosphorylierung verhindert die Translokation in den Zellkern (Seoane et al. 2004). Dementsprechend kann die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges die TGF- β -induzierte Apoptose und Wachstumshemmung verringern. Gleichzeitig phosphoryliert und aktiviert AKT das Enzym „ubiquitin-specific-peptidase 4“ (USP4). Dieses stabilisiert ALK5 und fördert die non-SMAD Signalwege (Zhang et al. 2012).

1.4 Phosphinositid-3-Kinasen (PI3K)

Bei den Phosphinositid-3-Kinasen handelt es sich um eine Familie von Kinasen, die an vielen zellulären Abläufen beteiligt sind. Sie gelten u.a. bei der Proliferation, Zelldifferenzierung, bei dem Zellwachstum sowie der Apoptose als entscheidende Moleküle in der Signaltransduktion und können als Protein- oder Lipidkinasen agieren. Aufgrund des Einflusses auf unterschiedliche zelluläre Abläufe sind die PI3K seit den 1980er Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten (Vanhaesebroeck et al. 2012). Nach Stimulation von membranständigen Rezeptoren - beispielsweise mit Wachstumsfaktoren - werden die PI3K zur Zellmembran rekrutiert. Sie sind dort in der Lage, Phosphoinositide an der D3-Stelle des Inositolringes zu phosphorylieren.

1.4.1 Phosphoinositide

Phosphoinositide stellen eine Gruppe von Membranlipiden dar, die auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind. Phosphatidylinositol besteht aus einem Glycerin-Baustein, der über eine Esterbindung zum einen mit einer Arachidon- und einer Stearinsäure verbunden ist und zum anderen über eine Phosphodiesterbindung eine polare Kopfgruppe hat, die einen Inositolring darstellt. Dieser weist freie Hydroxylgruppen an den Stellen D2 bis D6 auf (Falkenburger et al. 2010). Die Strukturformel von Phosphatidylinositol ist in Abbildung 5 dargestellt. An den Stellen D3, D4 und D5 ist eine Phosphorylierung

möglich, wodurch höher phosphorylierte Phosphoinositide entstehen. Gesteuert wird dieser Vorgang durch Phosphoinositidkinasen und -phosphatasen. So entsteht durch die Phosphorylierung mittels PI3K aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphonat (PIP₃).

Phosphoinositide stellen nur einen geringen Anteil der Membranlipide dar. Phosphatidylinositol bildet 10% des Gesamtlipidanteils und ist damit am häufigsten vertreten. Dies lässt darauf schließen, dass sie keine strukturelle Funktion für die Zellmembran darstellen (Toker 2002). Sie gelten aufgrund ihrer Interaktion mit verschiedenen Proteinen vielmehr als Bestandteil zahlreicher Signaltransduktionswege. Ihre Wirkung erreichen sie durch Bindung an spezifischen Zieldomänen, die sich innerhalb der Effektorproteine befinden. Unterschiede in dem Vorkommen der einzelnen Phosphoinositide lassen sich zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen feststellen. PI-3,5-P₂, PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃ konnten in unstimulierten nicht nachgewiesen werden, wohingegen sie in stimulierten Zellen schon kurz nach dem Reiz einen deutlichen Konzentrationsanstieg zeigen (Toker 2002).

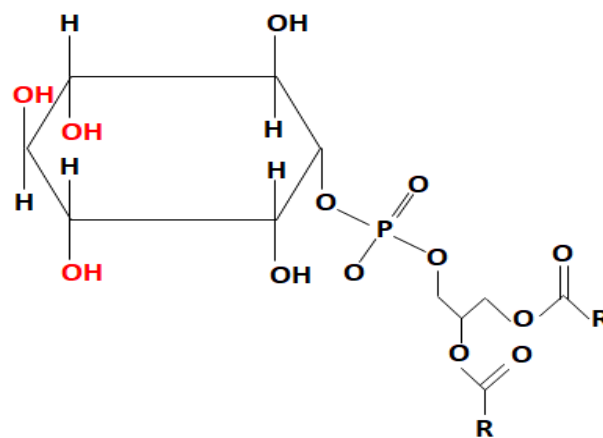


Abbildung 5: Strukturformel von Phosphatidylinositol, R repräsentiert die Fettsäurereste Arachidon- und Stearinsäure, die rot markierten OH-Gruppen werden durch Phosphoinositidkinasen phosphoryliert, geschieht das an allen drei Stellen, entsteht PI-3,4,5-P₃ (verändert nach Nürnberg und Beer-Hammer 2019)

1.4.2 Einteilung der PI3K-Isoformen

Es sind acht verschiedene Isoformen der PI3Ks bekannt, die in Tabelle 2: Einteilung der PI3K-Isoformen aufgelistet sind. Diese lassen sich in drei funktionelle Klassen unterteilen, wobei sich in der Klasse 1, die Klassen 1A und 1B unterscheiden.

Alle Subtypen der Klasse 1 bestehen aus einer katalytischen Untereinheit p110 und einer regulatorischen Untereinheit (p50/p55/p85). Die katalytische Untereinheit der PI3K besitzt bei allen Isoformen der Klasse 1 eine ähnliche Struktur. Die Klasse 1A umfasst die drei Isoformen PI3K-p110 α , PI3K-p110 β und PI3K-p110 δ . Diese Gruppe der PI3K wird durch Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR) aktiviert. Einzig die PI3K-p110 β agiert außerdem auch mit dem GPCR. PI3K γ bildet seinerseits die Gruppe 1B und enthält die katalytischen Untereinheit p110 γ . Die Kinase PI3K γ geht, im Gegensatz zu den Isoformen der Klasse 1A, eine Bindung mit den Untereinheiten des GPCR nach dessen Dissoziation ein (Stoyanov et al. 1995).

Die Klasse 2 umfasst drei Isoformen, die PI3K-C2 α , PI3K-C2 β und PI3K-C2 γ . Sie unterscheiden sich durch die zusätzliche große Einzelpolypeptidkette, die eine carboxy-terminale C2-Domäne besitzt, von der Klasse 1. In der Klasse 3 ist allein das Human-Vacuolar-Protein-Sorting 34 (hvp34) bekannt. Es nutzt in vivo und in vitro das Substrat PI und setzt es zu Phosphatidylinositol-3-phosphonat (PIP) um (Toker 2002).

Tabelle 2: Einteilung der PI3K-Isoformen

Klasse	Isoformen
1A	PI3K α , PI3K β , PI3K δ
1B	PI3K γ
2	PI3K-C2 α , PI3K-C2 β , PI3K-C2 γ
3	Vps34

1.4.3 Funktionen der PI3K-Isoformen

Um die Isoform-spezifischen Funktionen der PI3K zu bestimmen, wurden transgene Mäuse sowie dominant-negative Mutanten verwendet. Die Mäuse, deren regulatorische oder katalytische Untereinheiten ganz oder teilweise fehlten, wiesen unterschiedliche Veränderungen auf, die es möglich machten, die PI3K-Isoformen funktionell zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass PI3K α einen Einfluss auf die Größe des adulten Herzens hat (Shioi et al. 2000). Lei Bi et al. bestätigten durch p110 α -KO-Mäuse, dass diese Isoform eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei Wachstumsprozessen

spielt (Bi et al. 1999). Die Mäuse zeigten proliferative Defekte. Eine Hemmung der Kinase durch Antikörper führte zu einer verringerten Zellproliferation (Vanhaesebroeck et al. 2012). Es zeigte sich außerdem eine gesteigerte embryonale Letalität bei p110 α - und p110 β -Deletion (Bi et al. 1999). Die katalytische Untereinheit p110 β ist außerdem im Metabolismus von Adipozyten involviert. Eine Injektion von p110 β -Antikörpern führte zum Stillstand des insulininduzierten Glukosetransportes (Asano et al. 2000).

Im Gegensatz zu Mäusen, denen die p110 α und p110 β Untereinheit fehlt, sind Mäuse mit einem p110 δ -Defizit lebensfähig. Die Expression von PI3K δ in Leukozyten deutet auf seine Rolle im Immunsystem hin. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen, die zeigen, dass das Fehlen der Kinase sowohl die Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen beeinflusst und eine verringerte Antikörperproduktion zur Folge hat (Clayton et al. 2002).

PI3K γ nimmt ebenfalls Einfluss auf die Immunabwehr, wobei vornehmlich die angeborene Immunabwehr betroffen ist. Eine veränderte Funktion der PI3K in Neutrophilen, Makrophagen, Mastzellen und anderen Zellen des angeborenen Immunsystems konnte bei verschiedenen Krankheitsbildern dokumentiert werden. Es wurde gezeigt, dass p110 γ -Knockout-Mäuse lebensfähig und fortpflanzungsfähig sind, die Migration von Neutrophilen und Makrophagen jedoch deutlich verringert ist (Hirsch et al. 2000). Des Weiteren ist PI3K γ neben PI3K α in Kardiomyozyten nachgewiesen wurden. PI3K γ agiert hier zum einen als Kinase. Zum anderen interagiert PI3K γ kinaseunabhängig mit Proteinen und nimmt Einfluss auf die Kontraktion von Kardiomyozyten (Patrucco et al. 2004).

1.4.4 PI3K-Inhibitoren

Um die Funktionen der PI3K näher zu bestimmen und sie den einzelnen Isoformen zuzuordnen, war es Ziel zahlreicher Untersuchungen PI3K zu hemmen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der verschiedenen PI3K-Isoformen, war es schwierig eine selektive Hemmung vorzunehmen. Zunächst wurde Wortmannin entdeckt, ein Schimmelpilzmetabolit mit antiinflammatorischer Wirkung (Vanhaesebroeck et al. 2012). Durch eine kovalente Bindung der p110-Untereinheit inhibiert er die Funktion der PI3K irreversibel. Zeitgleich wurde die inhibierende Wirkung von LY294002 entdeckt. LY294002 ist ein synthetischer Inhibitor, der durch eine kompetitive Hemmung die Wirkung der PI3K unterdrückt. Am aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheit

konkurriert es mit ATP (Vanhaesebroeck et al. 2001). Die bisher aufgeführten PI3K-Inhibitoren, hemmen alle Isoformen der PI3K und werden als pan-PI3K-Inhibitoren bezeichnet. Die ersten Untersuchungen über Inhibitoren, die selektiv eine Isoform hemmen wurden 2003 veröffentlicht. Es handelte sich um den PI3K δ -Inhibitor IC 87114 (Sadhu et al. 2003). Seitdem wurden einige Isoform-spezifische Inhibitoren entwickelt und ihre Wirkung untersucht. Im Jahr 2014 wurde mit Idelalisib der erste PI3K δ -Inhibitor von der FDA für die Behandlung von chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) und non-Hodgkin Lymphomen (NHL) zugelassen (Castillo et al. 2012). 2018 folgte Duvelisib, ein dualer PI3K δ/γ Inhibitor, welcher ebenfalls bei CLL eingesetzt wird. Die Blockade der γ -Isoform bietet vielversprechende Ansätze für die Behandlung von inflammatorischen und Autoimmun-Erkrankungen (Cushing et al. 2012). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor AS605240 um einen selektiven PI3K γ -Inhibitor handelt, der u.a. in der Lage ist, die inflammatorische Wirkung von PI3K γ zu hemmen. Er blockiert die ATP-Bindungsstelle der PI3K γ (Camps et al. 2005; Galluzzo et al. 2015; Galvão et al. 2018). Bisher wurde noch kein PI3K γ -selektiver Inhibitor zugelassen, jedoch befindet sich IPI-549 in der klinischen Prüfung (Evans et al. 2016).

1.4.5 Signalwege von PI3K

1.4.5.1 Die Aktivierung von AKT durch PI3K

Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist der kinaseabhängige PI3K/AKT-Signalweg. Der TKR, ein membranständiger Rezeptor mit Kinaseaktivität, wird durch Bindung eines Wachstumsfaktors aktiviert, was die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils zur Folge hat. Es folgt die Rekrutierung der PI3K. Sie besitzt eine SH2-Domäne in der regulatorischen Untereinheit. Dies ist eine Region an Proteinen, über welche eine Bindung an SH2-spezifischen Domänen möglich ist. Das in der unstimulierten Zelle vorkommende PIP₂ wird durch die katalytische Untereinheit der aktiven PI3K, zu PIP₃ phosphoryliert.

Das „Phosphatase und Tensin Homolog“ (PTEN) wirkt antagonistisch zur PI3K, indem es PIP₃ dephosphoryliert und den Signalweg inhibiert. Es handelt sich um einen Tumorsuppressor, dessen Inaktivierung, beispielsweise durch Mutation, zur Entstehung von Primärtumoren beitragen kann (Vivanco und Sawyers 2002). PTEN-defiziente

Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg in der PI3K-Aktivität und damit auch in der Aktivität weiterer PI3K-Targets wie AKT oder der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3 β) (Crackower et al. 2002).

Findet keine Dephosphorylierung statt, kommt es zu Anhäufung der PIP₃. Es resultiert die Rekrutierung der Serin/Threonin-Kinase AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, und weiterer Proteine, die eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne besitzen (Engelman et al. 2006). Die Kinase bindet mit der PIP₃-spezifischen PH-Domäne an das Phosphoinositid. Es resultiert eine Konformationsänderung, die es der Proteinkinase „3-phosphoinositide-dependent kinase-1“ (PDK1) möglich macht, Threonin 308 (Thr308) zu phosphorylieren. AKT wird zusätzlich durch den „mammalian target of rapamycin complex 2“ (mTORC2) an Serin 473 (Ser473) phosphoryliert und erlangt so seine vollständige Aktivität (Sarbasov et al. 2005). An dieser Stelle des PI3K/AKT-Signalweges wirkt die Phosphatase „PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase“ (PHLPP) als Regulator, indem sie die Phosphorylierung des Ser473 aufhebt und damit zu einer Inaktivierung von AKT/PKB führt (Gao et al. 2005).

Ist AKT aktiviert, reguliert sie die Aktivität von zahlreichen Proteinen, die zum Überleben, zur Proliferation sowie zum Zellwachstum der Zelle beitragen. Sie wirkt der Apoptose entgegen und gilt daher als Überlebenssignal. AKT phosphoryliert den pro-apoptotischen Bcl-2-Antagonisten (BAD), welcher durch Interaktion mit dem anti-apoptotischen BCL-XL gleiches inaktiviert und damit zur Apoptose führt. Die Phosphorylierung verhindert diese Bindung mit BCL-XL, welches dadurch der Apoptose weiterhin entgegenwirken kann (Datta et al. 1997).

Auch der pro-apoptotische Transkriptionsfaktor FOXO-3A wird durch die Kinase phosphoryliert und damit inaktiviert. Die Phosphorylierung von weiteren „Forkhead transcription factors“ verhindert ebenfalls deren Translokation in den Zellkern. Damit wird die Expression von Apoptose-induzierenden Genen und gleichsam die Herstellung von pro-apoptotischen Proteinen verhindert (Brunet et al. 1999). Einen weiteren Weg zur Unterbindung der Apoptose stellt die Phosphorylierung der Caspase 9 dar, die dadurch ihre pro-apoptotische Wirkung verliert (Cardone et al. 1998). Weiterhin wird der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie seine Zielgene durch AKT reguliert (Romashkova und Makarov 1999).

1.4.5.2 Weitere Zusammenhänge zwischen TGF- β_1 und PI3K

Die Aktivierung von PI3K durch den TGF- β_1 -Rezeptor ist im Kapitel 1.3.2.3 dargestellt. Die TGF- β -Stimulation induziert die Expression der mircoRNA-216a/217. Diese hemmt die Phosphatase PTEN und SMAD7 und fördert den PI3K/AKT und TGF- β_1 -Signalweg (Xia et al. 2013). Auch die Expression der microRNA-21 wird durch TGF- β_1 induziert (Dey et al. 2012). Es handelt sich ebenfalls um einen Repressor von PTEN, welches als Antagonist zur PI3K wirkt, indem es PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert und damit eine AKT-Aktivierung verhindert.

TGF- β induziert die epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT). Über Untersuchungen mit Inhibitoren kam man zu dem Schluss, dass die PI3K an der Reorganisation des Aktinfilaments und der Zellmigration, während der EMT beteiligt ist (Zhang 2017). Eine entscheidende Rolle in der TGF- β -induzierten EMT spielen die Komplexe mTORC1 und mTORC2. Es handelt sich dabei um Serin/Threonin-Kinasen, die durch Rapamycin inhibiert werden. Ihre Aufgabe besteht in der Phosphorylierung von Makromolekülen. Man unterscheidet zwischen mTORC1 und mTORC2, wobei nur ersterer durch Rapamycin gehemmt wird. Nachdem anschließend an die TGF- β -Stimulation die Aktivierung von PI3K und AKT erfolgt, phosphoryliert diese den Tuberous-Sclerosis-Complex (TSC), der so seine hemmende Wirkung auf die mTORC verliert. In Brustepithelzellen und Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass auf eine TGF- β_1 -Stimulation eine schnelle Aktivierung von mTORC1 durch AKT erfolgt. Diese Kinase phosphoryliert und aktiviert die S6 Kinase (S6K), die wiederum die Aktivität des ribosomalen Proteins S6 anregt. Die Aktivierung von mTORC1 mündet in einer erhöhten Motilität und Invasion sowie in einer gesteigerten Proteinsynthese (Lamouille und Derynck 2007). TGF- β induziert ebenfalls die Aktivierung des mTORC2. Im Zuge der EMT trägt der Komplex zur Reorganisation des Zytoskeletts und Zellmigration bei (Lamouille et al. 2012). mTORC2 phosphoryliert außerdem AKT an Ser473 und fördert damit dessen Aktivität. AKT reguliert mehrere Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle in der EMT einnehmen. Beispielsweise wird der Transkriptionsfaktor Twist1 phosphoryliert und dessen Aktivität so gefördert (Xue et al. 2012). Die Folge ist eine verstärkte Expression von TGF- β_2 , die eine Förderung des PI3K/AKT Signalweges sowie der EMT impliziert. Des Weiteren werden das heterogene Kern-Ribonukleoprotein E1 (hnRNPE1) sowie die GSK3 β über AKT reguliert. Über die Phosphorylierung von hnRNPE1 verliert dieses seinen translationshemmenden Effekt, was einen positiven

Effekt für die EMT hat (Hussey et al. 2011). PI3K spielt außerdem in der TGF- β_1 -induzierten Fibroblastenproliferation eine Rolle (Wilkes et al. 2005).

Auf der anderen Seite kann eine TGF- β_1 -Aktivierung zu einer Herunterregulierung der PI3K/AKT-Signalübertragung führen, indem es die Expression der SH2-haltigen Inositol-50-Phosphatase (SHIP) stimuliert (Valderrama-Carvajal et al. 2002). Diese Phosphatase inhibiert den PI3K/AKT-Signalweg. Dies erklärt die kurzweilige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch TGF- β_1 .

1.4.6 PI3K und dessen Einfluss auf Kardiomyozyten

PI3K wird in Kardiomyozyten exprimiert. Wie beschrieben aktiviert die Stimulation des TKR die PI3K der Klasse 1A und damit den TKR-Signalweg. Auch in Kardiomyozyten konnte dessen Wirkung als Überlebenssignal gezeigt werden (Wu et al. 2000; Miyamoto et al. 2009). Es agiert durch seinen Einfluss auf zytoplasmatische Kompartimente, die dazu beitragen, die Apoptose einzuleiten, aber auch durch Inhibition von Transkriptionsfaktoren, die pro-apoptotisch wirken. Die Aktivierung des Signalweges hat einen protektiven Einfluss auf die Integrität der Mitochondrien und verhindert damit die Einleitung der Apoptose. AKT schützt Kardiomyozyten damit bei oxidativem Stress und Ischämie (Fujio et al. 2000).

Den unterschiedlichen Isoformen konnten in Kardiomyozyten verschiedene Funktionen zugewiesen werden. Im kardialen Gewebe werden PI3K α und PI3K γ exprimiert. Sie wirken auf unabhängigen Signalwegen, die voneinander entkoppelt werden können und beeinflussen das Zellwachstum sowie die adaptive und pathologische Hypertrophie-Entwicklung. (Crackower et al. 2002). Zu unterscheiden sind der TRK-Signalweg, der über PI3K α weitergeleitet wird und der GPCR-Weg, der PI3K γ aktiviert. Sie sind Regulatoren der Zellgröße und Kontraktilität in Kardiomyozyten. Eine Überexpression von PI3K α führt zu Hypertrophie. Eine Überexpression von dominant negativem p110 α resultierte in kleineren Herzen (Shioi et al. 2000; Yano et al. 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass PI3K α positiv inotrop wirkt. Es vermittelt den Calciumeinstrom durch L-Typ Calciumkanäle bei Depolarisation der Kardiomyozyten und kann dadurch die Kontraktionskraft steigern (Sun et al. 2006).

1.4.6.1 PI3K γ in Kardiomyozyten

Die katalytische Untereinheit der PI3K γ wird durch die Bestandteile des G-Proteins nach dessen Dissoziation stimuliert und besteht aus einer Ras-Bindungsdomäne (RBD), einer C2-Domäne, einer helikalen Domäne sowie einer Kinase-Domäne (Walker et al. 1999). Letztere wiederum enthält einen N-terminalen und einen C-terminalen Abschnitt, welche über eine ATP-Bindungsstelle miteinander verbunden sind. Die Struktur der katalytischen Untereinheit ähnelt sich bei allen Isoformen (Taylor et al. 1999). Im Fall von PI3K γ bindet sie an die regulatorische Untereinheit p101 oder p84/87 (Stephens et al. 1997; Suire et al. 2005). In Zellen des Immunsystems ist vor allem die PI3K γ mit der regulatorischen Untereinheit p101 vorhanden (Shymanets et al. 2013). Dagegen findet man in Kardiomyozyten vorrangig p84/87 vor (Suire et al. 2005). Eine schematische Darstellung der katalytischen und regulatorischen Untereinheit findet sich in Abbildung 6 wieder. In der Klasse 1A findet die Bindung der Untereinheiten über eine N-terminale Adapter-Bindungsdomäne (ABD) im katalytischen Teil statt. Wie genau die Untereinheiten im Fall von PI3K γ miteinander verbunden sind und welche Rolle ABD dabei spielt, ist nicht genau geklärt. Beide regulatorische Untereinheiten weisen eine Affinität zum G-Protein auf und können an dieses durch eine G $\beta\gamma$ -Bindungsdomäne binden. Die Affinität von p101 ist jedoch deutlich größer (Kurig et al. 2009; Kurosu et al. 1997). Die Wirkung von PI3K γ in Kardiomyozyten wird auf einem kinaseabhängigen und einem kinaseunabhängigen Weg vermittelt (Patrucco et al. 2004; Alloatti et al. 2003; Ghigo und Li 2015).

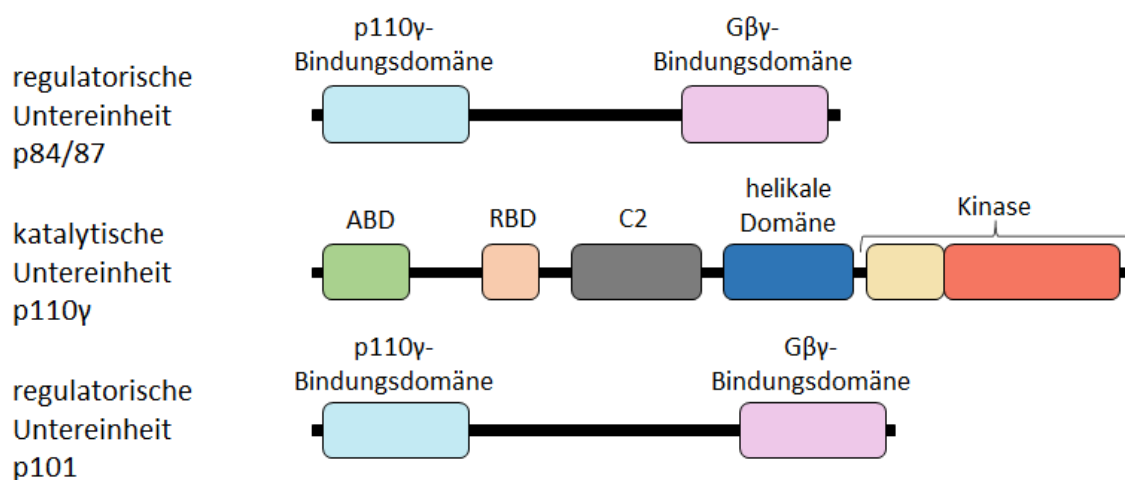


Abbildung 6: schematische Darstellung der regulatorischen und katalytischen Untereinheiten der PI3K γ (verändert nach Nürnberg und Beer-Hammer 2019)

Bei p110 γ -defizienten Mäusen wurde eine Kontraktionssteigerung deutlich. Damit ergab sich die Schlussfolgerung, dass die PI3K γ die Kontraktionskraft negativ beeinflusst (Crackower et al. 2002). Die PI3K γ gilt als Isoform, die in Kardiomyozyten über ihren Einfluss auf den cAMP-Spiegel und die PLB-Phosphorylierung eine Schnittstelle zwischen Erregung und Kontraktion darstellt. Die Deletion des PI3K γ -Gens führt zu einer gesteigerten Adenylatcyclase-Aktivität. Folglich steigt der cAMP-Spiegel. Daraus resultiert eine verstärkte Phosphorylierung von PLB in der unstimulierten Zelle, aber auch nach β_2 -adrenerger Stimulation. Die β_1 -adrenergen Rezeptoren sind G α_s gekoppelt und zeigen durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase einen positiv inotropen Effekt. Diese Wirkung sowie der cAMP-Spiegel bleiben bei Deletion des PI3K γ -Gens unverändert (Crackower et al. 2002). Des Weiteren beeinflusst die PI3K γ die Kontraktion nach β -adrenerger Stimulation negativ durch Veränderungen des Rezeptors. Es trägt auf kinaseabhängigen und -unabhängigen Wegen zur Desensibilisierung und Endozytose der Rezeptoren bei (Naga Prasad et al. 2005; Vasudevan et al. 2011; Ghigo et al. 2017).

Es konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Adrenorezeptoren und der Entstehung der pathologischen Hypertrophie hergestellt werden. Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der PI3K γ , welche mit einem erhöhten AKT/PKB-Spiegel einhergeht. Daraus geht eine verstärkte ERK1/2-Aktivität hervor, die wiederum zur Hypertrophie beiträgt (Xiao et al. 2001). PI3K γ begünstigt damit die Vergrößerung des linken Ventrikels und führt zum Übergang von der kompensierten in die dekompenzierte Herzinsuffizienz. Dagegen führt eine Verminderung der PI3K-Aktivität zu einer geringeren Hypertrophie-Entwicklung (Naga Prasad et al. 2000). Der Verlust von PI3K γ verhindert weiterhin die Aktivierung der MAPK und sorgt für eine partielle Umkehrung der Hypertrophie nach β -adrenerger Stimulation (Oudit et al. 2003).

Auch in der kardialen Revaskularisation und Erholung nach ischämischen Zuständen spielt PI3K γ eine Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von PI3K γ mit gleichzeitiger Inhibition von PI3K δ zu einem geringeren postischämischen Schaden führt (Doukas et al. 2006). Als Folge auf einen Infarkt wird PAF (platelet-activating-factor) freigesetzt. Es handelt sich um einen GPCR-Agonisten, der kardiodepressiv wirkt. In PI3K γ -KO-Mäusen wurde diese Wirkung nach einer Ischämie nicht beobachtet (Alloatti et al. 2003).

1.5 Zielstellung

TGF- β_1 ist ein Zytokin, das eine entscheidende Rolle im kardialen Remodeling spielt, indem es zur Fibrose führt, die Apoptose induziert und damit zur Herzinsuffizienz beiträgt. TGF- β_1 nutzt dafür den SMAD-Signalweg. Neben diesem sind weitere non-SMAD-Signalwege bekannt, über die Kinasen aktiviert werden. Eine dieser Kinasen ist PI3K. Für die Isoform PI3K γ konnte gezeigt werden, dass es die Kontraktionskraft negativ beeinflusst. Es stellt damit ein potenzielles Ziel für pharmakologische Therapieansätze bezüglich der Herzinsuffizienz dar.

Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob in Kardiomyozyten ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von TGF- β_1 und PI3K γ besteht. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, inwieweit die TGF- β_1 -induzierte Apoptose sowie die durch TGF- β_1 hervorgerufene kontraktile Dysfunktion durch PI3K γ vermittelt wird. Außerdem soll geklärt werden, ob die Einleitung des SMAD-Signalweges durch TGF- β_1 von PI3K γ beeinflusst wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Präparation der adulten Kardiomyozyten aus der Ratte (Tiertötungsnummer: 668_M) wurden Wistar Ratten Männchen verwendet, die 3-4 Monate alt und 300-400g schwer waren. Sie entstammen dem Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen und hatten Zugang zum Standardfutter (Altromin®) und Wasser.

Die Präparation der Kardiomyozyten aus der Maus (Tiertötungsnummer: 644_M) erfolgte zum einen aus C57BL6/J-Mäusen (Janvier SAS, CS 4105, Le Genest Saint Isle, F-53941 St Berthevin Cedex), welche als Kontrolltiere verwendet wurden, zum anderen aus PI3K γ -KO-Mäusen (B6.129-Pik3cg^{tm1Wym}, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Ph.D. Emilio Hirsch, Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Center for Molecular Biotechnology, Via Nizza 52,10126 Torino, Italy). Der PI3K γ -Knockout wurde durch Einführung eines Targeting-Vektors herbeigeführt. Es erfolgte die Insertion eines IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) -LacZ und einer Neomycin-Resistenzkassette in das erste kodierende Exon (Exon 2) des PI3K γ -Gens, was zu dessen Störung führte (Hirsch et al. 2000).

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
10% Bis-Tris Gel	Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA
10X NEBuffer	NEB, Frankfurt am Main
20fach XT Reducing Agent	Bio-Rad, Hercules, California, USA
4fach XT Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin Standard 23029	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe

Aqua dest.	BRAUN, Melsungen
Benzonase	Merk, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Caspase-Glo® 3/7 Buffer	Madison, Wisconsin, USA
Caspase-Glo® 3/7 Substrate	Madison, Wisconsin, USA
Cell Lysis Buffer	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
CoCl ₂	NEB, Frankfurt am Main
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cy3-dCTP	Sigma, Taufkirchen
Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
DC Protein Assay Reagent A	BioRad, Hercules, Kalifornien USA
DC Protein Assay Reagent B	BioRad, Hercules, Kalifornien USA
DC Protein Assay Reagent S	BioRad, Hercules, Kalifornien USA
Deoxycholat	Sigma, Taufkirchen
DirectPCR Lysis Reagent	Qiagen, Venlo, Niederlande
dI/dC	Sigma, Taufkirchen
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Glucose-Monohydrat	Merk, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycerolphosphat	Sigma, Taufkirchen
Hoechst Farbstoff 33258	Sigma, Taufkirchen
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merk, Darmstadt

KH ₂ PO ₄	Merk, Darmstadt
Kollagenase Typ 2	Biochrom GmbH, Berlin
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Laminin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
M199 / HEPES / Earl´s Salts	Biochrom GmbH, Berlin
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
MgSO ₄	Merk, Darmstadt
Mops Puffer Running Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
NaCl 0,9%	BRAUN, Melsungen
NaCl	Merk, Darmstadt
NaHCO ₃	Merk, Darmstadt
Natrium- Pyruvat	Merk, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat	Merk, Darmstadt
Nonidet P40	Sigma, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
Phosphostop Phosphatase Inhibitor	Roche, Mannheim
PI3Kγ-Inhibitor AS605240	Selleckchem, Houston, Texas, USA
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau-Färbung	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
QuantiTect Rev. Transcription Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Saccharose	Merk, Darmstadt
SBE	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific, Rockford, Illinois,USA
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific, Rockford, Illinois,USA

Taurin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Thermo, Waltham, Massachusetts
Terminale Transferase	NEB, Frankfurt am Main
TGF- β_1	Sigma, Taufkirchen
Transferpuffer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA
Tris /HCl pH 7,9	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 0,3%	Merk, Darmstadt
Tween	AppliChem, Darmstadt

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Artikelnummer	Bezugsquelle
Vinculin	V9131	Sigma, St. Louis, Missouri
GAPDH	2118	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
P-SMAD 2	#3108S	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
SMAD 2	#3103S	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
anti-mouse IgG	7076S	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
anti-rabbit IgG	7074S	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 DNA-Elektrophorese

Ladepuffer

10x TAE-Puffer	x ml
Glycerin	50% (wt/vol)
Ladepuffer	1,0% (wt/vol)
Xylencyanol	1,0% (wt/vol)

10x TAE-Puffer

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

Marker

100 Base Pair DNA-Ladder	0,5 µl
Bromphenolblau	1 µl
1xTAE-Puffer	8,5 µl

2.1.4.2 Kardiomyozytenpräparation**M199 / HEPES Stammlösung:**

2 Pakete M199

Ad 10l Aqua dest.

pH 7,4

CCT-Medium:

M199/HEPES- Stammlösung	36 g
Kreatin	5 mM
Carnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Cytosin – β – Arabinofuranosid	10 µM

Perfusionsmedium:

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
Glukose	11,0 mM

Vorplattiermedium für Mauskardiomyozyten

CCT-Medium	x ml
Penicillin / Streptomycin	2 %
Laminin 0,5 mg / ml	10 µl

Ausplattiermedium für Mauskardiomyozyten

Zappelpuffer pH 7,4	x ml
Penicillin / Streptomycin	2 %

Für 1l Zappelpuffer Maus pH 7,4

NaCl	118 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
KCl	4,7 mM
Glukose	5,0 mM
MgSO ₄	0,8 mM
HEPES	10,0 mM
CaCl ₂	2,5 mM
Natrium- Pyruvat	1,9 mM

Vorplattiermedium für Rattenkardiomyozyten

CCT-Medium	x ml
Penicillin / Streptomycin	2 %
FCS	4 %

Ausplattiermedium für Rattenkardiomyozyten

CCT- Medium	x ml
Penicillin / Streptomycin	2%

10x PBS

KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O	8,1 mM

2.1.4.3 EMSA**1x Schwellungspuffer**

Tris / HCl pH 7,9	10 mM / 606 mg
KCl	10 mM / 373 mg
MgCl ₂	1 mM / 102 mg
DTT frisch	1 mM
H ₂ O	ad 500 ml

1x Homogenisierungspuffer

Tris / HCl pH 7,9	10 mM / 606 mg
Saccharose	300 mM / 51,3 g
MgCl ₂	1,5 mM / 152,5 mg
Triton X-100	0,3 % / 1,5 ml
DTT	1 mM
H ₂ O	ad 500 ml

10x Storage Puffer

Hepes pH 7,5	10 mM / 238 mg
KCl	50 mM / 373 mg
NaCl	300 mM / 1,75 g
EDTA	1 mM / 37 mg
Glycerol (100%)	20 % / 20 ml
DTT	1 mM
PMSF	1 mM

H₂O ad 100 ml

Acrylamid / Bisacrylamid 40 % (80/1)

Acrylamid 39,5 g

Bisacrylamid 0,5 g

H₂O ad 100 ml

5x TBE pH 8,3

Tris 53,9 g

Borsäure 27,5 g

EDTA 3,72 g

H₂O ad 1000 ml

TXN-Puffer

KCl 4,4 g

Tris 2,4 g

MgCl₂ 21 g

DTT 0,46 g

0,2 mM PMSF 2 ml

Glycerin (87%) 110 ml

H₂O ad 1 l

2.1.4.4 Proteinnachweis

4x Lysis Puffer

Complete Mini Roche, Ref.:05892970001 2 Tabletten
(enthält Protease Inhibitoren)

Phosphostop Roche, Ref.: 049068415001 2 Tabletten
(enthält Phosphatase Inhibitoren)

10x Cell Lysis Buffer 1386 µl

Wasser 2079 µl

10x TBS

Tris	24,2 g
NaCl	80 ml
HCl	bis pH-Wert auf 7,6
ad H ₂ O	1l

0,1 % TBS-Tween-Lösung

10x TBS	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween	1,0 ml

200 ml 6% Magermilchpulver-Lösung

Magermilchpulver	12 g
10x TBS	20 ml
ad H ₂ O	100 ml

500 ml 5% BSA-Lösung

BSA	25 g
10x TBS	50 ml
ad H ₂ O	500 ml

1x MOPS-Puffer

20x MOPS Running Buffer	50 ml
Ad. H ₂ O	1,0 l

1x Transferpuffer

Methanol	100 ml
20x Transfer Puffer	50 ml
ad H ₂ O	1 l

Erstantikörper-Lösungen

Vinculin:

5 % BSA-Lösung	10 ml
Mouse-anti-Vinculin-Antikörper	10 µl

GAPDH:

5 % BSA-Lösung	10 ml
rabbit-anti-GAPDH-Antikörper	10 µl

P-SMAD2:

5 % BSA-Lösung	10 ml
rabbit-anti-P-SMAD 2-Antikörper	10 µl

SMAD2:

5 % BSA-Lösung	10 ml
Mouse-anti-SMAD 2-Antikörper	10 µl

Zweitantikörper-Lösungen

Vinculin:

6 % Milchpulver-Lösung	10 ml
Anti-mouse-HRP-Antikörper	2 µl

GAPDH:

6 % Milchpulver-Lösung	10 ml
Anti-rabbit-HRP-Antikörper	2 µl

P-SMAD2:

5 % BSA-Lösung	10 ml
Anti-rabbit-HRP-Antikörper	2 µl

SMAD2:

6 % Milchpulver-Lösung	10 ml
Anti-mouse-HRP-Antikörper	2 µl

2.1.4.5 Weitere Puffer und Lösungen

RIPA-Stocklösung

Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P40	1 % (wt/vol)
Deoxycholat	0,5 % (wt/vol)
Natrium-Dodecylsulfat	0,1 % (wt/vol)

RIPA-Puffer

Ripa-Stocklösung	400 µl
PMSF	4 µl
EDTA	2 µl
Pepstatin	0,5 µl
Glycerolphosphat	40 µl
Benzonase	2 µl
MgCl ₂	1,6 µl

2.1.5 Geräte und Laborbedarf

2.1.5.1 Kardiomyozytenpräparation

Name	Bezugsquelle
Absaugung	IBS Integra Biosciences, Biebertal
Abzug	Köttermann GmbH, Uetze
Allegra 21 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Bauchdeckenschere	Äskulap, Tuttlingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau

MCILWAIN TISSUE CHOPPER Loughborough 0,7mm Model TC752	Campden Instruments LTD, Leics. England
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylongase	NeoLab, Heidelberg
Peristaltikpumpe	Ismatec, Cole Parmer GmbH, Wertheim
Pinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Präparierschere	Äskulap, Tuttlingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermostat	LAUDA, Königshofen
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

2.1.5.2 EMSA

Name	Bezugsquelle
Absauger Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Biebertal
Fluoreszenz-Scanner Molecular Imager FX	BioRad, Hercules, Kalifornien USA
Gelkammer Hoefer SE600	Amersham PowerSupply, Freiburg
Homogenisator	VWR International, Wien
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Tecan Plate Reader	Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Techne Cyclogen, Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire UK

2.1.5.3 Proteinnachweis

Name	Bezugsquelle
Blotkammer	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
ChemiSMART	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reichskirchen
Hamiltonspritze	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Netzgerät	Invitrogen, Carlsbad, California, USA

Nitrozellulose-Membran	Millipore, Eschborn
PH-Meter	WTW, Weilheim
Techne Dri-Block® DB.2D	Techne AG, Burkhardtsdorf
USA	Bohemia, New York, USA
Vortexer	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Zentrifuge	Beckmann Coulter, Brea, California

2.1.5.4 sonstige Geräte

Name	Bezugsquelle
Absauger Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Biebertal
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Shinjuku, Japan
Geräteanordnung zur Kontraktionsmessung	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schaukler	Heidolph, Kelheim
Tecan Plate Reader	Männedorf, Schweiz
Microfuge 18 Zentrifuge	Beckmann Coulter, Brea, California

2.1.5.5 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
50 ml Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Anlage zur Wasserdemineralisierung	Millipore, Schwalbach
Kultivierungsschalen: Falcon 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten: Falcon 3910, 353047	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.5.6 Software

Name	Bezugsquelle
Cell	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
ChemiDocSystem	Bio-Rad, München
Microsoft Excel	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Word	Microsoft Corp., Redmont, USA
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld
SPSS	SPSS GmbH Software, München

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Maus mittels Ohrstanzenbiopsie

Für die Genotypisierung wurde das bei der Markierung der Tiere, durch das Stanzen der Ohren, anfallende Material verwendet.

2.2.1.1 DNA-Extraktion

Um die Gewebeproben zu lysieren wurde das Direct-PCR-Lysis-Reagent von Qiagen mit der Proteinkinase K (400 µg/ml) von Applichem versetzt. Die Lyse fand im Thermocycler für fünf Stunden bei 55 °C statt. Anschließend wurde die Proteinkinase K durch einen 45-minütigen Durchlauf bei 85 °C gestoppt. Das Lysat wurde durch den Vortexer durchmischt und anschließend mit 14000 rpm (Beckman Coulter F241.5P) für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA als Inhalt wurde entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Ziel der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes mittels einer Polymerase. Das Prinzip der PCR beruht auf einem sich immer wiederholendem Zyklus, der aus den Teilschritten Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Bei der Denaturierung wird die Doppelstrang-DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C gespalten. Da die Primer sich bei

unterschiedlichen Temperaturen an die DNA lagern, folgt eine Primer-spezifische Temperatursenkung. Während der anschließenden Elongationsphase wird die Temperatur erneut auf 72 °C erhöht. Daher wird eine hitzestabile Polymerase benötigt, die bei dieser Temperatur den DNA-Strang durch einzelne Nukleotide komplementieren kann, bis ein Duplikat des vorherigen DNA-Abschnittes entstanden ist. Aufgrund der Tatsache, dass auch die neu entstandenen DNA-Stränge erneut gespalten werden und den Zyklus durchlaufen, verläuft die Synthese nach einem exponentiellen Wachstum, welches erst nach einer bestimmten Zyklenzahl durch den Verbrauch der Primer in eine Plateauphase übergeht.

2.2.1.3 Durchführung der PCR

Für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde folgender Ansatz erstellt:

10x PCR-Puffer	2,50 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
Primer (100µM)	2,50 µl
dNTPs (10mM)	0,50 µl
Taq-Polymerase (1500units)	0,10 µl
Aqua dest.	14,15 µl
DNA	2,00 µl

Es wurden folgende Primer verwendet:

NeopA CTG CTC TTT ACT GAA GGC TC
PI3UP GGA GAA CTA TGA ACA ACC GG
PI3DN CAA CTT CCA GTA ATG CAG GC

Für den beschriebenen Reaktionsansatz wurde die vorher extrahierte DNA verwendet. Zusätzlich erfolgte eine Negativkontrolle mit Aqua bidest, um eine Verunreinigung des Reaktionsansatzes durch DNA auszuschließen. Es wurden Proben von transgenen Tieren

und von Tieren des Wildtyps (WT) zur Kontrolle verwendet. Die PCR wurde im Thermo-Cycler durchgeführt und die Proben anschließend auf 10 °C gekühlt. Im Thermo-Cycler von der Firma Bio-Rad wurden folgende Zyklen durchlaufen:

Zyklus 1 (1x)	95 °C, 3 Minuten
Zyklus 2 (40x)	94 °C, 30 Sekunden (Denaturierung)
	60 °C, 30 Sekunden (Annealing)
	72 °C, 30 Sekunden (Amplifikation)
Zyklus 3 (1x)	72 °C, 5 Minuten

2.2.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einem zweiprozentigem Agarose-Gel durchgeführt in dem die Proben aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Zusammensetzung des Agarose-Gels:

Agarose	1,5 g
1x TAE-Puffer	75,0 ml
GelRed®	3,8 µl

Für eine gleichmäßige Homogenisierung wurde die Agarose zusammen mit dem 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und die Lösung erst anschließend mit dem Farbstoff versetzt. Das Gemisch wurde in eine Gelkammer überführt und ein Kamm, der die späteren Taschen formt, in dem noch flüssigen Gel platziert. Nach der Polymerisation wurde das Gel in der Elektrophoresekammer platziert und diese mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit 20 µl der durch die PCR hergestellten Proben und 1 µl Ladepuffer geladen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem DNA-Längenmarker bestückt. Es folgte die Auftrennung der Proben durch das Anlegen einer Stromstärke von 90 mA für 30 Minuten. Die PCR-Proben konnten anschließend durch den fluoreszierenden Farbstoff GelRed® unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.2 Real-time Reverse-Transkriptase-PCR bei der Maus

2.2.2.1 Isolierung der RNA

Die Ribonukleinsäuren (RNA) wurden aus Gesamtherzen isoliert, welche nach Entnahme bei -80 °C gelagert wurden. Die Tötung der Ratten sowie die Entnahme der Herzen erfolgte wie in dem Kapitel 2.2.3.2 beschrieben. Nach dem Abtrennen der Gefäße möglichst proximal des Herzens wurde das Herz in ein Eppendorf-Gefäß überführt, welches in flüssigen Stickstoff gegeben wurde. Die Herzen konnten daraufhin bei -80 °C gelagert werden.

Für die Isolierung der RNA wurden die Herzen in ein Homogenisator-Röhrchen gegeben und ein Milliliter Trizol hinzugefügt. Unter optischer Kontrolle erfolgte die Homogenisierung. Die Proteine wurden denaturiert und 100 µl Chloroform zu der Suspension gegeben. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm (Beckman Coulter TA-15-1.5), woraufhin der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die untere Phase verworfen wurde. Dem RNA-haltigen Überstand wurden 450 µl Isopropanol hinzugefügt und die Suspension 25 Minuten bei -20 °C gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 15000 rpm, Beckman Coulter TA-15-1.5) stellte sich die RNA als Pellet dar. Diesem wurde zur Reinigung 1 ml 70%iges Ethanol hinzugefügt. Im Anschluss wurde es erneut zentrifugiert, das überstehende Ethanol verworfen und das Pellet getrocknet. Es folgte eine Resuspension in 100 µl RNase-freiem DEPC-Wasser. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Während des vollständigen Versuchsablaufs wurden alle Proben und Reagenzien auf Eis gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet. Vor Beginn der Messung erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes mittels Aqua bidest. Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurden 1,5 µl der Proben auf eine Messsonde aufgetragen. Die Messung wurde in einem Wellenlängenspektrum von 120 nm bis 750 nm durchgeführt und eine Messkurve sowie die RNA-Konzentration in µg/µl durch das Gerät berechnet.

2.2.2.3 DNase-Behandlung und Erstellen der cDNA

Für die weitere Analyse der Proben war es nötig, zum einen die übrige DNA zu beseitigen und zum andern den RNA-Strang in einen komplementären DNA-Strang zu überführen. Diese beiden Schritte konnten durch die Verwendung des QuantiTect Reverse-Transkription-Kit® gleichzeitig durchgeführt werden. Die dafür benötigten Eppendorf Gefäße wurden durch den UV-Starterlinker vorbehandelt. Es wurde anschließend der cDNA-Ansatz in die Gefäße pipettiert, welcher für fünf Minuten bei 42 °C im Thermo-Cycler inkubiert.

cDNA-Ansatz:

RNA-Probe 1 µg	x µl
cDNA-Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Aqua bidest.	12-x µl

Zu jeder Probe wurden 6 µl eines Reaktionsmix sowie 14 µl der Template-RNA hinzugefügt und die Proben für die cDNA-Synthese bei 42 °C für 15 Minuten und anschließend für einen dreiminütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C inkubiert.

Reaktionsmix pro Probe (nach Rev. Transkriptase Kit, Qiagen, 205313)

Reverse Transkriptase	1 µl
RT-Puffer	4 µl
RT-Primer-Mix	1 µl

Die Proben wurden bei -80 °C gelagert und vor der Verwendung für die PCR 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

2.2.2.4 Durchführung der Real-Time RT-PCR

Die Durchführung der Real-Time RT-PCR erfolgte mit den cDNA-Proben, welche in diesem Fall als Template dienten. Die Reaktionsgefäße wurden vor der Verwendung mit UV-Licht bestrahlt. Für die Real-Time RT-PCR wurde folgende Ansatz erstellt:

qPCR SYBR Fluorescein Mix	10 µl
je Primer (100 nM)	0,6 µl
Aqua bidest.	6.8 µl
cDNA	2,0 µl

Es wurden folgende Primer verwendet:

SMAD7 Ratte: AGAGGCTGTGTTGCTGTG (forward)
(AF042499)

CATCGGGTATCTGGAGTAAGG (reverse)

Für die Durchführung wurde ein Realtime Thermo-Cycler der Firma Bio-Rad verwendet. Das Programm wurde auf die Annealing-Temperatur der SMAD7 Primer angepasst, welche 64 °C beträgt. Es wurden folgende Zyklen durchlaufen:

Zyklus 1 (1x)	95 °C, 15 Minuten
Zyklus 2 (45x)	94 °C, 30 Sekunden (Denaturierung)
	64°C, 30 Sekunden (Annealing)
	72 °C, 30 Sekunden (Amplifikation)
Zyklus 3 (1x)	Schmelzkurve

2.2.2.5 Prinzip der Real-Time RT-PCR

Bei der Real-Time RT-PCR ist es neben der Amplifikation auch möglich eine Quantifizierung der Proben vorzunehmen. Dies wird durch eine Fluoreszenzmessung erreicht, die zeitlich mit dem PCR-Zyklus abläuft. Jeder Zyklus besteht aus den drei Teilschritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch eine Temperaturerhöhung gespalten, sodass sie als Einzelstrang vorliegt. Die Annealing-Phase beschreibt eine Anlagerung der spezifischen Primer an die Einzelstrang-DNA. In der darauffolgenden Elongation wird der

Einzelstrang durch die DNA-Polymerase zu einem semikonservativen Doppelstrang ergänzt. So verdoppelt sich das genetische Material nach jedem Zyklus, bis die Primer aufgebraucht sind.

Bei der Real-Time RT-PCR wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der sich an die doppelsträngige DNA anlagert. Die Fluoreszenz verhält sich damit proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Sie wird nach jedem Zyklus gemessen.

Da sich der Farbstoff sowohl an die spezifischen als auch an unspezifische DNA-Abschnitte anlagert, wird nach der Durchführung der gewünschten Anzahl an Zyklen die Temperatur schrittweise von 50 °C auf 98 °C erhöht. Währenddessen wird die Fluoreszenz detektiert und eine Schmelzkurve aufgezeichnet. Jede Sequenz besitzt eine spezifische Schmelztemperatur. Ist diese für die spezifische Sequenz erreicht kommt es zur Denaturierung der Gesamtheit der Amplifikate und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. In der Schmelzkurve stellt sich dies als Peak dar.

2.2.3 Isolierung adulter Kardiomyozyten

2.2.3.1 Maus

Am Vortag wurden auf sechs Kultivierungsschalen jeweils 1 ml Vorplattiermedium und 10 µl Laminin (1mg/ml) gegeben. Diese inkubierten bis zum Ausplattieren in einen Brutschrank bei 37 °C mit 5,5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

Vorbereitend zirkulierten am Präparationstag für ca. 5 min 20 ml Perfusionsmedium in der Perfusionsanlage. Es handelt sich dabei um eine Eigenkonstruktion des Physiologischen Institutes, Fachbereich Medizin, der JLU Gießen. Nachdem diese abgelassen wurden, wurde die Anlage luftblasenfrei mit 45 ml Perfusionsmedium befüllt. Das Medium und die Anlage hatten 37 °C.

Die Maus wurde in einen Exsikkator unter einem Abzug überführt. Im Inneren befand sich eine Watte, die mit 0,16 ml von fünfprozentigem Isofluran getränkt wurde. Bei vollständiger Narkose erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Mit einer Schere wurde eine Thorakotomie durchgeführt, das Herz-Lungen-Paket entnommen und das Herz nach Entfernung der Lunge in eine Schale mit 4 °C kaltem 0,9%igem NaCl gegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta dargestellt und proximal des Aortenbogens gekürzt. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurde eine Spritzenkanüle bis auf Höhe der

Herzohren in die Aortenöffnung eingeführt und mithilfe einer sterilen Ligatur fixiert. Um die Perfusion zu testen, wurde das Herz durch Betätigung der Spritze durchspült. Anschließend erfolgte die Befestigung der Kanüle mit dem Herzen an der Perfusionsanlage sowie die Öffnung des Durchflussventils.

Zur Reinigung der Gefäße von Blutresten durchliefen zunächst 5 ml das Herz im offenen Kreislauf. Die Flüssigkeit wurde verworfen und der Kreislauf geschlossen. Es wurden währenddessen 5 ml des Perfusionsmediums vorgewärmt und mit 20 mg Collagenase (358 U/ mg) und 12,5 µl CaCl₂ (100mM) versetzt und anschließend dem geschlossenen Kreislauf zugeführt. Der Auffangbehälter wurde mit Parafilm verschlossen, die Perfusionsgeschwindigkeit auf ca. einen Tropfen pro Sekunde eingestellt und das Herz 25 Minuten perfundiert. Im Anschluss an die Perfusion erfolgte die Abtrennung der Aorta und Vorhöfe sowie die Eröffnung des Herzens durch zwei Schnitte. Mit der Außenseite in Richtung der Klinge wurde es auf der Teflonscheibe des Choppers positioniert und durchlief diesen einmal längs und einmal quer. Anschließend folgte eine manuelle Zerkleinerung mittels Skalpell. Der entstandene Zellbrei wurde in ein Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 50 Milliliter überführt, in dem sich 5 ml des mit Collagenase versetzten Perfusionsmediums befanden. Es startete der Nachverdau für 5 Minuten bei 37 °C im Thermostat. Währenddessen wurde die Zellsuspension mehrmals in einer Pipette aufgenommen und abgegeben.

Der Zellbrei wurde anschließend in einem Büchner Trichter durch eine Nylongaze gefiltert, in einem 10 ml Röhrchen aufgefangen und für eine Minute bei 400 rpm (Beckman Coulter TS-5.1-500) zentrifugiert. Der Überstand in dem sich u.a. Endothelzellen befanden wurde entnommen. Für die verbliebenen Zellen wurde 8 ml Perfusionsmedium mit 10 µl CaCl₂ (100 mM) versetzt, sodass sich eine Lösung mit 125 µM ergab. Das Pellet wurde in 2 ml gelöst und anschließend eine Minute bei 300 rpm (Beckman Coulter TS-5.1-500) zentrifugiert. Es folgten drei weitere Zentrifugationsschritte mit jeweils 2 ml Lösung wobei der Anteil des Calciumchlorids auf 250 µM, 500 µM und 1000 µM erhöht wurden. Nach dem letzten Schritt wurde das Pellet unter der Sicherheitswerkbank im Ausplattiermedium resuspendiert, welches auf 37 °C erwärmt war. Das Vorplattiermedium wurde aus den vorbereiteten Schalen entfernt. Je nach geplanten Versuchsaufbau, wurde die Zellsuspension auf sechs vorbereitete Schalen mit einem Milliliter Fassungsvermögen gegeben, oder in der 24 Well Platte verteilt. Anschließend inkubierten die Zellen für 45 Minuten bei 37 °C im

Brutschrank mit 5,5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach 45 Minuten Inkubation wurde das Medium durch das auf 37°C erwärmte Waschmedium erneuert und damit nicht angeheftete Zellen aus den Schalen entfernt.

Ausgehend hiervon wurden zum einen Akutversuche in Form der Hoe-Zählung oder der Zellkontraktionsmessung durchgeführt. Zum anderen wurden drei der sechs Schalen mit 3 µl TGF-β₁ stimuliert nach zwei weiteren Stunden im Brutschrank mit 37 °C und 5,5 % CO₂ geerntet. Mit Hilfe eines Schabers und einer 1x PBS-Lösung wurde die Zellen aus den Schalen in ein Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur drei Minuten mit 3000 rpm (Beckman Coulter F241.5P) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in einem Milliliter 1x PBS resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm (Beckman Coulter F241.5P). Der Überstand wurde ebenfalls entfernt und das Pellet, welches die isolierten Kardiomyozyten darstellte, bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.2 Ratte

Bereits am Vortag wurden in die gewünschte Anzahl an Schalen zwei Milliliter des Vorplattiermediums gegeben. Sie inkubierten über Nacht in einem Brutschrank ohne CO₂ bei 37 °C. Am Präparationstag wurde vorbereitend das System mit Aqua dest. gespült und das Perfusionsmedium auf 37 °C erwärmt. Die Anlage wurde mit 80 ml des Perfusionsmediums luftblasenfrei befüllt. Ebenfalls wird die Kollagenase-Lösung angesetzt.

Die Ratte wurde in einem Exsikkator unter dem Abzug mit 4-5% Isofluran narkotisiert. Bei flacher Atmung und ausbleibendem Lidreflex erfolgte die zervikale Dislokation. Mit einer Schere wurde die Thorakotomie durchgeführt und das Herz-Lungen-Paket entnommen. In einer Petrischale mit NaCl wurde die Feinpräparation durchgeführt und die Lunge sowie der Thymus, die Trachea und der Ösophagus entfernt. Die Aorta wurde distal der ersten abgehenden Gefäße gekürzt und das Aortenlumen über die Kanüle der Perfusionsanlage gestülpt und fixiert. Um eine Perfusion über die Koronargefäße zu gewährleisten, wurde darauf geachtet die Herzklappen nicht zu beschädigen. Es folgte die Reperfusion. Die ersten 40 ml, die das Herz durchlaufen, wurden verworfen und das Perfusionsmedium daraufhin mit einer Kollagenase-Lösung ergänzt. Dafür werden 10 ml des Perfusionsmediums durch 12,5 µl CaCl₂ (100 µM) ergänzt und je nach Charge und

Hersteller die Kollagenase hinzugefügt. Die Lösung wurde in den Perfusionskreislauf gegeben. Die Reperfusionzeit betrug je nach Kollagenase-Charge 25 bis 30 Minuten.

Anschließend an die Perfusion wurden die Vorhöfe sowie die Aorta mit einer Präparierschere vom restlichen Herzen getrennt. Durch zwei Schnitte wurde das Herz eröffnet und mit der Außenseite nach oben auf die Teflonscheibe im Chopper gelegt. Das Herz durchlief den Chopper einmal in Längs- und einmal in Querrichtung. Der so entstandene Zellbrei wurde in ein Röhrchen überführt und für den 5-minütigen Nachverdau durch 30 ml der Perfusionslösung aus der Anlage ergänzt. Währenddessen wurde die Suspension fünf bis zehn Mal vorsichtig mit der Pinzette aufgezogen, um eine Lyse der Zellen aus dem Verband zu provozieren. Nach Beendigung des Nachverdaus wurde ein Büchnertrichter mit Nylongase mit einer Maschenweite von 200 μm ausgelegt, der Zellbrei hindurchfiltriert und die Suspension anschließend in ein Röhrchen überführt. Dieses wurde anschließend für drei Minuten bei zentrifugiert (400 rpm, Beckman Coulter TS-5.1-500). Der Überstand wurde verworfen. In 50 ml des Perfusionsmediums wurden 100 μl CaCl_2 (100 μM) hinzugefügt und das Pellet in 10 ml der Lösung gelöst. Es folgte eine erneute Zentrifugation für zwei Minuten bei 400 rpm (Beckman Coulter TS-5.1-500). Der Überstand wurde erneut verworfen. Nun wurden weitere Lösungen angesetzt aus 50 ml Perfusionsmedium und 200 μl bzw. 500 μl CaCl_2 . Das Pellet wurde zunächst in 5 ml des ersten Ansatzes gelöst und anschließend wurden die Zellen in 50 ml der höher konzentrierten Lösung geschichtet. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 300 rpm (Beckman Coulter TS-5.1-500) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 20 ml des Ausplattiermediums aufgenommen. Aus den vorbereiteten Schalen wurde das Vorplattiermedium abgesaugt und in jede Schale 2 ml der Zellsuspension gegeben. Die Schalen wurden für die 90-minütige Inkubation in einem Brutschrank bei 37 °C platziert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium dreimal erneuert und im Anschluss mit 2 μl der Inhibitoren stimuliert. Dabei handelte es sich um den selektiven PI3K γ -Inhibitor AS605240, der in der Stocklösung die Konzentrationen von 100 μM und 1 mM aufwies. Es ergab sich so eine Konzentration von 1 μM bzw. 100 nM. Nach einer erneuten Inkubation für 30 Minuten folgte die Stimulation mit 1 ng / ml TGF- β_1 . Die Schalen wurden wieder im Brutschrank positioniert und je nach Versuchsaufbau am nächsten Tag für Kontraktionsmessungen verwendet oder nach 120 Minuten geerntet. Für die Ernte wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers und 1 ml PBS vom Schalenboden entfernt. Durch eine Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm

(Beckman Coulter F241.5P) setzten sich die Zellen vom PBS und dem restlichen Medium ab. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet bei -80 °C bis zur Kernextraktion tiefgefroren. Die Kern- und Zytosolextrakte wurden für ein EMSA und Western Blots verwendet.

2.2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.2.4.1 Einführung in die Methode

Mit Hilfe des EMSAs ist es möglich Proteine zu detektieren, die eine Bindung mit DNA-Abschnitten eingehen. Dazu werden verschiedene Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, die spezifisch an Proteine im Probenmaterial binden und anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dabei durchlaufen diejenigen DNA-Abschnitte, die keine Verbindung mit Proteinen eingehen das elektrische Feld schneller als jene, die an Proteine gebunden sind. Über einen Fluoreszenz-Molecular-Imager ist es möglich, die DNA-Abschnitte sichtbar zu machen.

2.2.4.2 Kernextraktion

Nach der Isolation der Kardiomyozyten wurden die Pellets bei -80 °C tiefgefroren. Das Ziel der Kernextraktion ist es, die Bestandteile des Nukleus von den restlichen Zellbestandteilen zu isolieren. Dafür wurden die verschiedenen Puffer angesetzt. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um die isolierten Kardiomyozyten, die wie in Kapitel 2.1.5.1 beschrieben, gewonnen und stimuliert wurden und anschließend bei -80 °C tiefgefroren wurden. Nach dem Auftauen wurden 200 µl Schwellungspuffer zu jeder Probe gegeben. Die Pellets wurden resuspendiert und nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, zehn Minuten bei 4 °C und 900 rpm (Beckman Coulter TA-15-1.5) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 200 µl des angesetzten Homogenisierungspuffers zu jeder Probe gegeben. Die Zellsuspension wurde in einen zylindrischen Homogenisator überführt und mittels eines Pistills manuell durch ca. 15 Stöße über die gesamte Länge, kombiniert mit leichten Drehbewegungen, homogenisiert. Der gesamte Inhalt wurde anschließend wieder in ein Eppendorf Gefäß überführt und erneut bei 4 °C und 900 rpm (Beckman Coulter TA-15-1.5) für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher dem Zytosol entspricht, wurde entnommen. Durch die Zugabe von 20 µl Storage Puffer wurde das Pellet erneut gelöst. Es folgte eine

Inkubation auf Eis für 30 Minuten und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm (Beckman Coulter TA-15-1.5) über fünf Minuten. Der entstandene Überstand entspricht den Kernextrakten, das Pellet wurde verworfen. Die Kernextrakte und das Zytosol wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Mithilfe des Lowry-Tests ist es möglich eine quantitative Proteinbestimmung durchzuführen. Dem Verfahren liegen zwei chemische Reaktionen zugrunde. Bei der ersten Reaktion binden Kupfer II-Ionen an die Peptidbindungen der Proteine und werden so zu Kupfer I-Ionen reduziert. Diese wiederum reduzieren Anteile des Folin-Reagenzes (Reagenz B) zu Heteropolymolybdenblau. Abhängig von dem quantitativen Proteinanteil und damit von der Menge der Peptidbindungen kommt es so zu unterschiedlich starken Blaufärbungen. Bei der nachfolgenden fotometrischen Messung wird die Absorption eines monochromatischen Lichtstrahls bekannter Wellenlänge, bei Durchtritt durch die Wells gemessen.

Für die Messung der Proteinmenge in den Proben wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen angesetzt. Sie diente bei der nachfolgenden Messung als Eichkurve. Es wurde BSA mit Hilfe von Wasser verdünnt. Dabei ergab sich eine Standardreihe mit folgenden Zusammensetzung:

Tabelle 3: Ansatz BSA Standardreihe

	µl Aqua dest	µl BSA Stock 2mg/ml	Konzentration
Standard 1	100	-	0,00 mg/ml
Standard 2	90	10	0,20 mg/ml
Standard 3	80	20	0,40 mg/ml
Standard 4	70	30	0,60 mg/ml
Standard 5	60	40	0,80 mg/ml
Standard 6	50	50	1,0 mg/ml
Standard 7	40	60	1,2 mg/ml
Standard 8	30	70	1,4 mg/ml

Die angesetzte Standardreihe wurden mithilfe eines Vortexers gemischt und jeweils 5 µl auf die 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen. Um Messfehler zu minimieren, führte man sowohl bei der Standardreihe als auch bei den Proben eine Doppelbestimmung durch. Je nach zu erwartender Proteinmenge ist eine Variation verschiedener Verdünnungsgrade der Proben möglich. Da im Fall der Maus-Kardiomyozyten geringe Mengen zu erwarten waren, wurden 5 µl unverdünnt aufgetragen.

Für die erste chemische Reaktion des Lowry-Assays wurde das Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartratlösung; Bio-Rad Ref.: 5000113) durch das Reagenz S (Tensidlösung; Bio-Rad Ref.: 5000115) ergänzt und jeweils 25 µl zu der Standardreihe und den Proben hinzugefügt. Anschließend wurden 200 µl der Reagenz B (Folin Reagenz; Bio-Rad Ref.:5000114) in die Wells pipettiert. Bereits nach kurzer Inkubation wurde die Blaufärbung sichtbar. Diese wurde im Mikrotiterplatten-Photometer fotometrisch detektiert. Anhand der vorhandenen Eichkurve ließen sich die Proteine quantitativ bestimmen.

2.2.4.4 Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide

Es wurden gleiche Volumina von forward- und reverse-Oligos (100 µM) zusammen pipettiert. Diese inkubierten acht Minuten bei 98 °C und kühlten auf Raumtemperatur ab. Der Ansatz wurde daraufhin in einem Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt.

Um die DNA-Abschnitte, die das Gel durchlaufen, sichtbar zu machen und deren Menge bestimmen zu können, müssen diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dafür wurde folgender Ansatz erstellt:

Oligonukleotide (SBE)	20 ng
10x NEBuffer	5 µl
2,5 mM CoCl ₂	5 µl
Cy3-dCTP (10mM)	2,5 µl
Terminale Transferase (20 U / µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Dieser Ansatz inkubierte für 15 Minuten bei 37 °C. Es folgte ein Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,2 M EDTA mit einem pH-Wert von 8,0. Es handelte sich um das Oligonukleotid SBE mit folgender Sequenz:

5'-GTACATTGTCA

GTCTAGACATACT-3'

2.2.4.5 Probenvorbereitung

Das Retardation Assay wurde mit Kernextrakten durchgeführt. Vorbereitend diente die Lowry der Extrakte dazu, Probenmengen mit gleichem Proteingehalt zu bestimmen. Die Mengen wurden mit TXN-Puffer auf 10 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 7,5 µl Mix 1 pro Probe ergänzt. Dabei handelte es sich um 7 µl TXN-Puffer und 0,5 µl dI/ dC. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 30 °C im Thermocycler. Anschließend wurden 2,5 µl des Mix 2 hinzugefügt, welcher 1 µl des markierten Oligonukleotides und 1,5 µl TXN-Puffer enthält und eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei 30 °C im Thermocycler durchgeführt, währenddessen die Proteine mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden eine Verbindung eingehen sollten.

2.2.4.6 Herstellung des nativen Gels

Die Herstellung des Gels erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die zuvor mit Alkohol gereinigt wurden. Zwischen den Glasplatten wurde an beiden Rändern jeweils ein Spacer positioniert, der bündig mit den Platten abschließen sollte, sodass ein Hohlraum zwischen den Glasplatten entstand. Die Platten und Spacer wurden durch zwei Schraubzwingen an den Rändern fixiert und die untere Öffnung durch eine Lage Parafilm abgeschlossen. Zum Gießen wurde die Vorrichtung in einer Halterung fixiert.

Die Acylamidlösung wurde nach dem untenstehenden Schema unter ständigem Rühren hergestellt und umgehend blasenfrei zwischen die Platten gegossen. An der oberen Öffnung wurde ein Kamm als Platzhalter zum Formen der Taschen eingebracht. Nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur war die Polymerisation des nativen Gels abgeschlossen und der Kamm und der Laborfilm konnte entfernt werden. Das Gel und der anschließend verwendete 5x TBE-Puffer sollten vor Beginn der Elektrophorese gut gekühlt werden.

Zusammensetzung des Acrylamidgels:

AA/BA 40% 80/1	4 ml
5x TBE-Puffer	4 ml
Glycerin	1 ml
H ₂ O ad	40 ml
TEMED	34 µl
APS 10%	200 µl

2.2.4.7 Durchführung und Auswertung des Assays

Das Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer gesetzt und diese mit 5x TBS befüllt. Dabei bildete das Gel die Verbindung zwischen der Anode und Kathode. Das Gel und die Taschen sollten vollständig und luftblasenfrei von dem Puffer umgeben sein, um einen ungehinderten Stromfluss zu ermöglichen. Um diese Bedingungen zu garantieren, wurden die Taschen mit dem TBS durchspült. Es folgte ein 30-minütiger Vorlauf bei 4 °C und 60 V. Anschließend wurden die Taschen nochmals mit dem kalten Puffer gespült. Die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen gegeben und eine zusätzliche Tasche wurde mit einem Marker bestückt, um den Fortschritt des Gellaufs zu kontrollieren. Dieser fand bei 4 °C für ca. 2,5 h bei 150 V statt. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entnommen und die Glasplatten aus der Halterung geschraubt. Die Glasplatte wurde gereinigt und direkt im Anschluss die Fluoreszenzmessung im Fluoreszenzscanner durchgeführt. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff, welcher an die Oligonukleotide gebunden ist, detektiert und als Schwärzung aufgenommen. Das aufgenommene Foto zeigt das gesamte Gel mit dem Verlauf aller Proben. Entscheidend für die Auswertung waren die Banden, welche eine kürzere Laufstrecke zurückgelegt haben. Dieser Shift kommt durch eine erhöhte molekulare Masse zustande, die die gesuchten Proteine aufgrund ihrer Bindung zu den Oligonukleotiden besitzen. Die ungebundenen, leichteren Proteine bilden sich dementsprechend weiter unten im Gel ab. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Quantity One, welches die Signalstärke der gesuchten Banden misst. Diese gibt Aufschluss über die Menge der gesuchten Proteine.

2.2.5 Proteinnachweis

2.2.5.1 Lyse der Zellen

Die Präparation und Isolation der Kardiomyozyten fand, wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben statt. Es folgte danach die Kernextraktion wie in 2.2.4.2 dargelegt. Für den Proteinnachweis wurden ausschließlich Proben des Zytosols verwendet. Da die Proben in einem Homogenisierungspuffer aufgenommen waren, wurden die Proben zunächst mittels Lysis-Puffer gelöst. Es wurden 25 µl des Puffers mit 75 µl der Proben vermischt. Durch mehrmaliges Aufziehen des Ansatzes in einer Einmalspritze lösten sich die Zytosolbestandteile voneinander, bis eine gleichmäßige Suspension entstand. Nun erfolgte die quantitative Proteinbestimmung nach dem Lowry Messverfahren (siehe 2.2.4.3). Mittels dieser Daten wurden die Mengenverhältnisse von Proben und Puffer für die anschließende Gelelektrophorese errechnet bei der 15 µg Protein pro Tasche verwendet wurden.

2.2.5.2 Gelelektrophorese

Ziel der Gelelektrophorese ist es, Proteine verschiedener Größe voneinander zu trennen. Vorbereitend mussten die Proteine denaturiert werden. Die Proben wurden dafür mit einem Puffer versetzt. Dieser setzte sich zusammen aus dem Reducing Agent und dem Sample Buffer, die in einem Verhältnis von 1:5 gemischt waren. Jeder Probe wurden 6 µl des Ansatzes hinzugefügt. Anschließend wurden sie für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Mittels des reduzierenden Puffers bekamen die Proteine negativen Ladungen, die sich gegenseitig abstießen. Gekoppelt mit der Hitze werden die Disulfidbrücken aufgespalten, sodass die Proteine ihre Tertiärstruktur verloren.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt, die mit einem Puffer befüllt wurde und die Kämme entfernt. Durch das Durchspülen der Taschen wurde sichergestellt, dass sich dort keine Luftblasen befanden, die ein Hindernis für den Stromfluss dargestellt hätten. Um den Fortschritt des Gellaufs visuell kontrollieren zu können, wurde die erste Tasche mit ca. 3 µl eines sichtbaren Markers befüllt. Die weiteren Taschen wurden mit den vorbereiteten Proben befüllt. Der Auftrennung der Proteine beginnt für zehn Minuten bei 90 V. Haben die Probenmengen die von den Taschen vorgegebene Menge von 15 µl überschritten, wurden der Gellauf für zehn Minuten gestartet und anschließend die

restliche Menge in die Taschen pipettiert. Danach wurde der Lauf für ca. 40 Minuten bei 200 V fortgesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei der Gelelektrophorese mittels eines elektrischen Feldes, welches die Proteine durchlaufen. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Proteine in Richtung der Anode. Das Gel besitzt eine Porenstruktur. Diese bewirkt, dass kleinere Proteine schneller durch das Gel gelangen als größere. Folglich kommt es zu einer Größenaufspaltung innerhalb des Gels.

2.2.5.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Diese binden an die Proteine und werden über eine Chemilumineszenz-Messung sichtbar gemacht. Voraussetzung dafür ist die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran in einer Blotkammer.

Es wurden sechs Schwämme, zwei Filterpapierstreifen und die Membran auf die Größe des Gels angepasst. Die Schwämme und das Filterpapier wurden in Transferpuffer eingelegt und eingeschlossene Luftblasen entfernt. Die Innenseiten der Blotkammer wurden ebenfalls mit Transferpuffer benetzt. Sie stellten die Anode und Kathode dar. Dann erfolgte die Anordnung der Bestandteile wie folgt: Kathode, drei Schwämme, ein Filterpapier, Gel, Membran, ein Filterpapier, drei Schwämme, Anode. Da Luft einschließen den Stromfluss behindern und einen Transfer unterbrechen würden, wurde nach jeder Schicht etwas Transferpuffer auf die Materialien gegeben. Die Apparatur wurde fest in die Blotkammer gespannt. Die innere Kammer, in der der Transfer stattfindet, wurde mit Transferpuffer gefüllt, die äußere zur Kühlung mit Wasser. Für die Übertragung der Proteine wurde die Kammer ca. zwei Stunden bei 30 V an den Stromkreis angeschlossen. Die negativ geladenen Proteine wanderten währenddessen von dem Gel auf die Membran.

Im Anschluss folgte die Ponceau-Färbung der Membran durch einen Farbstoff, der sich unspezifisch an alle Proteine anlagert und so die Gesamtheit der Banden sichtbar machte. Diese Färbung wurde durch ein Foto dokumentiert. Der mitgelaufene Marker machte es möglich nachzuvollziehen, auf welcher Höhe der Membran Proteine einer definierten Größe ihren Lauf stoppten. Die Banden des Markers wurden markiert und die Membran in drei Teile zerschnitten. Auf jedem der drei Abschnitte befand sich eines der gesuchten

Proteine. Die einzelnen Teile wurden mit dem Namen des Proteins beschriftet, ohne die Banden der zu detektierenden Proteine zu beschädigen. Die Membranabschnitte wurden anschließend wieder entfärbt, indem sie mehrmals in 0,1 % TBS-Tween gewaschen wurden, bis keine Rotfärbung mehr erkennbar war.

2.2.5.4 Immunfärbung

Die Detektion der Proteine beruht auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Bindung. Zunächst bindet ein Antikörper an das gesuchte Protein auf der Membran, das in dem Fall das Antigen darstellt. An diesen bindet wiederum ein zweiter Antikörper, der gegen das den Primärantikörper gerichtet ist. Es ist mit der „horse-radish-peroxidase“ (HRP) konjugiert, sodass er durch eine Chemilumineszenz-Messung detektierbar ist.

Vorbereitend wurden alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert, indem die Membranen eine Stunde lang in einer Blocklösung geschwenkt wurden. Es handelte sich dabei entweder um Milchpulver oder, im Fall von phosphorylierten Proteinen, um BSA, welches in 1x TBS gelöst wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dieser wurde entsprechend der Herstellerangaben in einer Konzentration von 1:1000 in einer Milchpulver-Lösung oder BSA-Lösung angesetzt. Die Membran inkubierte in dieser Lösung über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen für sieben Minuten in 0,1 % TBS-Tween geschwenkt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Es folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in der gleichen Lösung angesetzt, mit der zuvor die unspezifischen Proteine geblockt wurden. Die Membranen wurden daraufhin erneut dreimal sieben Minuten in 0,1 % TBS-Tween gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL). Die Zweitantikörper, die über die Erstantikörper eine Bindung mit den Proteinen eingegangen sind, waren mit HRP konjugiert. Dieses ist dazu fähig, das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol zu oxidieren, was zu einer Lichtquantenfreisetzung führt, die detektierbar ist. Die gewaschenen Membranen wurden dazu in ECL getränkt. Die an die Zweitantikörper gebundene HRP, katalysierte die Oxidation des Luminols. Die dadurch entstehenden Lichtbanden wurden im ChemiDocSystem detektiert und fotografisch dokumentiert. Mittels Quantity One war die Messung der Signalstärke möglich, die Aufschluss über die Menge der Proteine gibt.

2.2.6 Messung der Myokardzellkontraktion

2.2.6.1 Stimulation der Kardiomyozyten im elektrischen Feld

Die Kardiomyozyten der Ratte wurden nach dem obigen Schema präpariert und mit AS605240 (100 nM) und 30 Minuten später mit TGF- β_1 (1 ng/ml) stimuliert. Die Kardiomyozyten der PI3K γ -KO-Mäuse wurden ebenfalls mit TGF- β_1 stimuliert (10 ng/ml). Es folgte eine Inkubation über Nacht. Die Messung der Kontraktionsparameter fand nach 22 Stunden statt. Die vorbereiteten Schalen wurden in dafür vorgesehenen Vertiefungen im Mikroskop eingesetzt. Um die Kardiomyozyten elektrisch zu stimulieren, wurde das Medium mit zwei Drähten versehen. Einer der beiden stellte eine Kathode und der andere eine Anode dar. Durch eine Aussparung im Deckel wurden die Drähte in das Innere der Kulturschale geführt. Sie sollten senkrecht in das Medium eintauschen, im weiteren Verlauf parallel zur Oberfläche verlaufen und schließlich wieder senkrecht das Medium zu verlassen. Durch eine weitere Bohrung im Deckel wurden sie wieder nach außen geführt. Der Anodendraht und der Kathodendraht wurden an den Stromkreislauf angeschlossen. Aufgrund ihres Verlaufs im Medium, bildete sich zwischen den Drähten ein elektrisches Feld mit annähernd homogenem Verlauf. Es resultierte ein weitestgehend gleichmäßiger Stromfluss, der die Zellen zwischen Anode und Kathode durchlief. Durch Stromstöße ausgehend vom Stimulator, wurde eine Kontraktion der Myokardzellen herbeigeführt. Sie wurden über 0,5 Millisekunden mit biphasischen Stromstößen (60 V) aus entgegengesetzten Rechteckspannungen stimuliert. Auftretende Spontankontraktionen der Kardiomyozyten wurden durch die vorgegebene Frequenz des Stimulators minimiert und so ein einheitliches Kontraktionsmuster herbeigeführt. Über den Stimulator konnten verschiedenen Kontraktionsfrequenzen ausgelöst werden. Zellen, die außerhalb der vorgegebenen Frequenz kontrahierten, wurden nicht berücksichtigt.

2.2.6.2 Messung der Kontraktionsparameter

Die Zellen, die sich in den Kulturschalen in den Vertiefungen des Objektisches befanden, wurden durch das Mikroskop betrachtet. Dieses war zum einen an eine Kamera angeschlossen, die das Okularbild auf einen Monitor übertrug. Des Weiteren war es mit einer Zeilenkamera verbunden, die Helligkeitskontraste wahrnehmen und so zwischen Zellgrenze und Hintergrund unterscheiden konnte. Die Kulturschale wurde so

positioniert, dass sich die zu untersuchende Zelle in der Mitte des Okularbildes befand. Die Zeilenkamera wurde so ausgerichtet, dass sich die Zellenden im Erfassungsbereich der eindimensionalen Zeile befanden.

Für die Auswertung des Bildes der Zeilenkamera wurde dieses in ein elektrisches Signal umgewandelt und über das Interface auf einen Oszillographen übertragen. Auf dem Horizontalverstärker war die Ablenkzeit kontinuierlich auf 0,1 ms / cm eingestellt, während der Vertikalverstärker auf 5 V / div festgelegt war. Um die Bilddarstellung zu ermöglichen, wurde er intern getriggert. Die Interface-Spannung wurde durch den Oszillographen am zweiten Kanal aufgezeichnet. Über die auf dem Bildschirm dargestellte Horizontale konnte man auf die Zelllänge und Zellkontraktion der Zellkanten schließen. Der Oszillograph steuerte den Zustand der Interface-Spannung. Diese Informationen wurde zeitlich an das Interface und einen Computer mit dem Programm Cell weitergegeben. Dieses errechnet über den Zustand der Spannung die Zelllänge zu einem bestimmten Zeitpunkt und erstellte aus diesem Verlauf einen Graphen. Auf diesem konnte man den Kontraktionsverlauf ablesen. Mit der Annahme, dass die einsetzende Längenverkürzung als Startpunkt der Kontraktion gilt, registrierte der Computer fünf Kontraktionsabläufe und ermittelte die untenstehenden Parameter als Mittelwerte. Aus jeder Schale wurden neun Zellen für die Messung bei einer Frequenz von zwei Hertz ausgewählt, die viermal wiederholt wurde. Folgende Parameter wurden ermittelt:

- Maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
- Minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
- Zeit von Beginn bis zur maximalen Kontraktion in Millisekunden
- Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde
- Maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde
- Zeit von der 10%igen bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
- Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wurden folgende Werte errechnet:

- $\Delta L/L$: gibt an um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
- $Con-Vel_{max}$: Ratenkonstante für maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
- $Rel-Vel_{max}$: Ratenkonstante für maximale Relaxationsgeschwindigkeit

2.2.7 Das Hoe-Assay als Apoptosenachweis

Ziel des Hoe-Assays ist es, mikroskopisch durch unterschiedliche Anfärbungen nekrotische, apoptotische und vitale Zellen voneinander unterscheiden zu können. So konnten quantitative Vergleiche zwischen Zellen vorgenommen werden, die mit TGF- β_1 (3 ng/ml) oder mit einem PI3K γ -Inhibitor inkubiert wurden. Vorbereitend wurden bereits am Vortag Schalen, mit dem für Maus-Kardiomyozyten vorgesehenen Vorplattiermedium vorbereitet. Die Präparation der Zellen erfolgte wie in 2.2.3.1 beschrieben. Anschließend wurde das Vorplattiermedium entfernt, die Zellsuspension auf sechs Schalen aufgeteilt und die Zellen für 60 Minuten im Brutschrank gelagert. Danach wurde das Medium getauscht und nicht adhärente Zellen entfernt. Es folgte die Stimulation der Zellen. Bei Kardiomyozyten der Wildtyp-Mäuse wurden vier Schalen mit 1 μ l der Inhibitoren versetzt. Es handelt sich um den PI3K γ -Inhibitor AS605240, der nach dem Auftragen in zwei Schalen mit einer Konzentration von 1 μ M und in zwei Schalen mit einer Konzentration von 100 nM vorhanden war. Nach weiteren 30 Minuten im Brutschrank wurden die Zellen durch 3 μ l TGF- β_1 stimuliert. Kardiomyozyten von PI3K γ -KO-Mäusen wurden ausschließlich mit TGF- β_1 stimuliert. Das Stimulationsschema ist in Tabelle 4: Stimulationsschema der Kardiomyozyten für das Hoe-Assay dargestellt.

Die Schalen inkubierten über Nacht für 22 Stunden im Brutschrank. Um die Hoe-Zählung durchführen zu können, war eine Färbung der Zellen notwendig. Zu den Schalen wurden dafür jeweils 5 μ l des Hoechst-Farbstoff 33258 und des Propidiumiodids gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Es folgte eine Inkubation von fünf Minuten bei 37 °C.

Tabelle 4: Stimulationsschema der Kardiomyozyten für das Hoe-Assay

	Wildtyp	PI3K γ -KO
1	/	/
2	TGF- β_1	/
3	1 μ M AS605240	/
4	1 μ M AS + TGF- β_1	TGF- β_1
5	100 nM AS605240	TGF- β_1
6	100 nM AS + TGF- β_1	TGF- β_1

Bei dem Hoechst Farbstoff 33258 handelt es sich um einen membrangängigen Farbstoff, der in der Lage ist, das Chromatin im Kern der Zellen zu färben. Wird er mit einer Wellenlänge von 340 nm bis 360 nm angeregt, zeigt er eine blaue Fluoreszenz. Im Zuge der Apoptose, kommt es zur Abrundung der Zellen sowie zur Chromatin-Kondensation. Dementsprechend konnten diejenigen Zellen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop als rund mit blauem Chromatin imponierten, als apoptotisch identifiziert werden. Propidiumiodid zeigt bei einer Anregung mit einem Spektrum von 510 nm bis 550 nm eine Rotfärbung. Im Gegensatz zum Hoechst Farbstoff 33258 ist er jedoch nicht membrangängig. Dies bedeutet, dass er nicht in gesunde oder apoptotische Zellen eindringen kann. Wird eine Zelle jedoch nekrotisch, weist die Zellmembran Poren auf, durch die der Farbstoff in die Zelle eindringen und die DNA rotfärben kann. Die Zelle kann bei einer Beleuchtung mit entsprechender Wellenlänge so als nekrotisch identifiziert werden.

Nach der 5-minütigen Inkubation wurden gewählte ca. fünf bis acht Gesichtsfelder mit den verschiedenen Wellenlängen durchleuchtet und die Zellen bei 200facher Vergrößerung betrachtet. Pro Schale wurden ca. 200 Zellen hinsichtlich apoptotischer oder nekrotischer Prozesse analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von PI3K γ auf die Kontraktion adulter Kardiomyozyten

PI3K γ ist als Regulator der Kontraktion in Kardiomyozyten bekannt (Patrucco et al. 2004). Pretorius fand heraus, dass eine Aktivierung dieser Kinase die kardiale Kontraktilität reduziert (Pretorius 2009). Ebenso führt die Stimulation von Kardiomyozyten mit TGF- β_1 zu einer eingeschränkten kontraktile Funktion (Heger et al. 2011). Neben dem klassischen SMAD-Signalweg kann eine TGF- β_1 -Stimulation zur Aktivierung eines non-SMAD-Signalweges führen. An dem kann neben anderen Kinasen auch die PI3K beteiligt sein.

Da TGF- β_1 in der Lage ist, PI3K γ auf diesem zu aktivieren, stellt sich die Frage, inwieweit TGF- β_1 die Kontraktion über diese Isoform reguliert. Dafür wurde der PI3K γ -selektive Inhibitor AS605240 in Kardiomyozyten der Ratte eingesetzt und deren Kontraktionsverhalten unter Stimulation mit 2 Hz untersucht.

3.1.1 PI3K γ vermittelt die kontraktionshemmende Wirkung von TGF- β_1

Um das Kontraktionsverhalten der adulten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu charakterisieren, wurden die relative Zellverkürzung, die Relaxationsgeschwindigkeit, sowie die Kontraktionsgeschwindigkeit bestimmt. Es zeigte sich, dass die TGF- β_1 -Stimulation einen negativen Effekt auf die Kontraktion hat. Die Zellverkürzung (dL/L), dargestellt in Abbildung 7, war signifikant verringert (9,3 % \pm 0,4 in WT vs. 7,8 % \pm 0,3 in WT + TGF- β_1). Der PI3K γ -Inhibitor AS605240 allein zeigte dagegen keinen Einfluss auf das basale Niveau. Jedoch konnte ein Vergleich der TGF- β_1 -stimulierten Kardiomyozyten beweisen, dass sich die Inhibition von PI3K γ positiv auf die Zellverkürzung auswirkt. Durch die Inhibition ergab sich eine signifikante Zunahme der Zellverkürzung (7,8 % \pm 0,4 in TGF- β_1 vs. 8,8 % \pm 0,4 in AS605240 + TGF- β_1). Damit konnte der Effekt von TGF- β_1 auf die Zellverkürzung bei zusätzlicher Gabe von AS605240 fast vollständig aufgehoben werden.

Eine TGF- β_1 -Stimulation führte des Weiteren zu einer signifikanten Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) von 26,4 % ($157,2 \mu\text{m/s} \pm 13,7$ in WT vs. $115,8 \mu\text{m/s} \pm 5,9$ in WT + TGF- β_1), dargestellt in Abbildung 8. Auch dieser Effekt wurde durch den Einfluss des PI3K γ -Inhibitors deutlich geringer. TGF- β_1 stimulierte Zellen zeigten unter zusätzlichem Einfluss von AS605240 eine 24,4 % höhere Relaxationsgeschwindigkeit ($115,8 \mu\text{m/s} \pm 5,9$ in TGF- β_1 vs. $144,0 \mu\text{m/s} \pm 9,6$ in AS605240 + TGF- β_1).

In Abbildung 9 zeigt sich, dass die Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) durch TGF- β_1 -Stimulation ebenfalls signifikant abnimmt. Sie war im Vergleich zu den WT-Kardiomyozyten 21,2 % geringer ($161,6 \mu\text{m/s} \pm 9,6$ in WT vs. $127,5 \mu\text{m/s} \pm 6,3$ in TGF- β_1). Auch dieser Effekt von TGF- β_1 konnte durch den selektiven PI3K γ -Inhibitor reduziert werden. Die TGF- β_1 -stimulierten Kardiomyozyten wiesen unter dem Einfluss des Inhibitors eine um 22,3 % höhere Kontraktionsgeschwindigkeit auf als die ausschließlich mit TGF- β_1 stimulierten Zellen ($127,4 \mu\text{m/s} \pm 6,3$ in TGF- β_1 vs. $155,8 \mu\text{m/s} \pm 8,9$ in AS605240 + TGF- β_1).

Eine Inhibition der PI3K γ verringert die durch TGF- β_1 -induzierte Einschränkung der kontraktilen Funktion. Demnach ist davon auszugehen, dass PI3K γ ein entscheidender Bestandteil bei der Vermittlung der TGF- β_1 -induzierten Effekte auf die Kontraktion ist.

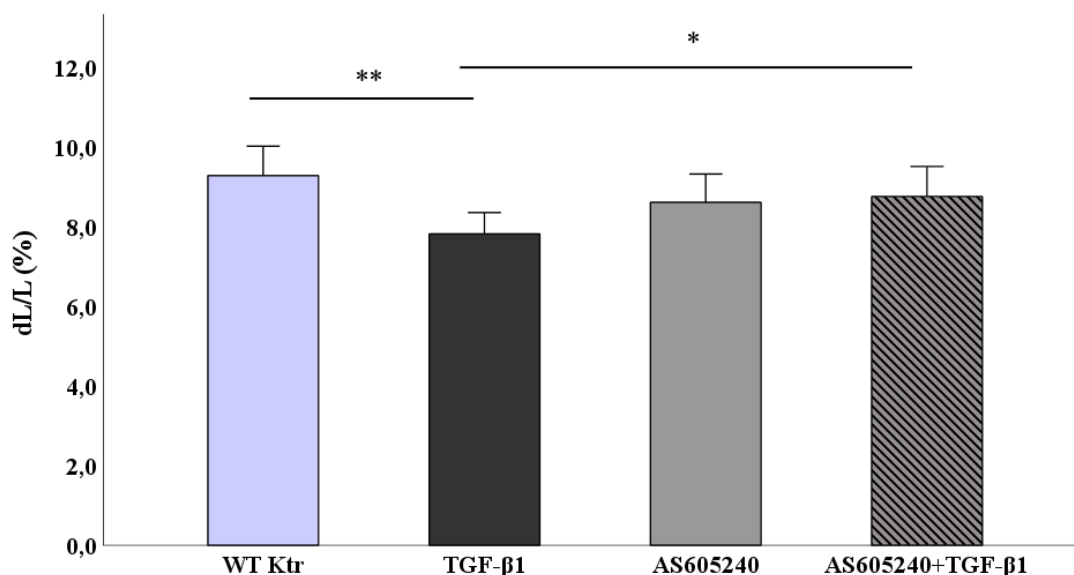


Abbildung 7: Vergleich der relativen Zellverkürzung adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng/ ml) und/oder AS605240 (100 nM). Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]) dargestellt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (n=54 Zellen aus sechs Kardiomyozytenpräparationen)

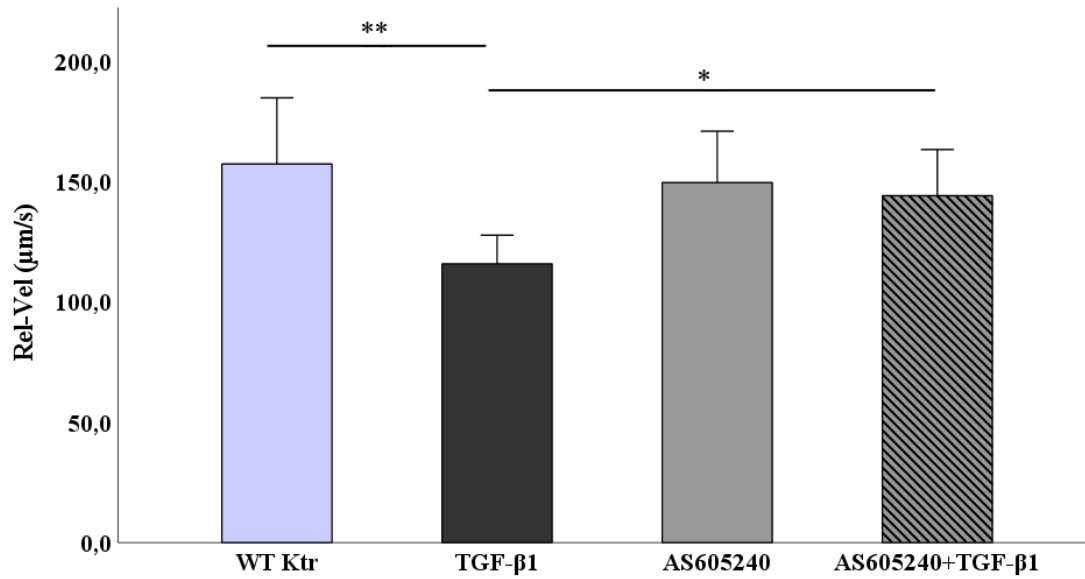


Abbildung 8: Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeit adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng/ ml) und/oder AS605240 (100 nM). Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler für die Relaxationsgeschwindigkeit dargestellt. **p<0,01, *p<0,05 (n=54 Zellen aus sechs Kardiomyozytenpräparationen)

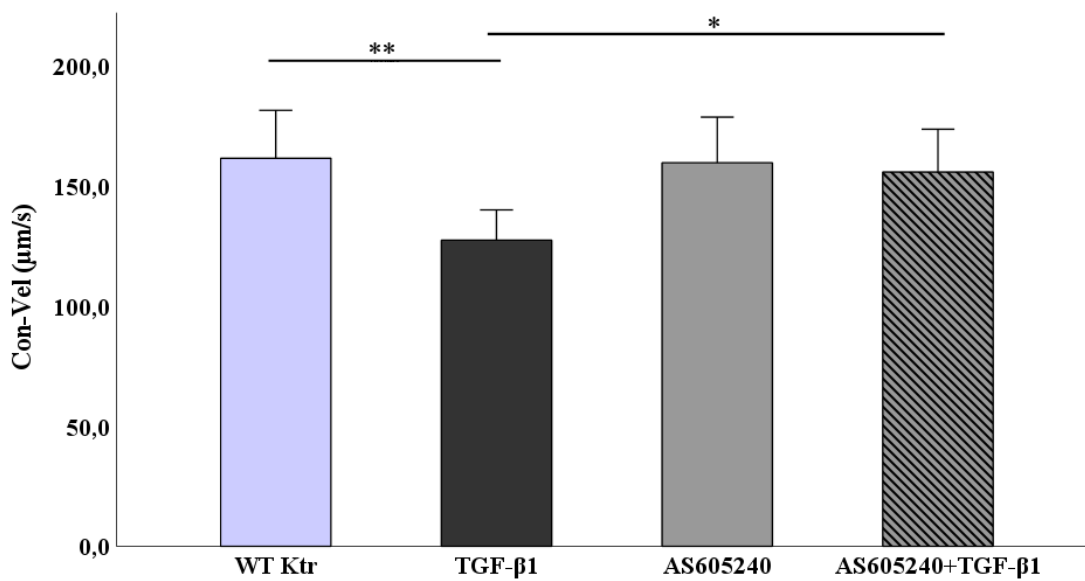


Abbildung 9: Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeit adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng/ ml) und/oder AS605240 (100 nM). Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler für die Kontraktionsgeschwindigkeit dargestellt. **p<0,01, *p<0,05 (n=54 Zellen aus sechs Kardiomyozytenpräparationen)

Um das Ergebnis des PI3K γ -Inhibitors zu verifizieren, wurden Kardiomyozyten von PI3K γ -KO Mäusen eingesetzt, bei denen eine Deletion des PI3K γ -Gens stattgefunden hat. Es wurde das Ausmaß der Zellverkürzung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die WT-Kardiomyozyten zeigten eine verminderte kontraktile Funktion unter TGF- β_1 -Stimulation (8,4 % \pm 0,3 in WT Ktr vs. 7,4 % \pm 0,4 in WT + TGF- β_1). Im Vergleich zu den unstimulierten WT-Mäusen, zeigten die unstimulierten PI3K γ -KO-Mäuse eine 2,5 % stärkere Zellverkürzung (8,4 % \pm 0,3 in WT Ktr vs. 10,9 % \pm 0,4 in PI3K γ -KO). Eine Stimulation der PI3K γ -KO-Kardiomyozyten mit TGF- β_1 führte zu keiner Veränderung der Zellverkürzung (10,9 % \pm 0,4 in PI3K γ -KO vs. 10,8 % \pm 0,4 in PI3K γ -KO + TGF- β_1). Bei dem Vergleich der WT-Mäuse mit TGF- β_1 -Stimulation mit den PI3K γ -KO-Tieren mit zusätzlicher TGF- β_1 -Stimulation war die Zellverkürzung bei den KO-Tieren deutlich erhöht (7,4 % \pm 0,4 in WT + TGF- β_1 vs. 10,8 % \pm 0,4 in PI3K γ -KO + TGF- β_1).

TGF- β_1 führte bei den PI3K γ -KO-Mäusen zu keiner Reduktion der Zellverkürzung, wie es bei den WT-Kardiomyozyten zu sehen war. Daraus geht hervor, dass PI3K γ Anteil an der von TGF- β_1 -ausgelösten Einschränkung der kontraktile Funktion hat.

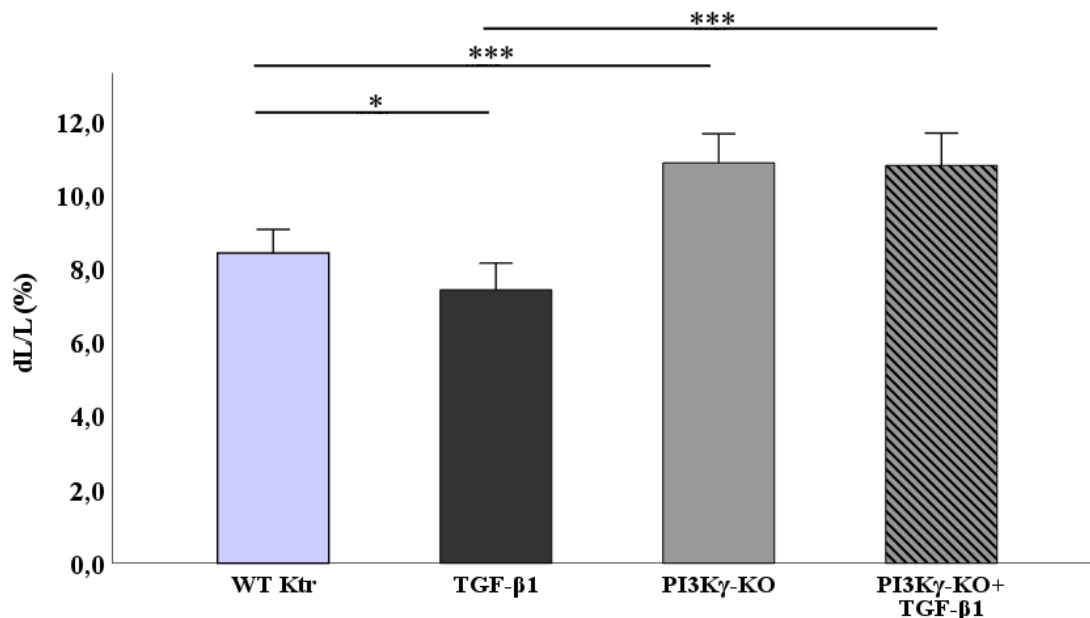


Abbildung 10: Vergleich der relativen Zellverkürzung adulter ventrikulärer Maus-Kardiomyozyten während einer Stimulationsfrequenz von 2HZ bei WT- und PI3K γ -KO-Mäusen nach Inkubation mit TGF- β_1 (10 ng/ml) über Nacht. Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler für die relative Zellverkürzung (dL/L [%]) dargestellt. *** p <0,001, * p <0,05 (n=54 Zellen aus sechs Präparationen bei PI3K γ -KO-Mäusen, n=90 Zellen aus zehn Präparationen bei WT-Mäusen)

Die mit den Inhibitoren gezeigten Ergebnisse bezüglich der eingeschränkten Zellverkürzung konnten durch Einsatz der PI3K γ -KO-Mäuse bestätigt werden. PI3K γ ist ein weiterer Mediator in der TGF- β_1 -Signalkaskade, die zu einer eingeschränkten kontraktilen Funktion führt.

3.2 Der Einfluss von PI3K γ auf die TGF- β_1 -induzierte Apoptose

TGF- β_1 führt in adulten Kardiomyozyten über die Aktivierung von SMAD-Transkriptionsfaktoren zur Apoptose. Um den Einfluss von PI3K γ auf die TGF- β_1 -induzierte Apoptose zu untersuchen, wurde die Chromatin-Kondensation in isolierten Kardiomyozyten nach der Stimulation mit TGF- β_1 untersucht und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt.

3.2.1 Die proapoptotische Wirkung von TGF- β_1 wird durch PI3K γ vermittelt

TGF- β_1 ist als entscheidender Bestandteil im kardialen Remodeling bekannt und führt in diesem Zusammenhang zu einer gesteigerten Apoptose in Kardiomyozyten. Um den Einfluss von PI3K γ zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten verwendet, die mit dem PI3K γ -Inhibitor AS605240 behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich bei den WT-Kardiomyozyten ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate nach TGF- β_1 -Stimulation. Sie war mit TGF- β_1 -Stimulation 21,3 % höher als in den unstimulierten Zellen (25,0 % \pm 2,3 in WT Ktr vs. 46,3 % \pm 3,4 in WT + TGF- β_1). Bei der Behandlung der Kardiomyozyten mit einem selektiven PI3K γ -Inhibitor zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kardiomyozyten keine Veränderung der Apoptoserate. Auch die Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors ließ keinen Unterschied erkennen (25,0 % \pm 2,3 in WT Ktr vs. 28,7 % \pm 4,0 in 1 μ M AS605240 vs. 29,3 % \pm 4,2 in 100 nM AS605240). Eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β_1 führte bei den mit AS605240 inkubierten Kardiomyozyten ebenso wie bei den unbehandelten Kardiomyozyten zu einer Zunahme der apoptotischen Aktivität.

Vergleicht man jedoch die unbehandelten Kardiomyozyten mit denen, die mit AS605240 behandelt wurden, wird deutlich, dass der Einfluss von TGF- β_1 bei zusätzlicher Inkubation mit dem Inhibitor geringer ist. Die Ergebnisse zeigen, dass PI3K γ an der TGF- β_1 -induzierten Apoptose beteiligt ist.

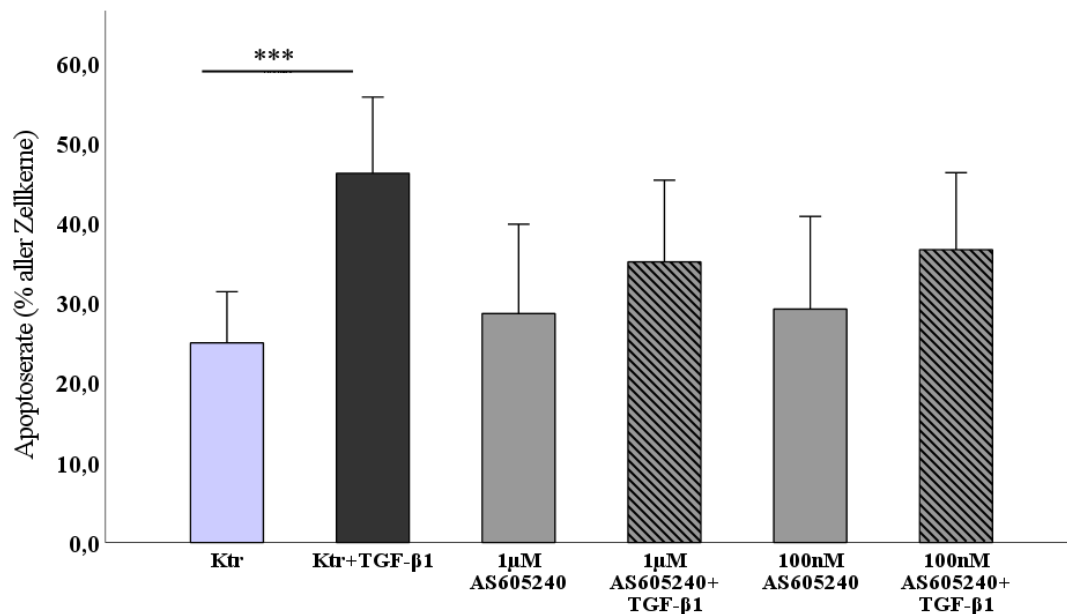


Abbildung 11: Quantitative Darstellung der Apoptoserate adulter Kardiomyozyten der Maus. Eine HOE 33528-Färbung zum Nachweis der nukleären Chromatin-Kondensation wurde 20 Stunden nach Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240 und zusätzlicher TGF- β_1 -Stimulation (3 ng/ml) bei Kardiomyozyten von WT-Mäusen durchgeführt. Es sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils apoptotischer Kardiomyozyten von mind. 200 betrachteten Zellkernen sowie die dazugehörigen Standardfehler dargestellt. *** $p < 0,001$ ($n=4-5$ Präparationen)

Es wurde zusätzlich der Anteil nekrotischer Zellen erfasst, der in Abbildung 12 dargestellt ist. Die Betrachtung zeigt unter Einfluss von TGF- β_1 , im Vergleich zu den WT-Tieren, eine Verringerung von 20,4 % (62,1 % \pm 3,0 in WT Ktr vs. 41,7 % \pm 4,9 in WT+TGF- β_1). Kardiomyozyten, die mit dem PI3K γ -Inhibitor inkubierten, zeigten eine ähnliche Nekroserate wie die unstimulierten Kontroll-Zellen. Die zusätzliche Stimulation mit TGF- β_1 brachte keinen signifikanten Effekt hervor.

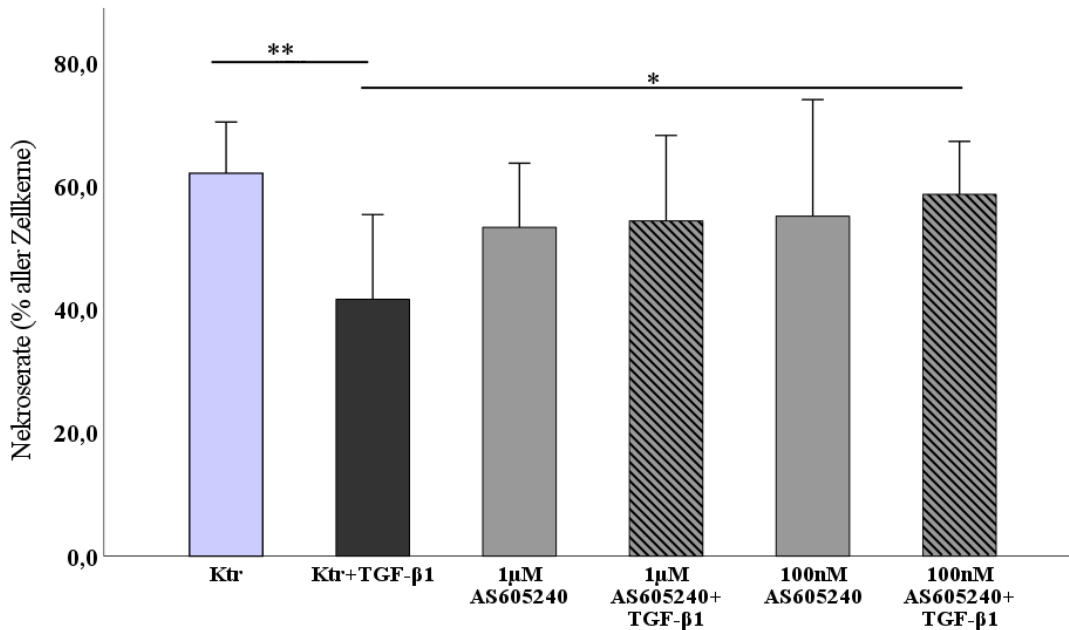


Abbildung 12: Quantitative Darstellung der Nekrose rate adulter Kardiomyozyten der Maus. Eine Propidiumiodid-Färbung zum Nachweis der Nekrose wurde 20 Stunden nach Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240 und zusätzlicher TGF- β_1 -Stimulation (3 ng/ ml) bei Kardiomyozyten von WT-Mäusen durchgeführt. Es sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils nekrotischer Kardiomyozyten von mind. 200 betrachteten Zellkernen sowie die dazugehörigen Standardfehler dargestellt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (n=4-5 Präparationen)

3.2.2 Einfluss von TGF- β_1 auf die Apoptose von PI3K γ -KO-Kardiomyozyten

Für eine Verifizierung der Ergebnisse, die bei den Versuchen mit einem PI3K γ -selektiven Inhibitor erzielt wurden, wurden zusätzlich Kardiomyozyten von PI3K γ -KO-Mäuse verwendet.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Apoptoserate sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Apoptoserate der Kontroll-Kardiomyozyten stieg nach TGF- β_1 -Stimulation 11,9 % an (21,0 % \pm 1,9 in WT vs. 32,9 % \pm 2,9 in WT + TGF- β_1). Die unstimulierten Kardiomyozyten der PI3K γ -KO-Tiere zeigten eine ähnliche Apoptoserate wie die Kardiomyozyten des Wildtyps (21,0 % \pm 1,9 in WT vs. 23,5 % \pm 2,5 in PI3K γ -KO). Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch bei der TGF- β_1 -Stimulation deutlich. Der Anteil der apoptotischen Zellen bei den Kontrolltieren stieg nach TGF- β_1 -Stimulation um 11,9 % an. Dies konnte bei PI3K γ -KO-Mäusen nicht festgestellt werden. Nach TGF- β_1 -Stimulation von PI3K γ -KO-Kardiomyozyten wurden in 22,2 % der Kardiomyozyten die Apoptose induziert.

Es sind dort ähnlich viele Zellen in die Apoptose übergegangen wie bei den unstimulierten WT-Kardiomyozyten und PI3K γ -KO-Mäusen (21,0 % \pm 1,9 in WT vs. 23,5 % \pm 2,5 in PI3K γ -KO vs. 22,2 % \pm 1,3 in PI3K γ -KO). Die Stimulation mit TGF- β_1 hatte bei Kardiomyozyten von PI3K γ -KO-Tieren keinen Einfluss auf die Apoptose. Damit bestätigten sich die Ergebnisse, aus den Versuchen mit dem PI3K γ -Inhibitor. Die Stimulation mit TGF- β_1 hat keinen Einfluss auf die Apoptoserate bei PI3K γ -KO-Kardiomyozyten. Es lässt sich schlussfolgern, dass die PI3K γ an dem Signalweg der TGF- β_1 -induzierten Apoptose beteiligt ist.

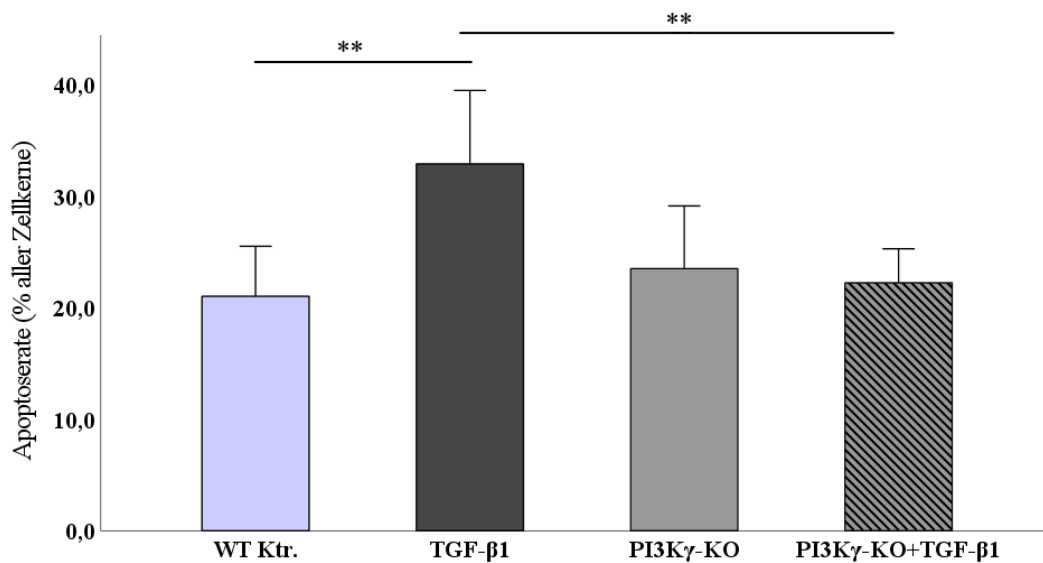


Abbildung 13: Quantitative Darstellung der Apoptoserate adulter Kardiomyozyten der Maus. Eine HOE 33528-Färbung zum Nachweis der nukleären Chromatin-Kondensation wurde 20 Stunden nach TGF- β_1 -Stimulation (3 ng/ml) bei Kardiomyozyten von WT-Mäusen und PI3K γ -KO-Mäusen durchgeführt. Es wurden mind. 200 Zellkerne betrachtet. Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler dargestellt. *** p <0,01, (n=9-10 Präparationen)

Es wurde ebenfalls der Anteil nekrotischer Kardiomyozyten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Eine signifikante Verringerung des Anteils von nekrotischen Zellen um 21,0 % wurde bei dem Vergleich der Kardiomyozyten des Wildtyps mit den PI3K γ -KO-Mäusen deutlich (53,3 % \pm 3,8 in WT vs. 32,2 % \pm 4,2 in PI3K γ -KO). Eine TGF- β_1 -Stimulation zeigte bei den WT-Tieren, eine Abnahme der Nekroserate (53,3 % \pm 3,8 in WT vs. 41,2 % \pm 4,4 in WT + TGF- β_1). Eine TGF- β_1 -Stimulation der Kardiomyozyten ergab bei PI3K γ -KO keine signifikante Änderung der Nekroserate (32,2 % \pm 4,2 in PI3K γ -KO vs. 37,2 % \pm 3,3 in PI3K γ -KO + TGF- β_1)

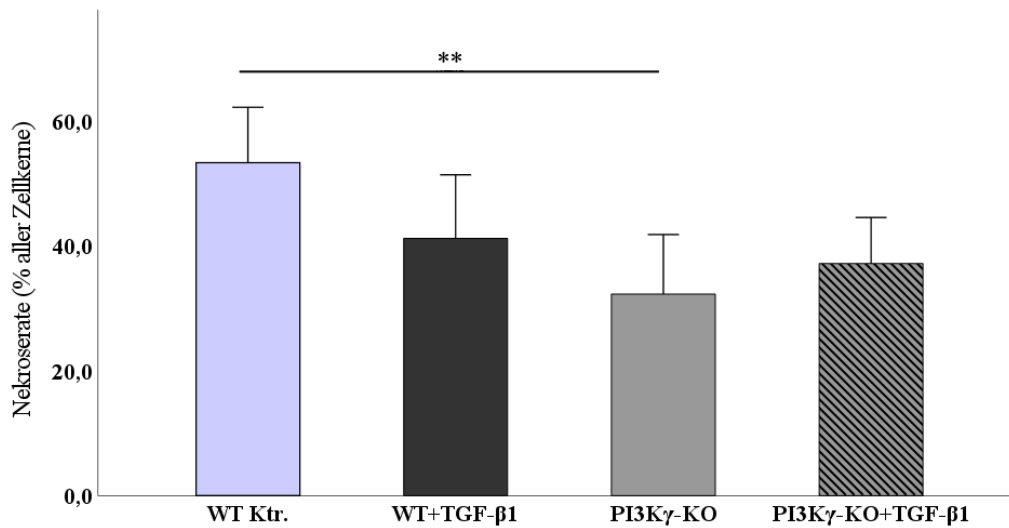


Abbildung 14: Quantitative Darstellung der Nekroserate adulter Kardiomyozyten der Maus. Eine Propidiumiodid-Färbung zum Nachweis der Nekrose wurde 20 Stunden nach TGF-β₁-Stimulation (3 ng/ml) bei Kardiomyozyten von WT-Mäusen und PI3Kγ-KO-Mäusen durchgeführt. Es wurden mind. 200 Zellkerne betrachtet. Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler dargestellt. **p<0,01, (n=9-10 Präparationen)

3.3 Die Rolle von PI3Kγ in der TGF-β₁-Signalkaskade

Durch die Bindung von TGF-β₁ an seinen Rezeptor wird die SMAD-Signalkaskade eingeleitet. Es kommt zu einer Phosphorylierung mit anschließender Translokation der SMAD-Proteine in den Zellkern. Binden die Proteine dort an SMAD-spezifische Bindungsstellen, fungieren sie als Transkriptionsfaktoren (Schneider; Euler-Taimor und Heger 2006). Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, inwieweit PI3Kγ Einfluss auf die Aktivierung des SMAD-Signalweges durch TGF-β₁ nimmt. Es wurden Kardiomyozyten von Ratten mit dem PI3Kγ-Inhibitor AS605240 inkubiert sowie Kardiomyozyten von PI3Kγ-KO-Mäusen untersucht.

3.3.1 PI3Kγ hat keinen Einfluss auf die SMAD2-Aktivierung

Die Einleitung der SMAD-Signalkaskade nach TGF-β₁-Stimulation erfolgt durch die Phosphorylierung von SMAD2. Ob PI3Kγ Einfluss auf die Proteinexpression von SMAD2 bzw. auf dessen Phosphorylierung hat, wurde durch Western Blots untersucht. Das Verhältnis von phosphoryliertem SMAD2 (P-SMAD2) und SMAD2 demonstriert, wie groß der Anteil des aktivierten SMAD2 ist.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Expression des SMAD2-Proteins. Die Banden des Westerns Blots in Abbildung 15 zeigten unter allen Bedingungen eine ähnliche Ausprägung wie das konstitutiv exprimierte Matrixprotein Vinculin, welches als Referenz dient. Die Expression nach TGF- β_1 -Stimulation war ähnlich hoch wie bei den Kardiomyozyten der Kontrolle (100,0 % \pm 8,0 in Ktr vs. 98,2 % \pm 14,9 in WT + TGF- β_1). Verglichen mit der Kontrolle ergab sich ebenfalls keine signifikante Änderung der SMAD2-Expression durch die Inkubation mit AS605240 (100,0 % \pm 8,0 in Ktr vs. 81,9 \pm 6,8 in 1 μ M AS605240 vs. 87,1% \pm 15,7 in 100nM AS605240). Die Inkubation mit dem PI3K γ -Inhibitor beeinflusste die Expression auch nach TGF- β_1 -Stimulation nicht (98,2 % \pm 8,0 in WT + TGF- β_1 vs. 79,7 % \pm 5,8 in 1 μ M AS805240 vs. 79,0 % \pm 5.6 in 100 nM AS605240). PI3K γ hat somit keinen Einfluss auf die SMAD2-Expression.

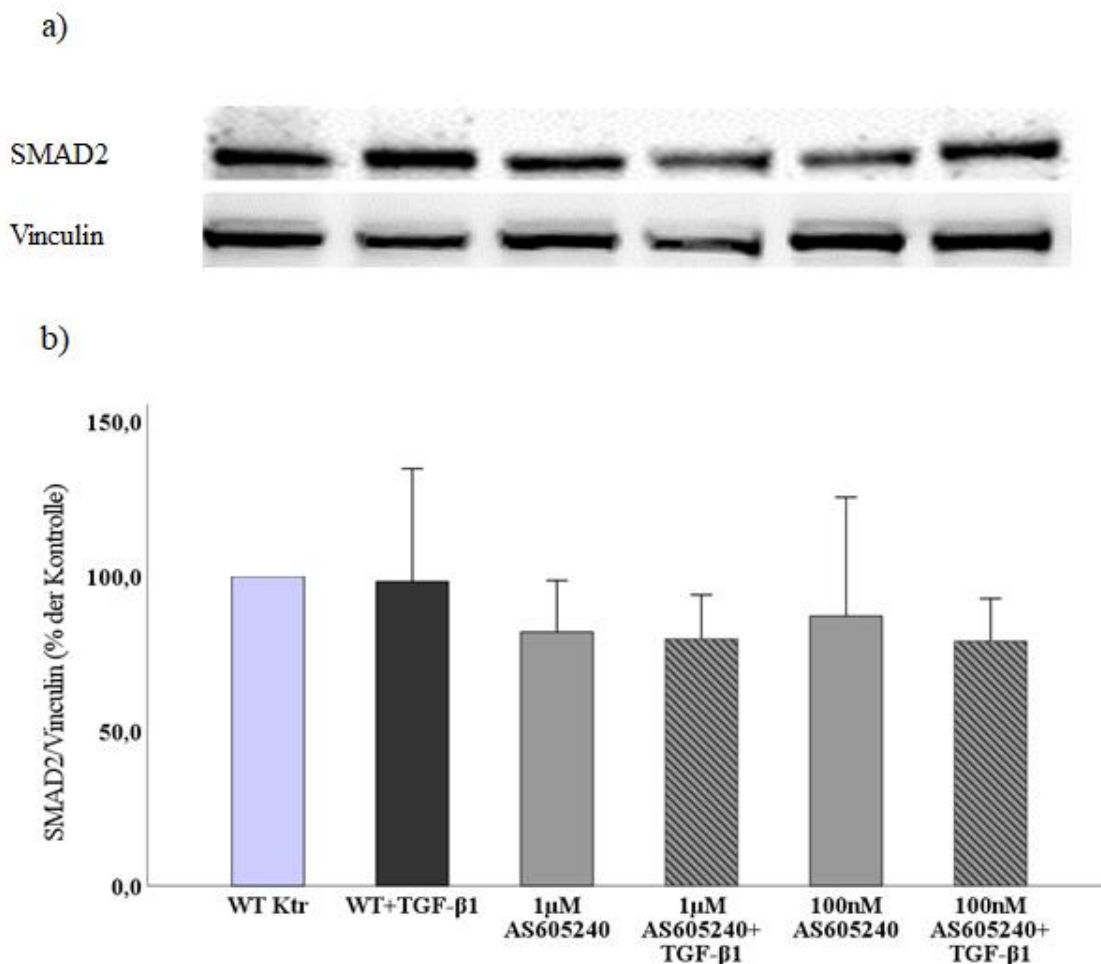


Abbildung 15: Analyse der SMAD2-Expression a) repräsentativer Western Blot, b) quantitative Auswertung der SMAD2-Expression. Kardiomyozyten wurde mit 1 ng/ ml TGF- β_1 für zwei Stunden stimuliert sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K γ -Inhibitors AS605240 (1 μ M, 100 nM, 30 Minuten vor TGF- β_1 -Stimulation) inkubiert. Es wurden Proteinextrakte hergestellt und die Expression von SMAD2 und Vinculin nachgewiesen., Es wurden Western Blots mit Kardiomyozyten aus verschiedenen Präparationen durchgeführt. *** p <0,001 (n=7 Präparationen)

Die Betrachtung der Banden von P-SMAD2, dargestellt und ausgewertet in Abbildung 16, lassen deutliche Schwankungen erkennen. Bei dem Vergleich der Kontrolle mit den Proben, die mit AS605240 inkubierten, ist kein Unterschied sichtbar. Bedingungen, bei denen eine TGF- β_1 -Stimulation vorlag, wiesen jedoch ein deutlich stärkeres Signal auf. Dies war sowohl bei den unbehandelten Kardiomyozyten als auch bei jenen, die mit dem PI3K γ -Inhibitor behandelt wurden, der Fall.

Die quantitative Auswertung bestätigte, dass eine alleinige Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von AS605240 keinen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis von P-SMAD2 zu SMAD2 hat (100,0 % \pm 22,7 in WT Ktr vs. 74,3 % \pm 9,5 in 1 μ M AS605240 vs. 94,2 % \pm 22,4 in 100 nM AS605240). Eine TGF- β_1 -Stimulation der Kardiomyozyten der Kontrollgruppe führte zu einer deutlichen Steigerung des Verhältnisses (100,0 % \pm 22,7 in WT Ktr vs. 252,3 % \pm 25,7 in WT + TGF- β_1). Dies ist gleichbedeutend mit einer Aktivierung von SMAD2 und der Einleitung des SMAD-Signalweges. Auch bei den Kardiomyozyten, die mit dem PI3K γ -Inhibitor AS605240 inkubierten, stieg das Verhältnis nach TGF- β_1 -Stimulation signifikant an. Ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Kardiomyozyten war nicht erkennbar (252,3 % \pm 25,7 in WT+TGF- β_1 vs. 305,3 % \pm 32,4 in 1 μ M AS605240 + TGF- β_1 vs. 270,6 % \pm 30,2 in 100 nM AS605240 + TGF- β_1). Diese Ergebnisse zeigen, dass PI3K γ nicht an der Aktivierung von SMAD2 durch TGF- β_1 beteiligt ist.

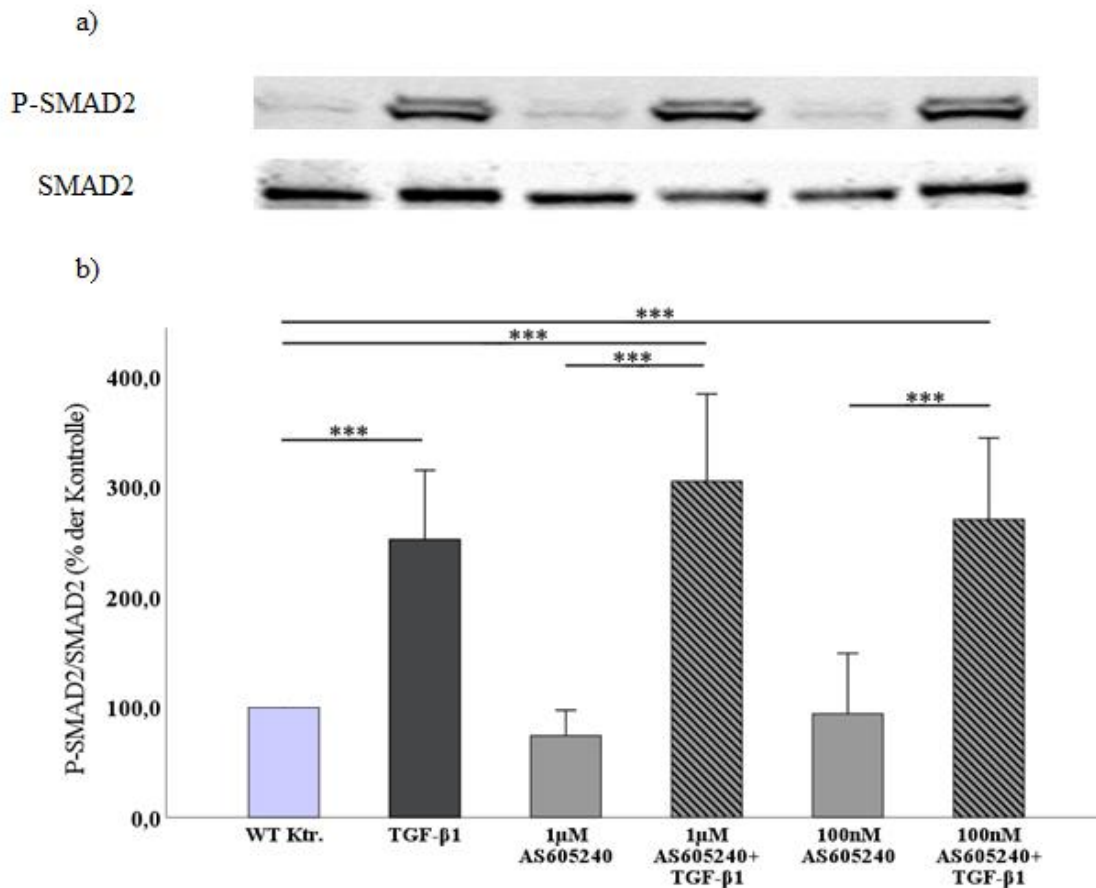


Abbildung 16: Analyse der SMAD2-Phosphorylierung a) repräsentativer Western Blot, b) quantitative Auswertung der SMAD2-Aktivierung in Form des Verhältnisses von P-SMAD2 zu SMAD2. Kardiomyozyten wurden mit 1 ng/ml TGF- β_1 für zwei Stunden stimuliert sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K γ -Inhibitors AS605240 (1 μ M, 100 nM, 30 Minuten vor TGF- β_1 -Stimulation) inkubiert. Es wurden Proteinextrakte hergestellt und die Expression von P-SMAD2 und SMAD2 nachgewiesen. Es wurden Western Blots mit Kardiomyozyten aus verschiedenen Präparationen durchgeführt. *** $p < 0,001$ ($n = 7$ Präparationen)

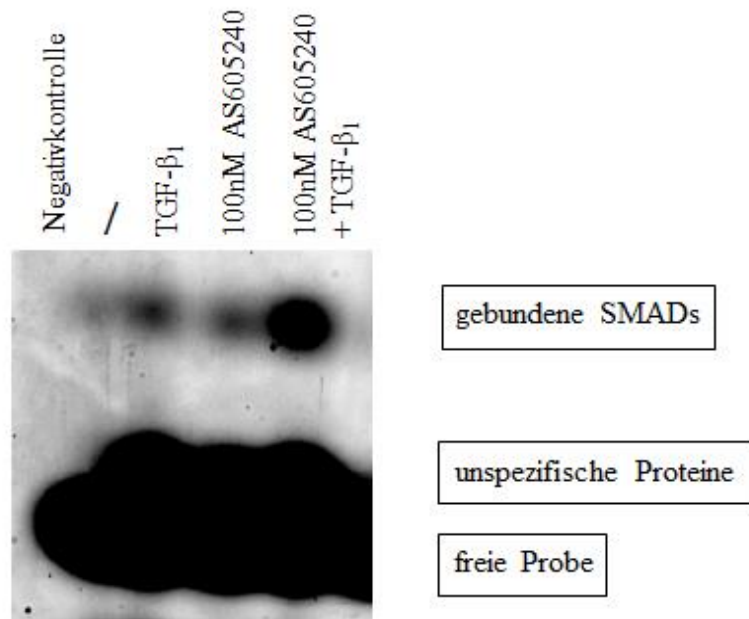
3.3.2 Die PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD-Bindungsaktivität

Nach der zytosolischen Aktivierung des SMAD-Signalweges im Zytosol kommt es zu einer Translokation des SMAD-Komplexes in den Zellkern. Hier fungieren die SMAD-Proteine u.a. als Transkriptionsfaktoren durch Bindung an die DNA. Der Einfluss von PI3K γ auf diesen Prozess wurde durch ein EMSA untersucht.

Die Betrachtung des Gels in Abbildung 17 zeigt keine Veränderung des Signals nach AS605240-Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten. Eine deutliche Zunahme lässt sich jedoch nach TGF- β_1 -Stimulation erkennen. Bei der Stimulation der unbehandelten Kardiomyozyten mit TGF- β_1 stieg die SMAD-Bindungsaktivität signifikant 37,5 % (100,0 % \pm 0,0 in WT Ktr vs. 137,5 % \pm 15,7 in WT + TGF- β_1). Das

Ausmaß der Aktivitätssteigerung war ähnlich bei den Kardiomyozyten, die zusätzlich mit AS605240 behandelt wurden. Die SMAD-Bindungsaktivität zeigte eine Zunahme von 24,0 % (98 % \pm 26,7 in 100 nM AS605240 vs. 122,5 % \pm 30,7 in 100 nM AS605240 + TGF- β_1). PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD-Bindungsaktivität nach TGF- β_1 -Stimulation.

a)



b)

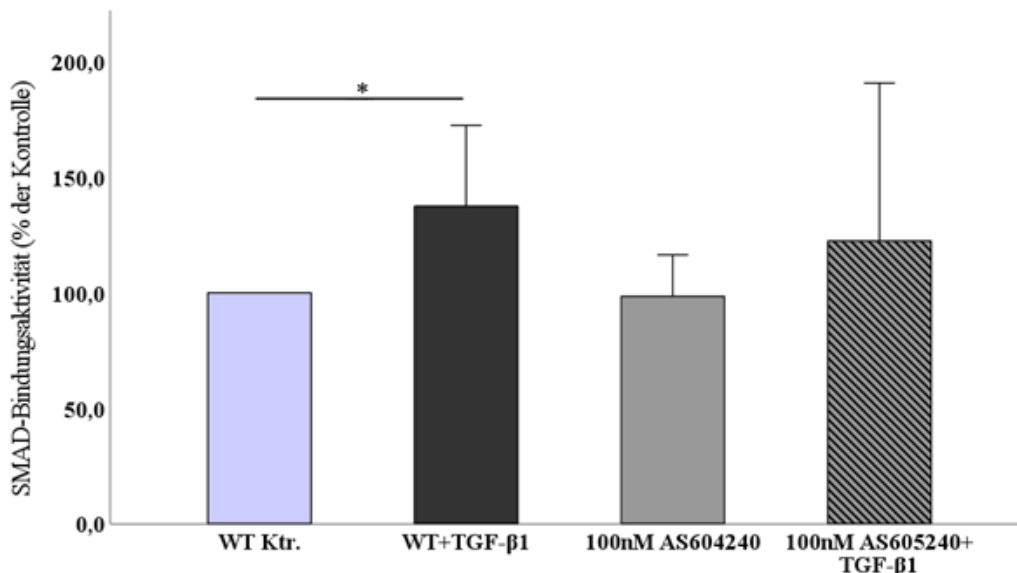
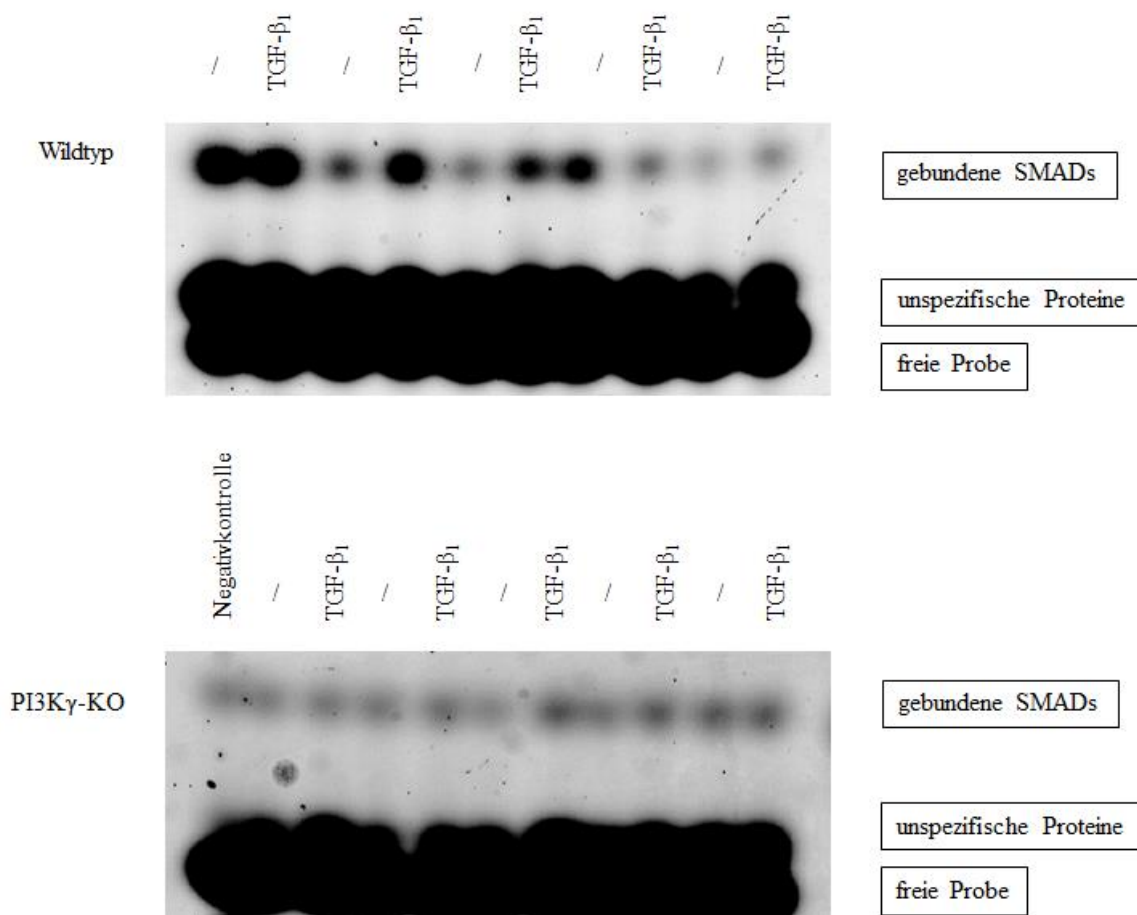


Abbildung 17: Analyse der SMAD-Bindungsaktivität a) repräsentatives Gel, B) quantitative Darstellung. Nach zweistündiger TGF- β_1 -Stimulation (1 ng/ml) wurden Kernextrakte der Zellen hergestellt und auf die SMAD-Bindungsaktivität unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide mit einer spezifischen Bindungsstelle für SMAD getestet. Zur Hemmung der PI3K γ wurden die Kardiomyozyten mit dem PI3K γ -Inhibitor AS605240 inkubiert. Die Werte wurden in Relation zu der SMAD-Bindungsaktivität der Kontrolltiere gesetzt. * $p < 0,05$ (n=11 Präparationen)

Die SMAD-Bindung wurde zusätzlich an Kardiomyozyten von PI3K γ -KO-Mäusen untersucht und in Abbildung 18 dargestellt. Der Vergleich des Gels der WT-Mäuse mit den PI3K γ -KO-Mäusen lässt eine geringere Induktion bei einem PI3K γ -KO erkennen. Die quantitative Auswertung zeigte in der Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der SMAD-Bindungsaktivität von 33,3 % (100,0 % \pm 0,0 in WT Ktr vs. 133,3 % \pm 31,5 in WT + TGF- β_1). Bei den PI3K γ -KO-Mäusen fand ebenfalls eine Induktion statt (100,0 % \pm 0,0 in PI3K-KO vs. 112,6 % \pm 6,9 in PI3K-KO + TGF- β_1). Jedoch war mit einer Induktion von nur 12,6 % die SMAD-Bindungsaktivität nicht signifikant erhöht.

a)



b)

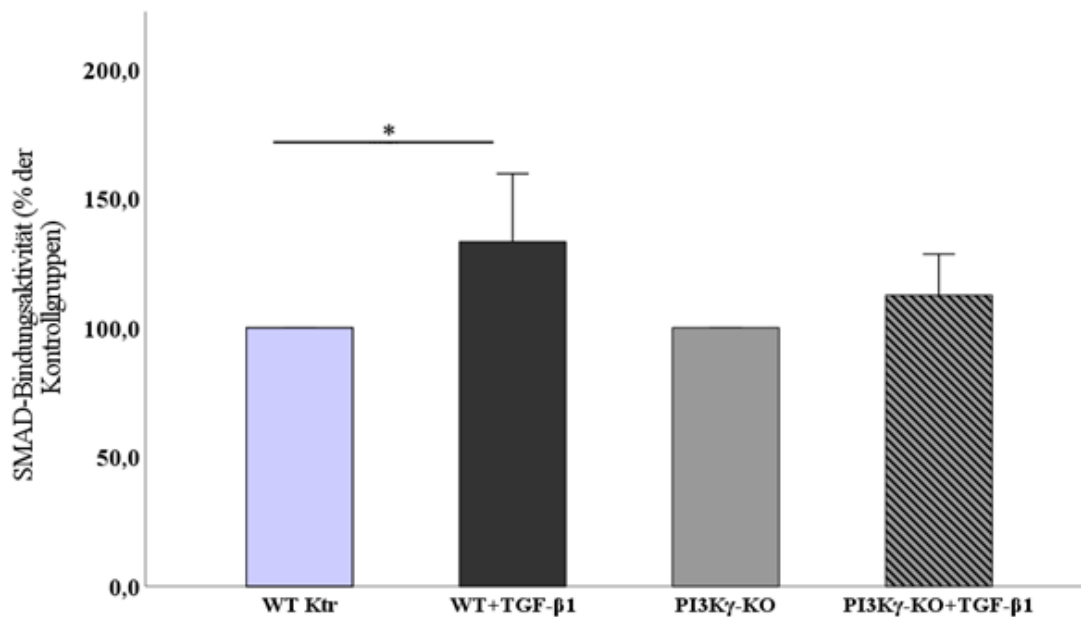


Abbildung 18: Analyse der SMAD-Bindungsaktivität nach TGF-β₁-Stimulation a) repräsentatives Gel, b) quantitative Darstellung. Nach zweistündiger TGF-β₁-Stimulation (3 ng/ml) wurden Kernextrakte von WT- und PI3Kγ-KO-Kardiomyozyten hergestellt und auf die SMAD-Bindungsaktivität unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide mit einer spezifischen Bindungsstelle für SMAD getestet. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 8-9 Präparationen. Unterschiede zwischen WT Ktr und WT + TGF-β₁ *p<0,5.

3.3.3 PI3Kγ hat keinen Einfluss auf die SMAD7-Expression

Weiterhin wurde mithilfe von Kardiomyozyten der Ratte untersucht, inwieweit PI3Kγ Einfluss auf die Expression des TGF-β₁-Zielgens SMAD7 nimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Kardiomyozyten wurden dafür mit dem PI3Kγ-Inhibitor AS605240 behandelt. Nach TGF-β₁-Stimulation gab es eine Zunahme der Expression von SMAD7 um mehr als das Doppelte (100,0 % ± 5,5 WT Ktr vs. 261,2 % ± 20,5 in WT + TGF-β₁). Nach der Inkubation mit AS605240 zeigten die Kardiomyozyten eine ähnliche SMAD7-Expression wie jene, die unbehandelt blieben (100,0 % ± 5,5 in WT Ktr vs. 80,0 % ± 6,6 in 100 nM AS605240). Auch hier führte eine Stimulation mit TGF-β₁ zu einer starken Zunahme der Expression des TGF-β₁-Zielgens SMAD7 (80,0 % ± 6,6 in 100 nM AS605240 vs. 284,1 % ± 24,7 in 100nM AS605240 + TGF-β₁).

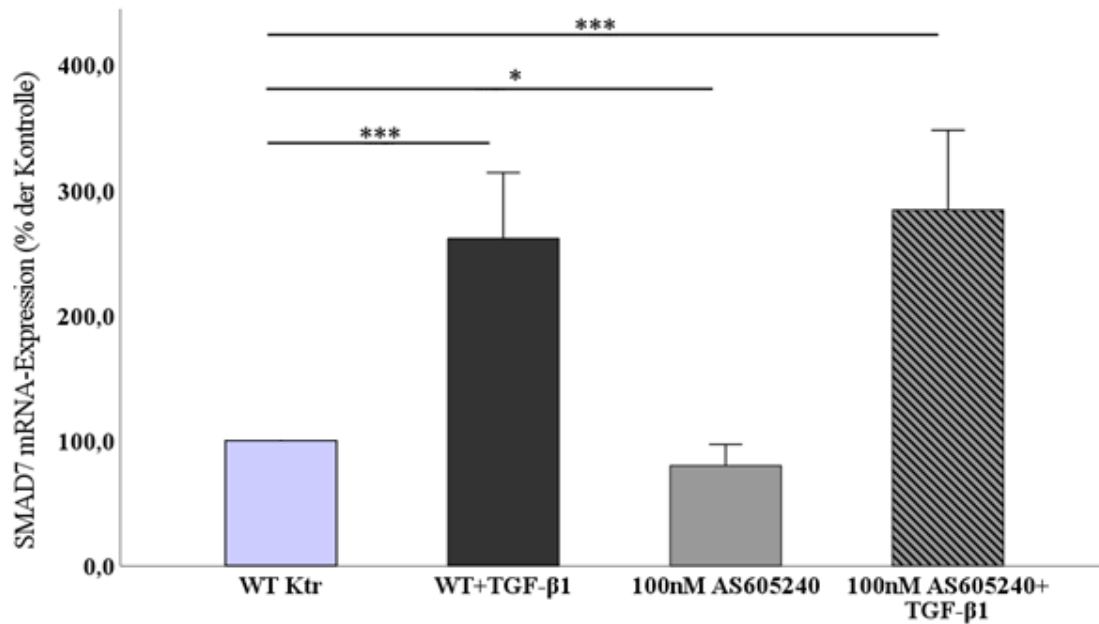


Abbildung 19: mRNA-Expression des TGF- β_1 -Zielgens SMAD7 mit und ohne Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240. Die Analyse erfolgte 24 Stunden nach TGF- β_1 -Stimulation (1 ng/ml). Die SMAD7-Expression wurde ins Verhältnis zu konstitutiv exprimierten Genen gesetzt. Es sind die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardfehler dargestellt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ ($n = 6$ Präparationen)

Es zeigte sich, dass sowohl die SMAD-Aktivierung als auch die Translokation in den Zellkern und dessen Bindung an die DNA unbeeinflusst von der Wirkung des PI3K γ -Inhibitors waren. Auch eine Deletion des PI3K γ -Gens führte zu keiner signifikanten Änderung der SMAD-Aktivierung. Des Weiteren hatte die Inhibition der PI3K γ keinen Einfluss auf die Expression des TGF- β_1 -Zielgens SMAD7. Es ist daher davon auszugehen, dass der von TGF- β_1 -induzierte SMAD-Signalweg unabhängig von PI3K γ aktiviert wird.

4 Diskussion

In der Arbeit konnte dargestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem TGF- β_1 - und dem PI3K γ -Signalweg besteht und PI3K γ ein wichtiges Signalmolekül in der TGF- β_1 -Signalkaskade ist. PI3K γ vermittelt sowohl die TGF- β_1 -induzierte Apoptose als auch die TGF- β_1 -induzierte Reduktion der kontraktile Funktion adulter Kardiomyozyten. Da der SMAD-Signalweg durch TGF- β_1 aktiviert wird, wurde ebenfalls untersucht, inwieweit PI3K γ Einfluss auf die Einleitung des Signalweges nimmt. Wir konnten feststellen, dass die TGF- β_1 induzierte Einleitung des SMAD-Signalweges nicht von PI3K γ beeinflusst wird.

4.1 Der Einfluss von TGF- β_1 auf die kontraktile Funktion des Herzens

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zellverkürzung als auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss von TGF- β_1 abnehmen. Huntgeburth et al. verglichen in ihrer Studie die Inotropie bei transgenen Mäusen mit TGF- β_1 -Überexpression und Wildtyp-Mäusen. Es bestand in vivo kein Unterschied in der basalen Kontraktion der Ventrikel. Das Ausmaß der Ventrikelkontraktion nach β -adrenerger Stimulation war bei den Tieren mit TGF- β_1 -Überexpression signifikant verringert. Die in vitro Versuche mit isolierten Kardiomyozyten bestätigten dies (Huntgeburth et al. 2011). Dies widerspricht den Ergebnissen unserer Arbeit, die in vitro eine basale Kontraktionseinschränkung von isolierten Kardiomyozyten nach TGF- β_1 -Stimulation zeigen. Zu beachten ist, dass es sich bei unseren Versuchen um akut-Versuche handelt. Huntgeburth et al. dagegen führten Versuche bei transgenen Mäusen durch, die eine chronische Überexpression von TGF- β_1 aufwiesen. Daher ist es möglich, dass sich das basale Kontraktionsverhalten an diese Situation angepasst hat. Des Weiteren zeigten Huntgeburth et al. den Einfluss von TGF- β_1 auf den mitochondrialen Energiemetabolismus. Die Stimulation von Kardiomyozyten mit TGF- β_1 führte zu einer vermehrten mRNA-Expression der UCPs. Eine Zunahme der UCPs beeinflusst die ATP-Bereitstellung, über eine Auflösung des Protonengradienten an der Mitochondrienmembran, negativ. Dies führt dazu, dass das Energieniveau unter Belastung nicht ausreicht, um die Herzfunktion an die vermehrte Nachfrage anzupassen.

Die hier aufgeführte Studie liefert einen Erklärungsansatz für den negativ-inotropen Effekt, den TGF- β_1 in den Versuchen dieser Arbeit auf die Kardiomyozyten hat.

Eine Herzinsuffizienz bezeichnet alle Zustände, bei denen die Pumpleistung des Herzens nicht ausreicht, um den Blutkreislauf unbeeinträchtigt zu erhalten (Nationale Versorgungsleitlinie (NVL) Chronische Herzinsuffizienz). Dies führt zu einer Aktivierung des RAAS. Es folgt eine gesteigerte AngII-Freisetzung sowie eine erhöhte mRNA-Expression von TGF- β_1 . AngII wirkt dadurch kontraktionshemmend (Cohn et al. 1981; Wenzel et al. 2001). Auch Mufti et al. konnten durch Inhibitorversuche mit Rattenkardiomyozyten den indirekten Nachweis erbringen, dass AngII seine kontraktionshemmende Wirkung über TGF- β_1 vermittelt (Mufti et al. 2008). Sie inkubierten isolierte Kardiomyozyten über 24 Stunden mit AngII. Eine Gruppe der Zellen wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen TGF- β_1 behandelt. Nach 24 Stunden wurde die relative Zellverkürzung der Kardiomyozyten bei einer Stimulation mit 2 Hz gemessen. Die alleinige Inkubation mit AngII führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer 29,5 % geringeren Kontraktion. Der Einsatz von TGF- β_1 -Antikörpern verhinderte die AngII-induzierte Kontraktionsminderung vollständig. Daraus geht hervor, dass AngII durch die Förderung der TGF- β_1 -Synthese kontraktionshemmend wirkt.

TGF- β_1 ist ein Zytokin, welches bei druckinduzierter Hypertrophie stark exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei dem damit verbundenen Funktionsverlust spielt (Boluyt et al. 1994). Boluyt et al. untersuchten ventrikuläre Kardiomyozyten von gesunden und hypertensiven Ratten mit und ohne Anzeichen einer Herzinsuffizienz. Sie verglichen die mRNA-Expression von TGF- β_1 mittels Northern Blot. Diese war bei hypertensiven Ratten ohne Anzeichen einer Herzinsuffizienz nicht erhöht. Kardiomyozyten von Tieren, die bereits eine Einschränkung der Herzfunktion aufwiesen, zeigten dagegen eine erhöhte mRNA-Expression von TGF- β_1 . Daraus ist zu schlussfolgern, dass TGF- β_1 nicht in der Frühphase der druckinduzierten Hypertrophie exprimiert wird, sondern erst in einem späteren Stadium. Die erhöhte TGF- β_1 -Expression geht mit einem myokardialen Funktionsverlust einher.

Die hier aufgeführten Studien belegen die Rolle des TGF- β_1 -Signalweges bei der Progression des kardialen Funktionsverlustes, welche schlussendlich zu einem Herzversagen führen kann. Daher ist es erstrebenswert, diesen Signalweg genauer zu definieren und auf therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu untersuchen.

4.2 Der Einfluss von TGF- β_1 auf die Kontraktion ist abhängig von PI3K γ

Neben TGF- β_1 hat auch PI3K γ einen negativen Einfluss auf die Kontraktion adulter Kardiomyozyten. Bisher wurde kein Zusammenhang der beiden Signalwege dargestellt. Wir konnten durch Einsatz spezifischer Inhibitoren sowie anhand von KO-Mäusen eine Beteiligung von PI3K γ an der TGF- β_1 -induzierten Kontraktionshemmung zeigen (siehe Abbildung 20).

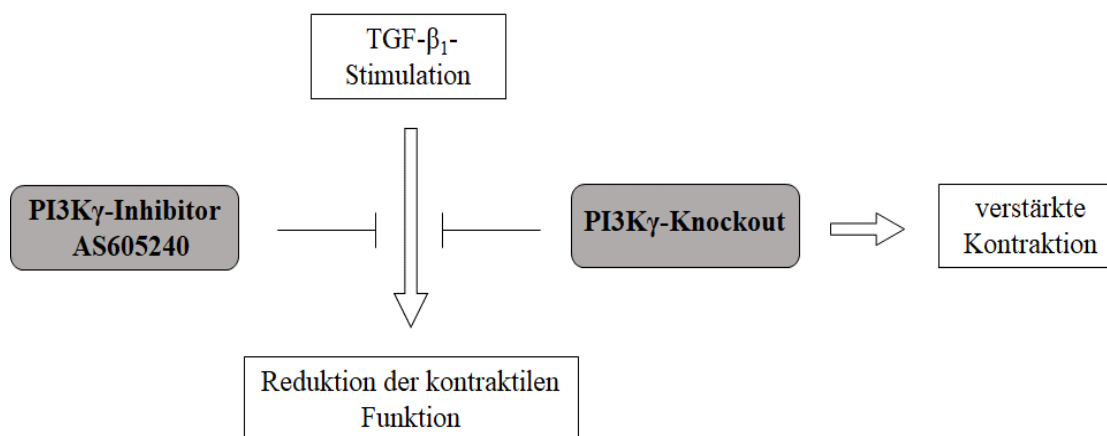


Abbildung 20: Einfluss des PI3K γ -Inhibitors bzw. des PI3K γ -KO auf die TGF- β_1 -induzierte Reduktion der kontraktile Funktion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss der PI3K γ -selektive Inhibitor AS605240 auf die Kontraktion TGF- β_1 -stimulierter Kardiomyozyten nimmt. TGF- β_1 regulierte das Kontraktionsvermögen sowie die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit negativ. Bei zusätzlicher Inkubation mit AS605240 hatte TGF- β_1 keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten von isolierten Kardiomyozyten. Damit wurde deutlich, dass PI3K γ ein essenzieller Mediator für die TGF- β_1 -induzierte Reduktion der kontraktile Funktion ist. Da AS605240 durch die Blockierung der ATP-Bindungsstelle die Kinase-Funktion von PI3K γ einschränkt, kann außerdem spezifiziert werden, dass die Kinasefunktion der PI3K γ essenziell ist, damit TGF- β_1 auf die Kontraktion wirken kann (Camps et al. 2005).

PI3K γ ist über seine Untereinheiten mit der Phosphodiesterase 3B (PDE3B) assoziiert (Voigt et al. 2006). PI3K trägt zu dessen Aktivität bei. Neben der PDE3B gibt es weitere Isoformen. Eine Inhibition aller Isoformen hemmt die Progression einer

TGF- β_1 -induzierten Lungenfibrose (Wójcik-Pszczola et al. 2020). PDE10A ist eine Isoform, deren Vorkommen ebenfalls im kardialen Gewebe nachgewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition die TGF- β_1 -induzierte Fibrose hemmt, welche Teil des kardialen Remodeling-Prozesses ist, der durch TGF- β_1 gefördert wird (Chen et al. 2020). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass sich eine verringerte PDE-Aktivität, ausgelöst durch eine PI3K γ -Inhibition, auf den TGF- β_1 -Signalweg auswirkt. Dies könnte eine Begründung für die ausbleibende Wirkung von TGF- β_1 auf die Kontraktion von Kardiomyozyten bei AS605240-Inkubation sein.

Wie oben beschrieben blockiert AS605240 die ATP-Bindungsstelle der PI3K γ (Camps et al. 2005). Diese befindet sich in der katalytischen Untereinheit p110 γ (Zhu et al. 2021). Dementsprechend wurde durch den hier verwendeten Inhibitor ausschließlich die katalytische Untereinheit gehemmt. Von anderen PI3K-Isoformen ist jedoch bekannt, dass zwischen der regulatorischen Untereinheit und dem TGF- β_1 -Rezeptor eine konstitutive Bindung besteht. Eine TGF- β_1 -Stimulation führt dadurch zur Aktivierung von AKT, einem PI3K-Target (Yi et al. 2005). In dieser Arbeit wurde daher ebenfalls das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten von PI3K γ -KO-Mäusen untersucht, die mit TGF- β_1 -stimuliert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β_1 keinen Einfluss auf die Zellverkürzung von PI3K γ -KO-Mäusen hat. Die mit dem Inhibitor AS605240 durchgeführten Versuche wurden damit bestätigt. Inwieweit auch die regulatorische Untereinheit der PI3K γ mit dem Rezeptor assoziiert ist, wurde bisher nicht geklärt. Eine durch TGF- β_1 -stimulierte Aktivierung der regulatorischen Untereinheit mit nachfolgender Stimulation der katalytischen Untereinheit und Einleitung des AKT-Signalweges könnte ebenfalls einen Erklärungsansatz für den Einfluss von PI3K γ auf den TGF- β_1 -Signalweg darstellen. Buzaglo et al. diskutierten eine konstante Hemmung der Herzmuskulatur durch AKT (Buzaglo et al. 2019). Im Fall, dass PI3K γ durch die Inhibition mit AS605240 seine Kinase-Funktion verliert, bleibt eine AKT-Aktivierung und Inhibition der Herzmuskulatur aus. Gleiches gilt bei einem PI3K γ -KO. Andere Untersuchungen brachten AKT mit einer verstärkten Inotropie und physiologischer Hypertrophie in Zusammenhang (Latronico et al. 2004). Auch Sun et al. zeigten, dass eine AKT-Aktivierung einen positiv inotropen Effekt hat. Spezifizierten, aber gleichzeitig, dass dieser durch die α -Isoform ausgelöst wird (Sun et al. 2006). AKT als PI3K-Target war in dieser Arbeit kein Untersuchungsgegenstand. Die oben

dargelegten Untersuchungen zeigen jedoch, dass Potential für weitere Untersuchungen besteht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- β_1 die Kontraktion von Kardiomyozyten über den PI3K γ -Signalweg negativ beeinflusst. Um aus dieser Erkenntnis einen therapeutischen Nutzen ziehen zu können, ist es jedoch notwendig genauer zu definieren wie PI3K γ im Zusammenhang mit TGF- β_1 die Kontraktion beeinflusst. Da eine TGF- β_1 -Stimulation sowohl bei Inhibition als auch bei einem KO von PI3K γ keine Wirkung auf den Kontraktionsprozess zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass die katalytische Untereinheit der PI3K γ bzw. dessen Kinase-Funktion entscheidend ist. Weitere Untersuchungen mit Kinase-defizienten Versuchstieren könnten diese Hypothese prüfen.

4.3 Die Bedeutung der PI3K γ für die Kontraktion

In Kardiomyozyten werden die Isoformen PI3K α und PI3K γ exprimiert. Für PI3K γ konnte bereits gezeigt werden, dass es auch unabhängig von einer TGF- β_1 -Stimulation einen negativen Einfluss auf die Kontraktion hat (Crackower et al. 2002; Ghigo und Li 2015).

Bei WT-Mäusen, die mit dem selektiven PI3K γ -Inhibitor AS605240 inkubierten, konnte jedoch keine positive Veränderung der Untersuchungswerte festgestellt werden. Sowohl die Zellverkürzung als auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit blieben unter Inhibitor-Inkubation unverändert. Wird PI3K γ von dem G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert folgt eine Anhäufung von PIP₃ und die Phosphorylierung von AKT/PKB (Stoyanov et al. 1995). Camps et al. zeigten durch Inhibitor-Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen, dass der selektive PI3K γ -Inhibitor AS605240 die ATP-Bindungsstelle von PI3K γ blockiert und damit die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT/PKB hemmt. Die Kinaseaktivität von PI3K γ wird also durch den Inhibitor eingeschränkt. Es wurden zusätzliche Versuche mit dem strukturell ähnlichen PI3K γ -Inhibitor AS605840 durchgeführt. Dieser zeigte jedoch ein geringeres zelluläres Potential, da AS605240 eine bessere Zellpermeabilität aufweist (Camps et al. 2005). Es ist demnach davon auszugehen, dass auch bei unseren Versuchen die Kinaseaktivität eingeschränkt wurde. Die Wirkung von PI3K γ auf das kardiovaskuläre System kann

jedoch auf kinaseabhängigen und -unabhängigen Wegen vermittelt werden. (Alloatti et al. 2004). Demnach könnte PI3K γ bei AS605240-Inkubation noch eine kinaseunabhängige Wirkung haben und mit anderen Proteinen in Interaktion treten. So hätte es noch die Fähigkeit die Kontraktion negativ zu beeinflussen, weshalb dementsprechend auch keine Veränderung der basalen Zellverkürzung zu sehen war. Um einen positiven Einfluss auf die Kontraktion zu nehmen, wäre es demnach nicht ausreichend nur die Kinaseaktivität von PI3K γ zu hemmen, sondern es bedarf einer vollständigen Deletion des Gens.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigend für diese Hypothese gezeigt werden, dass Kardiomyozyten von Mäusen mit einem PI3K γ -KO im Vergleich zu Kardiomyozyten von WT-Tieren eine stärkere basale Zellverkürzung aufweisen (siehe Abbildung 20). Auch Untersuchungen von Crackower et al. bestätigen, dass eine Deletion zu einer verbesserten Herzfunktion führt (Crackower et al. 2002). Eine Erklärung könnte eine Erhöhung des basalen cAMP-Spiegel sein, welcher bei PI3K γ -KO-Mäusen festgestellt wurde (Patrucco et al. 2004). PI3K γ gehört der Klasse 1B der PI3Ks an und wird durch eine G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert. Die katalytische Funktion der PI3K γ wird durch die Untereinheit p110 γ ausgeführt. Neben dieser besitzt PI3K γ die regulatorische Untereinheit p101 oder p84/87 (Castellano und Downward 2011). In Kardiomyozyten wird p84/87 exprimiert (Suire et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass PI3K γ in Kardiomyozyten über beide Untereinheiten kinaseunabhängig als Ankerprotein für PDE3B und die PKA fungiert und damit einen makromolekularen Komplex bildet (Baillie 2009; Voigt et al. 2006; Patrucco et al. 2004). Die PKA kontrolliert die PDE3B Aktivität, welche wiederum den Abbau von cAMP fördert. (Patrucco et al. 2004; Voigt et al. 2006; Hirsch et al. 2009). Folglich würde eine Deletion der PI3K γ bedeuten, dass die PDE3B an Aktivität verliert. Damit erklärt sich der Anstieg des cAMP-Spiegels bei PI3K γ -KO.

Steigt cAMP an, wird die PKA aktiviert, die neben der PDE-Aktivität auch den Calciumhaushalt der Kardiomyozyten reguliert. Eine Erhöhung der Calciumkonzentration ist die Voraussetzung für den Ablauf der Kontraktion. Die PKA aktiviert die Calciumkanäle des L-Typs. Bei Depolarisation der Membran kommt es dadurch zu einem vermehrten Calciumeinstrom. Weiterhin phosphoryliert die PKA den Ryanodin-Rezeptor und PLB (Endoh 2006). Dies resultiert zum einen in einer schnellen Calciumfreisetzung aus dem SR und zum andern in der Aktivierung der SERCA2A, die

ein schnelles Auffüllen der Calciumspeicher bei Relaxation ermöglicht. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels durch eine PI3K γ -Deletion wirkt sich daher positiv inotrop auf die Kontraktion aus.

Patrucco et al. führten Untersuchungen mit Mäusen durch, deren PI3K γ -Kinaseaktivität genetisch ausgeschaltet war (PI3K γ ^{KD}). Das Protein selbst war jedoch noch vorhanden, eine Bindung an die Untereinheiten weiterhin möglich und PI3K γ demnach in seiner kinaseunabhängigen Funktion nicht eingeschränkt. Der basale cAMP-Spiegel blieb in diesem Versuchsmodell unverändert (Patrucco et al. 2004). Dies zeigt, dass der positiv inotrope Effekt auf die basale Kontraktion, den wir bei einer PI3K γ -Deletion zeigen konnten, darauf zurückzuführen ist, dass PI3K γ nicht mehr kinaseunabhängig als Ankerprotein agieren konnte.

Da das basale Kontraktionsvermögen auch in den oben dargelegten Inhibitor-Versuchen nicht erhöht ist, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die kinaseunabhängige Funktion der PI3K γ nimmt. Demnach wäre bei einer PI3K γ -Inhibition mit AS605240 die Interaktion von PI3K γ mit PDE3B und weiteren Proteinen möglich und der cAMP-Spiegel unverändert. Daraus ergibt sich die Erklärung für die unterschiedliche basale Zellverkürzung, die wir bei PI3K γ -Inhibition und PI3K γ -KO sehen konnten. Bei dem Vergleich der Kontraktionsversuche muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den Inhibitor-Versuchen um einen Akut-Versuch handelt, wohingegen das Ausschalten der PI3K γ auf genetischer Ebene ein chronisches Versuchsmodell darstellt. Daher muss in Erwägung gezogen werden, dass bei den PI3K γ -KO-Mäusen gegebenenfalls Adaptationsmechanismen stattgefunden haben, die die Signalwege beeinflussen.

Neben PI3K γ wird in Kardiomyozyten die α -Isoform exprimiert. Häufig wird seine Rolle als Gegenspieler zur PI3K γ diskutiert. Bestätigend für diese These konnte dargelegt werden, dass eine Überexpression dieser Isoform, anders als eine PI3K γ -Überexpression, zu einer verbesserten Kontraktilität führt (Yano et al. 2008). Eine Überexpression einer dominant negativen PI3K α -Isoform reduziert die basale Kontraktion (Liang et al. 2010). Ein Knockout der PI3K γ führte in dieser Arbeit dagegen zu einem Anstieg der basalen Kontraktion. Dies bestätigt die entgegengesetzte Rolle der beiden Isoformen bei der Regulation der myokardialen Kontraktion.

Sun et al. zeigten, dass eine verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in Kardiomyozyten, zu einem verstärkten Calciumeinstrom durch die L-Typ-Calciumkanäle führt. Dies resultiert in einer gesteigerten Kontraktion. Durch Untersuchungen mit PI3K γ - und PI3K α -KO-Mäusen konnte die verstärkte inotrope Wirkung der PI3K α zugeschrieben werden (Sun et al. 2006). Weitere Studien bewiesen die Bedeutung der PI3K α für die Herzfunktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Mc Mullen et al. belegten, dass PI3K α eine Verbesserung der Herzfunktion bei physiologischer Belastung fördert. Gleichzeitig konnte bei Mäusen deren Herzen einem erhöhten pathologischen Druck ausgesetzt waren gezeigt werden, dass PI3K α vor Hypertrophie und dem damit verbundenen Funktionseinschränkung schützt (McMullen et al. 2007; McMullen et al. 2003). Dabei ist zu beachten, dass PI3K α aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110 α besteht und anders als PI3K γ durch den Tyrosinkinase-Rezeptor aktiviert wird. Es handelt sich demnach um einen anderen Aufbau und einen anderen Signalweg, was keinen direkten Vergleich beider Isoformen zulässt. Dennoch war ein diskutierter Ansatz für die Behandlung von Herzinsuffizienzen, die Inhibition der PI3K γ mit gleichzeitiger Überexpression von PI3K α zu kombinieren (Oudit und Kassiri 2007). Dabei sollte bedacht werden, dass eine Überexpression von PI3K α zur Hypertrophie führt (Shioi et al. 2000). Des Weiteren wird PI3K γ ein protektiver Effekt vor Arrhythmien zugeschrieben, welcher durch eine Inhibition verloren gehen könnte (Ghigo et al. 2012). Daher sind PI3K α und PI3K γ nicht als Gegenspieler anzusehen, sondern vielmehr als unabhängige Mediatoren verschiedener Signalwege. Das Ziel sollte es sein, durch zukünftige Arbeiten herauszufinden, wie man die positiven Aspekte beider Isoformen nutzen und dabei die negativen Effekte minimieren kann.

4.4 PI3K γ ist notwendig für die TGF- β ₁-induzierte Apoptose

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TGF- β ₁ in Kardiomyozyten die Chromatin-Kondensation fördert, was gleichbedeutend mit der späten Apoptose ist. Nach einer Inkubation der Kardiomyozyten mit AS605240 war jedoch kein signifikanter Anstieg der TGF- β ₁-induzierten Apoptose erkennbar.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von PI3K an der TGF- β ₁-induzierten Apoptose wurden bereits beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von PI3K durch

LY294002 und Wortmannin die TGF- β_1 -induzierte Apoptose hemmt (Warga 2015). Durch weitere Versuche mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnte bestätigt werden, dass die TGF- β_1 -induzierte Apoptose von PI3K abhängig ist (Brosinsky et al. 2021). Es wurden Kardiomyozyten mit TGF- β_1 stimuliert und anschließend ein Caspase-Assay durchgeführt, welches die Einleitung der Apoptose widerspiegelt. Durch ein Hoe-Assay wurde zusätzlich die Chromatin-Kondensation untersucht, die zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose stattfindet. In beiden Versuchen konnte gezeigt werden, dass LY29002 die TGF- β_1 -induzierte Apoptose vollständig verhindert. Es handelt sich dabei um einen Inhibitor, der alle PI3K-Isoformen hemmt. In dieser Arbeit wurde die Chromatin-Kondensation von Kardiomyozyten nach TGF- β_1 -Stimulation und Inkubation mit dem selektiven PI3K γ -Inhibitor AS605240 untersucht. Damit ergab sich die Vermutung, dass der Einfluss, den PI3K auf die TGF- β_1 -induzierte Apoptose hat spezifisch für die γ -Isoform ist.

Dies wurde eindeutig durch die Versuche mit PI3K γ -KO-Mäusen bestätigt, bei denen die Apoptoserate nach TGF- β_1 -Stimulation signifikant geringer war als bei stimulierten Wildtyp-Mäusen. Die vorliegenden Untersuchungen spezifizierten damit die oben aufgeführten Ergebnisse und zeigten eine Beteiligung der γ -Isoform am TGF- β_1 -Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass PI3K γ obligat für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose in Kardiomyozyten ist (siehe Abbildung 21).

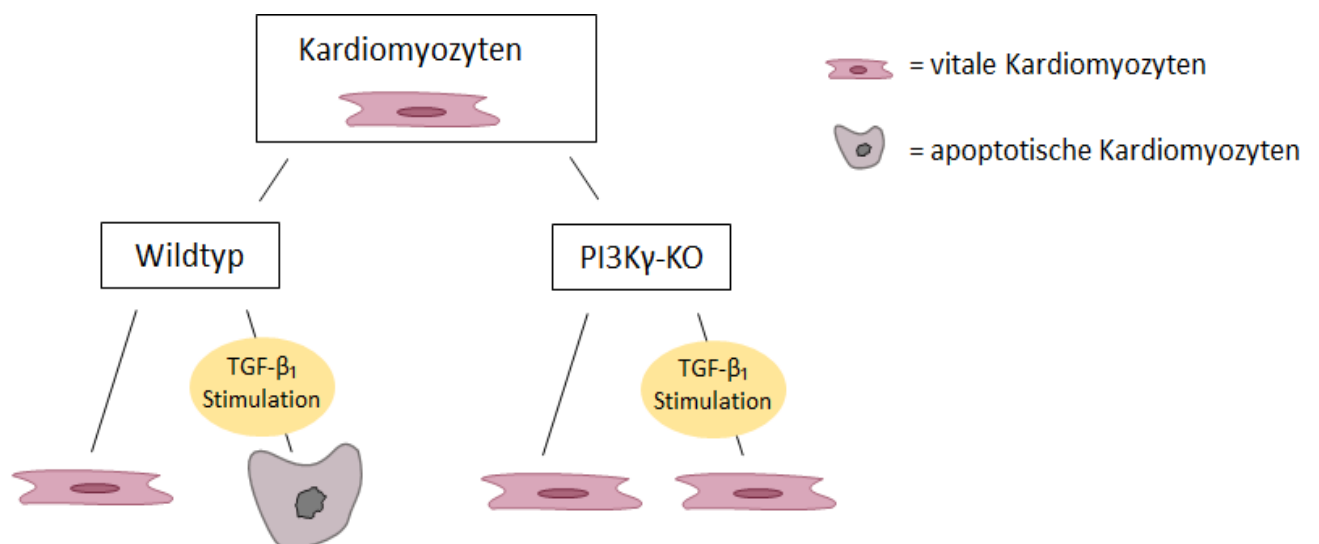


Abbildung 21: Abhängigkeit der TGF- β_1 -induzierten Apoptose in Kardiomyozyten von PI3K γ

In der Arbeit von Brosinsky et al. wurden durch LY294002 alle PI3K-Isoformen gehemmt (Brosinsky et al. 2021). Unsere Ergebnisse zeigen, dass PI3K γ als Mediator der TGF- β_1 -induzierten Apoptose fungiert, schließen aber nicht aus, dass dies auch für andere Isoformen gelten kann, insbesondere für das in Kardiomyozyten exprimierte PI3K α . Aki et al. konnten anhand von vaskulären Endothelzellen zeigen, dass ein PI3K α -KO die TGF- β_1 -induzierte Translokation von SMAD2 und SMAD3 in den Zellkern inhibiert (Aki et al. 2015). In Kardiomyozyten führt der Signalweg zur Apoptose (Schneiders et al. 2005). Dies lässt die Überlegung zu, dass auch PI3K α notwendig für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose in Kardiomyozyten ist. Mithilfe eines EMSAs konnten wir jedoch zeigen, dass PI3K γ in Kardiomyozyten, im Gegensatz zu PI3K α in Endothelzellen, keinen Einfluss auf die SMAD-Bindungsaktivität besitzt. Die α -Isoform wurde außerdem als Mediator der physiologischen Hypertrophie identifiziert, welche bei physiologischer Belastung protektiv wirkt und auch bei vorhandenen Kardiomyopathien positive Effekte hat (McMullen et al. 2007; Weeks et al. 2012). Schlüsse über den PI3K α -Signalweg in Endothelzellen sollten daher nicht ohne Weiteres mit dem PI3K γ -Signalweg in Kardiomyozyten gleichgesetzt werden. Untersuchungen mit selektiven PI3K α -spezifischen Inhibitoren oder einem PI3K α -KO könnten weitere Erkenntnisse über die Rolle der PI3K α in der TGF- β_1 -induzierten Apoptose liefern.

AKT/PKB gilt als wichtiges Target von PI3K und wirkt über diesen Signalweg anti-apoptotisch (Vivanco und Sawyers 2002). Dies steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, die darlegten, dass PI3K γ die TGF- β_1 -induzierte Apoptose vermittelt. Auch Zhang et al. zeigten durch den Einsatz von VO-OHPic, dass PI3K auch auf das Überleben von Kardiomyozyten einen positiven Effekt hat, was unseren Ergebnissen widerspricht. Es handelt sich dabei um einen PTEN-Inhibitor. PTEN gilt als Antagonist des PI3K/AKT Signalweges, der PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert. Die Inhibition des PI3K-Antagonisten führt in Kardiomyozyten zu einer Apoptoseresistenz und verbesserte in kultivierten Herzmuskelzellen das Überleben (Zhang et al. 2018). Bei einer PTEN-Inhibition werden jedoch alle PI3K-Isoformen gefördert, nicht nur PI3K γ . Die gegensätzliche Rolle des PI3K und TGF- β_1 -Signalweges zeigten ebenfalls Conery et al., die verdeutlichten, dass AKT Verbindungen mit SMAD3 eingeht und damit dessen Phosphorylierung und Aktivierung vermindert (Conery et al. 2004). Anhand ihrer Ergebnisse schlossen sie, dass die Sensitivität von Zellen gegenüber der TGF- β_1 -Stimulation von dem Verhältnis von SMAD3 zu AKT abhängt. In Zellen mit einem hohen SMAD3-Spiegel kann ein großer

Anteil in den Nukleus translozieren und damit die Apoptose auslösen. Überwiegt AKT, wird SMAD3 von diesem gebunden und TGF- β_1 kann die Apoptose nicht induzieren. Bei einer PI3K-Inhibition oder einem PI3K γ -KO würde man dementsprechend eine Abnahme der AKT-Aktivität erwarten und eine verstärkte Translokation von SMAD3 in den Nukleus. Anhand von Retardation-Assays konnten wir zeigen, dass TGF- β_1 zu einer Akkumulation von SMAD-Proteinen im Nukleus führt. Dies blieb jedoch unverändert bei einer PI3K-Inhibition oder einem PI3K γ -KO. Demensprechend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass der Einfluss den PI3K γ auf die Apoptose nimmt, nicht auf eine Veränderung der SMAD-Bindungsaktivität im Nukleus zurückzuführen ist. Es ist zu beachten, dass die Assoziation von AKT und SMAD3 in den Versuchen von Conery et al. unabhängig von der Kinaseaktivität von AKT und damit auch unabhängig von PI3K stattfand. Die Bindung von AKT und SMAD3 war reversibel und eine Stimulation mit TGF- β_1 konnte die Assoziation leicht auflösen. Des Weiteren wurden ausschließlich in vitro Versuche mit schnell proliferierenden Zellkulturen durchgeführt. Die Untersuchungen der Apoptose in dieser Arbeit wurden dagegen mit isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten und Mäusen durchgeführt. Es sollte beachtet werden, dass der Zellzyklus bei nicht teilungsfähigen Kardiomyozyten ein anderer ist als in schnell proliferierenden Zellkulturen. Eine TGF- β_1 -Stimulation kann verschiedene Effekte auslösen und sowohl zum Wachstumsstillstand als auch zur Apoptose führen (Massagué 1998). Dies zeigt, dass Ergebnisse von Untersuchungen unterschiedlicher Spezies nur begrenzt vergleichbar sind. Dies sollte auch Beachtung finden bei der Übertragung unserer Ergebnisse, die mit Kardiomyozyten von Ratten und Mäusen erzielt wurden, auf humane Kardiomyozyten.

Weitere Arbeiten belegen, dass durchaus Parallelitäten zwischen dem TGF- β_1 und PI3K-Signalweg bestehen. Lamouille und Derynck wiesen nach, dass TGF- β_1 und PI3K in der Entstehung von malignen Entartungen nicht entgegengesetzt wirken, sondern die Signalwege zusammenhängen und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen fördern. Es konnte gezeigt werden, dass auf eine TGF- β_1 -Stimulation die Aktivierung des PI3K-Signalweges folgt. Dies führt zu einer AKT-Aktivierung und damit zu einer schnellen Phosphorylierung von mTORC1. TGF- β_1 fördert dadurch das Zellwachstum und die Proteinsynthese (Lamouille und Derynck 2007). Diese Untersuchungen wurden jedoch an Zellkulturen mit Drüsen-Epithelzellen und Keratinozyten durchgeführt. Diese besitzen eine hohe Proliferationsrate und einen anderen Zellzyklus als Kardiomyozyten.

Die Ergebnisse sind daher nicht gänzlich auf Kardiomyozyten übertragbar. Des Weiteren war der Gegenstand dieser Untersuchung der mTORC-Signalweg. Die Ergebnisse belegen somit zwar einen Zusammenhang zwischen PI3K und dem TGF- β_1 -Signalweg, können aber nicht gänzlich auf apoptotische Prozesse projiziert werden.

Zwischen der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K und dem TGF- β -Rezeptor II liegt eine konstitutive Bindung vor. Erfolgt eine TGF- β_1 -Stimulation reagiert ALK5 mit p85 und aktiviert nachfolgend AKT. Dieses hemmt TSC, welches seine inhibitorische Wirkung auf mTORC1 verliert (Yi et al. 2005). Auch diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen mit Zellkulturen erzielt und sind daher nicht auf Kardiomyozyten übertragbar. Die regulatorische Untereinheit p85 ist außerdem ein Bestandteil der PI3K-Isoformen aus der Klasse 1A. Gegenstand unserer Untersuchungen war die Isoform PI3K γ aus der Klasse 1B, welche die regulatorische Untereinheit p101 oder p84/87 besitzt (Stephens et al. 1997; Suire et al. 2005). Inwieweit auch diese mit den TGF- β_1 -Rezeptoren assoziiert sind, ist nicht geklärt.

Neben der Apoptose existieren weitere Formen des Zelltods. In dieser Arbeit wurde anhand einer Chromosomenfärbung auch die Nekroserate von Kardiomyozyten nach TGF- β_1 -Stimulation untersucht. Die Stimulation bewirkte, dass deutlich weniger Kardiomyozyten nekrotisch wurden. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, dass TGF- β_1 in Kardiomyozyten einen Signalweg induziert, der zur Apoptose führt, bevor die Zellen nekrotisch werden. Der Anteil von nekrotischen Zellen verringert sich dadurch bei TGF- β_1 -Stimulation zugunsten der Apoptose. Im Hoe-Assay wurde durch die Beurteilung der Chromatin-Färbung des Weiteren deutlich, dass ein PI3K γ -KO zu einer signifikanten Reduktion der Nekroserate führt, wohingegen die Inhibition durch AS605240 keine signifikante Änderung herbeiführte. Die Rolle von PI3K in anderen Formen des Zelltods als der Apoptose, ist nicht genau erklärt. Durch Versuche mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnte gezeigt werden, dass PI3K die Nekroptose vermittelt (Ono et al. 2004; Liu et al. 2009). Hu et al. konnten PI3K α als Mediator der TNF-induzierten Nekroptose identifizieren (Hu et al. 2020). Diese Versuche wurden bisher jedoch nur in vitro durchgeführt und konzentrierten sich nicht auf PI3K γ . Daher gilt es zu klären, ob auch PI3K γ einen Einfluss auf weitere Formen des Zelltods nimmt.

4.5 Der PI3K γ -Signalweg existiert unabhängig von dem SMAD-Signalweg

Die Aktivierung von PI3K durch TGF- β_1 stellt einen von mehreren non-SMAD-Signalwegen dar. Diese Signalwege sind jedoch nicht unabhängig voneinander und nicht unabhängig von dem SMAD-Signalweg zu betrachten, da eine gegenseitige Einflussnahme besteht (Zhang et al. 2013; Zhang 2017). Die Proteinkinasen, die auf den non-SMAD Signalwegen aktiviert werden, sind in der Lage ebenfalls R-SMADs zu phosphorylieren und deren Aktivität zu kontrollieren (Kretschmar et al. 1999; Engel et al. 1999).

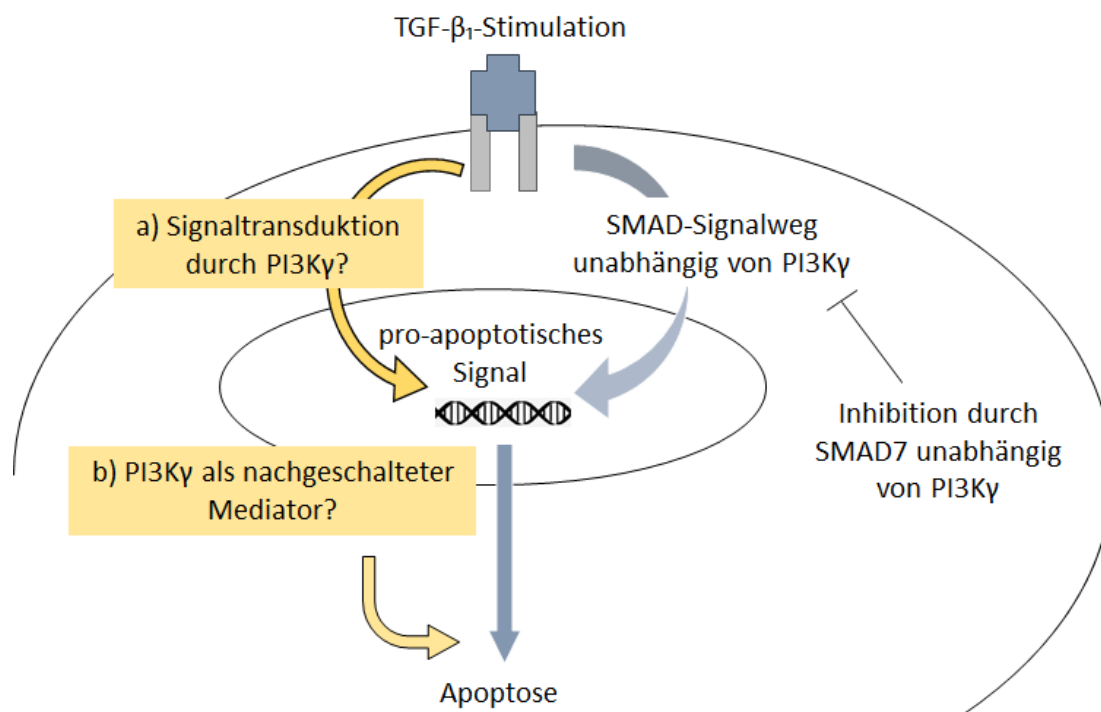


Abbildung 22: Der Apoptose-auslösende TGF- β_1 -induzierte SMAD-Signalweg läuft unabhängig von PI3K γ ab. Erklärungsansätze wie PI3K γ unabhängig vom SMAD-Signalweg als Mediator für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose wirken kann, sind gelb markiert a) als weiteres Signalmolekül aktiviert durch den TGF- β_1 -Rezeptor beispielsweise durch Phosphorylierung notwendiger Transkriptionsfaktoren b) post-translational durch Interaktion mit Apoptose-auslösenden TGF- β_1 -Targets

Heger et al. zeigten, dass die TGF- β_1 -induzierte Apoptose von einer SMAD-Aktivierung abhängig ist (Heger et al. 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zusätzlich auch die PI3K γ an der TGF- β_1 -induzierten Apoptose beteiligt ist. Daher ergab sich die Vermutung, dass die TGF- β_1 -induzierten Effekte von PI3K γ im Zusammenhang mit dem SMAD-Signalweg stehen, so wie es bei anderen non-SMAD-Signalwegen der Fall ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der SMAD-Signalweg unabhängig von PI3K γ

existiert bzw. die Signaltransduktion der PI3K γ unabhängig von SMAD-Proteinen abläuft. PI3K γ ist jedoch, ebenso wie der SMAD-Signalweg, ein obligater Mediator für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose. Der Zusammenhang von PI3K γ und dem SMAD-Signalweg, sowie mögliche Erklärungsansätze wie PI3K γ die TGF- β_1 -induzierte Apoptose SMAD-unabhängig vermittelt, sind in Abbildung 22 dargestellt.

4.5.1 PI3K γ hat keinen Einfluss auf die SMAD-Kaskade

Eine Inhibition aller PI3K-Isoformen verhindert die TGF- β_1 -induzierte SMAD2-Phosphorylierung (Bakin et al. 2000). Dies wurde in vitro mit einer Zellreihe von Brustepithelzellen untersucht. Bakin et al. analysierten anhand eines Immunoblots, dass die TGF- β_1 -induzierte SMAD2-Phosphorylierung ihr Maximum nach einer Stunde Inkubationszeit erreicht. Die zusätzliche Inkubation mit LY294002 führte zu einer deutlichen Verringerung der Phosphorylierung. Der Gesamtanteil des Proteins blieb dabei unverändert. Weitere Zusammenhänge zwischen dem TGF- β_1 und PI3K-Signalweg konnten in Endothelzellen identifiziert werden. Sabater et al. zeigten, dass eine kombinierte Aktivierung von PI3K und SMAD2 zu einer vermehrten Zellproliferation von Endothelzellen der Kornea führt (Sabater et al. 2017). Diese beiden Studien belegen ein Zusammenwirken von PI3K und dem TGF- β_1 -induzierten SMAD-Signalweg in Endothelzellen. Da wir feststellen konnten, dass PI3K γ auch in Kardiomyozyten ein Mediator des TGF- β_1 -Signalweges ist, war es Ziel dieser Arbeit zu klären, ob ebenfalls ein Zusammenhang zwischen PI3K γ auch dem SMAD-Signalwege in Kardiomyozyten besteht.

Folgend auf die Phosphorylierung und Komplexbildung der SMAD-Proteine findet ihre Translokation in den Nukleus statt, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren. Brosinsky et al. zeigten durch Untersuchungen der SMAD-Bindungsaktivität im Nukleus, dass eine Inhibition von PI3K durch LY294002 in Kardiomyozyten zu einer ausbleibenden SMAD-Aktivierung nach TGF- β_1 -Stimulation führte (Brosinsky et al. 2021). Damit wurde bestätigt, dass PI3K in Kardiomyozyten nach einer TGF- β_1 -Stimulation Einfluss auf die Bindungsaktivität der SMADs an die DNA nimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde PI3K γ selektiv durch AS605240 gehemmt. Daraufhin ließ sich keine Veränderung der SMAD2-Expression oder dessen Phosphorylierung nach TGF- β_1 -Stimulation erkennen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sowohl die

SMAD-Proteine als auch PI3K γ notwendig sind für die TGF- β -induzierte Apoptose, die Signalwege jedoch unabhängig voneinander existieren. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass der pro-apoptotische TGF- β_1 -induzierte SMAD-Signalweg zwar unabhängig von PI3K γ stattfindet, PI3K γ dennoch für die spätere Signaltransduktion des apoptotischen Signals notwendig ist.

Des Weiteren scheint es, dass in Endothelzellen eine andere PI3K-Isoform für die TGF- β_1 -induzierte SMAD2-Phosphorylierung notwendig ist als PI3K γ . Aki et al. zeigten an Endothelzellen, dass eine Deletion des PI3K α -Gens die SMAD2 und SMAD3-Phosphorylierung verhindert. Bei Epithelzellen oder vaskulären Muskelzellen, war dies nicht festzustellen (Aki et al. 2015). Sie zogen den Schluss, dass die SMAD2 bzw. SMAD3-Phosphorylierung nicht in allen Zelltypen PI3K α -abhängig ist. Als weitere Erklärung stellen Aki et al. die Hypothese auf, dass die Rolle der PI3K α in der SMAD-Phosphorylierung bei dessen Deletion von der Isoform PI3K β übernommen wird. Neben PI3K γ gilt PI3K α als Isoform, die verstärkt in Kardiomyozyten exprimiert wird. Daher ist es möglich, dass PI3K α nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in Kardiomyozyten die Phosphorylierung der SMAD-Proteine beeinflusst. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass PI3K α diese Rolle in Endothelzellen einnimmt, da es ein Signalmolekül bei endozytotischen Prozessen ist, welche in anderen Zelltypen wie Kardiomyozyten von untergeordneter Relevanz sind. Des Weiteren nehmen PI3K α und PI3K γ unterschiedliche Stellungen in der Signaltransduktion von Kardiomyozyten ein. Während eine Überexpression von PI3K α zu einer Wachstumssteigerung führt (Shioi et al. 2000), moduliert PI3K γ die Kontraktion (Crackower et al. 2002). Daher ist eine differenzierte Betrachtung beider Signalwege notwendig. Um den Einfluss von PI3K α auf den TGF- β_1 -induzierten SMAD-Signalweg abschließend definieren zu können, sind weitere Untersuchungen mit adulten Kardiomyozyten notwendig. In dieser Arbeit wird ausgeschlossen, dass es die γ -Isoform ist, die Einfluss auf die SMAD-Kaskade in Kardiomyozyten nimmt. Es besteht jedoch ebenso die Möglichkeit, dass keine der Isoformen diese Kaskade beeinflusst und die Signalwege unabhängig voneinander existieren.

Neben der SMAD-Phosphorylierung, die den Beginn des SMAD-Signalweges darstellt, untersuchten Aki et al. auch die anschließende Translokation der Proteine in den Zellkern. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung in Endothelzellen durchgeführt. Sie stellten fest, dass PI3K α bzw. deren Kinaseaktivität für die nukleare Akkumulation von

SMAD2/3 notwendig ist (Aki et al. 2015). In dieser Arbeit wurde die SMAD-Bindungsaktivität anhand von Kernextrakten adulter Kardiomyozyten untersucht. Die Ergebnisse wurden genutzt, um den Einfluss von PI3K γ auf die Translokation von SMAD2/3 nach TGF- β_1 -Stimulation zu beurteilen. Die Ergebnisse zeigten, dass weder eine PI3K γ -Inhibition noch ein PI3K γ -KO die TGF- β_1 -induzierte SMAD-Bindung im Nukleus beeinflusst. In den Versuchen von Brosinsky et al. wurden durch LY294002 alle PI3K-Isoformen gehemmt, was zu einer ausbleibenden SMAD-Bindung führte. Demnach muss eine andere Isoform als PI3K γ Einfluss auf die SMAD-Bindungsaktivität nehmen. Da Aki et al. dies für PI3K α in Endothelzellen zeigen konnten und diese Isoform auch in Kardiomyozyten exprimiert wird, ergibt sich die Vermutung, dass PI3K α für die SMAD-Bindung in Kardiomyozyten notwendig sein könnte.

4.5.2 PI3K γ hat keinen Effekt auf die SMAD7-Expression

SMAD7 gilt als TGF- β_1 -Target-Gen, welches eine negative Rückkopplung darstellt, indem es die Einleitung des SMAD-Signalweges sowie die Expression von TGF- β_1 -Zielgenen inhibiert. Da die SMAD7-Expression nach TGF- β_1 Stimulation erhöht ist, war ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer selektiven PI3K γ -Inhibition auf die SMAD7-Expression zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die SMAD7-Expression nach TGF- β_1 -Stimulation unabhängig von PI3K γ verläuft.

Auch Edlund et al. zeigten bereits, dass eine PI3K-Inhibition keine Auswirkungen auf die SMAD7-Expression hat und bestätigen damit die hier dargelegten Ergebnisse (Edlund et al. 2004). Bei den Versuchen wurden jedoch Zellen des Prostatakarzinoms verwendet. Eine Übertragung der Ergebnisse auf Kardiomyozyten ist daher nur eingeschränkt möglich. Brosinsky et al. führten dagegen Arbeiten mit Kardiomyozyten durch. Sie zeigten, dass die SMAD7-Expression in Kardiomyozyten nach TGF- β_1 -Stimulation unbeeinflusst von dem PI3K-Inhibitor LY294002 bleibt (Brosinsky et al. 2021) und bestätigen damit unsere Ergebnisse. Anzumerken ist jedoch, dass durch LY294002 sämtliche PI3K-Isoformen gehemmt werden. In dieser Arbeit wurde selektiv PI3K γ inhibiert und damit ausgeschlossen, dass es einen Einfluss auf die mRNA-Expression von SMAD7 nach TGF- β_1 -Stimulation hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen jedoch nicht aus, dass in Kardiomyozyten trotzdem eine gegenseitige Einflussnahme der Signalwege besteht. Für andere Zelltypen konnte das bereits gezeigt werden. Xie et al. stellten dar, dass eine TGF- β_1 -Stimulation in Zellen des hepatozellulären Karzinoms zu einer vermehrten Expression der microRNA-216a/217 führt (Xia et al. 2013). Diese hemmt PTEN, fördert damit den PI3K/Akt-Signalweg und reguliert gleichzeitig die SMAD7-Expression herunter. Daraus ergibt sich die Annahme, dass sich diese Signalwege konträr gegenüberstehen und sich gegenseitig beeinflussen.

Des Weiteren wird durch unsere Arbeit nicht ausgeschlossen, dass PI3K γ einen Einfluss auf andere Zielgene des TGF- β_1 -Signalweges nimmt. Von anderen TGF- β_1 -Targets ist bekannt, dass eine Wechselwirkung mit PI3K stattfindet. Die Aktivität des Promotors für das Zielgen Kollagen1 lässt sich durch eine PI3K-Inhibition mit LY294002 herunterregulieren (Runyan et al. 2004). Brosinsky et al. bestätigten dies für Kardiomyozyten. Nach einer Inkubation mit LY294002 war die mRNA-Expression von Kollagen1 signifikant herunterreguliert (Brosinsky et al. 2021). Inwieweit dies auch spezifisch für PI3K γ gilt, ist noch nicht geklärt.

4.6 Fazit und Ausblick

Die Bedeutung von PI3K für unterschiedliche Signalwege konnte in zahlreichen Studien belegt werden. Sie sind unter anderem an Signalwegen beteiligt, die die Proliferation, Differenzierung sowie den Metabolismus von Zellen regulieren. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit gelten die PI3K-Isoformen als aussichtsreiche pharmakologische Targets. Es besteht die Möglichkeit der selektiven Inhibition sowie der kombinierten Inhibition mehrerer Isoformen. Aufgrund der Wirkung, die PI3K auf inflammatorische Prozesse hat, besitzen PI3K-Inhibitoren für die Behandlung von rheumatoider Arthritis oder dem Lupus erythematodes ein therapeutisches Potenzial (Camps et al. 2005; Maxwell et al. 2012). Die bisher zugelassenen Therapeutika Idelalisib, Duvelisib und Alpelisib bestätigen dies. Es handelt sich dabei um einen PI3K δ -, PI3K δ/γ - und einen PI3K α -Inhibitor.

Gegenstand dieser Arbeit ist vornehmlich PI3K γ . Ein Knockout dieser Isoform inhibiert Makrophagen und die Neutrophilen-Migration und stellt daher eine Therapiemöglichkeit für chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen dar (Cushing et al. 2012).

Bisher wurde lediglich der PI3K γ -selektive Inhibitor IPI-549 in die klinische Prüfung für die Behandlung verschiedener Karzinome aufgenommen (Evans et al. 2016).

Die entwickelten Therapieansätze, die in die klinische Prüfung eingegangen sind, beschränken sich vornehmlich auf die Behandlung verschiedener Malignome. Die Isoform PI3K γ wird jedoch ebenfalls in Kardiomyozyten exprimiert und eine Überexpression derselben trägt zu kardialer Dysfunktion bei (Rosenkranz et al. 2002). Einen Angriffspunkt der Inhibitoren stellt die ATP-Bindungsstelle von PI3K γ dar, welche sich in der katalytischen Untereinheit befindet. Die Region ist bei allen Isoformen der PI3K ähnlich und stark konserviert, was eine selektive Hemmung erschwert (Taylor et al. 1999). Auch der verwendete Inhibitor AS605240 hemmt PI3K γ durch eine Blockade der ATP-Bindungsstelle in der katalytischen Untereinheit (Camps et al. 2005). Eine Inhibition der PI3K γ durch AS605240 konnte die Effekte der TGF- β_1 -induzierten Apoptose sowie die dadurch vermittelte Kontraktionseinschränkung mindern. Die vollständige Deletion erhöhte im Gegensatz zum Inhibitor auch das basale Kontraktionsvermögen. Außerdem war bei einem PI3K γ -KO keine Apoptose-Induktion durch TGF- β_1 erkennbar. Dennoch bietet eine Inhibition mit AS605240 einen vielversprechenden Ausblick für die Funktionsverbesserung bei Herzinsuffizienz. Einen weiteren möglich Ansatz könnte die Blockade der regulatorischen Untereinheit p84/87 darstellen, welche in Kardiomyozyten exprimiert wird (Nürnberg und Beer-Hammer 2019). Durch AS605240 wird lediglich die katalytische Untereinheit gehemmt. Eine zusätzliche Inhibition der regulatorischen Komponente könnte ähnliche Ergebnisse wie ein vollständiger Knockout hervorbringen. Mit dem Phosphopeptid 1257 (P-1257) ist bereits ein Inhibitor der regulatorischen Untereinheit p85 bekannt. Er stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Tumorbehandlung dar (Suenaga et al. 2005; Folgiero et al. 2012). Es handelt sich dabei zwar um die Inhibition der regulatorischen Untereinheit der Klasse IA PI3Ks, zeigt aber, dass die Möglichkeit einer selektiven Hemmung der regulatorischen Untereinheit besteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität, damit ebenso die Kinaseaktivität, von PI3K γ zum G-Protein-gekoppelten Rezeptor bei Präsenz der regulatorischen Untereinheit p101 stark zunimmt (Stephens et al. 1997). Damit könnte eine Inhibition von p84/87 für eine eingeschränkte Kinaseaktivität sorgen und die Wirkung von PI3K γ damit verringert werden.

In dieser Arbeit konnte weiterhin dargestellt werden, dass PI3K γ die Kontraktion adulter Kardiomyozyten negativ beeinflusst. Eine Inhibition der Isoform stellt daher einen therapeutischen Ansatz dar, um die Kontraktionskraft von Kardiomyozyten zu verstärken. Neben PI3K γ wird auch die α -Isoform in Kardiomyozyten exprimiert. Eine vorübergehende Überexpression verstärkt die myokardiale Kontraktionskraft, wohingegen dessen Inhibition zu einer verringerten Anzahl der spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt und damit die Kontraktionskraft beeinträchtigt (Yano et al. 2008). Ein diskutierter Therapieansatz zur Verbesserung der kontraktile Funktion stellt daher die Inhibition von PI3K γ kombiniert mit einer Überexpression von PI3K α dar (Oudit und Kassiri 2007). Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass ein PI3K γ -KO zu einer Hyperphosphorylierung der L-Typ-Calciumkanäle und PLB führen kann. Aufgrund nachfolgender Calciumfreisetzung fördert dies Spontanerregungen und ventrikuläre Arrhythmien, die bei bestehender Herzinsuffizienz eine Haupttodesursache darstellen (Perino et al. 2011; Ghigo et al. 2012).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von PI3K γ für den TGF- β_1 -Signalweg dargelegt. Dieser sorgt im Zuge des Remodelings für kardiale Umbauprozesse, die zu Funktionseinschränkungen führen (Schultz et al. 2002). PI3K γ vermittelt sowohl die kontraktionshemmende Wirkung von TGF- β_1 als auch die TGF- β_1 -induzierte Apoptose. Im Verlauf der Herzinsuffizienz folgt auf die AngII-Freisetzung eine vermehrte TGF- β_1 -Expression, die zur Progredienz der Herzinsuffizienz beiträgt (Rosenkranz 2004; Schröder et al. 2006). Seropian et al. zeigten bereits, dass sich eine PI3K γ -Inhibition durch AS605240 zu einem verminderten Remodeling nach Myokardinfarkt führt (Seropian et al. 2010). Da auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass PI3K γ die schädliche Wirkung von TGF- β_1 vermittelt, stellt eine selektive PI3K γ -Inhibition einen potenziellen Therapieansatz in Bezug auf Herzinsuffizienzen und den damit verbundenem Remodeling-Prozess dar. Weiterhin wurde gezeigt, dass der TGF- β_1 -induzierte PI3K γ -Signalweg unabhängig von dem kanonisch aktivierten SMAD-Signalweg besteht. Auch über diesen werden apoptotische Prozesse eingeleitet (Schneiders et al. 2005). Eine kombinierte Inhibition beider Signalwege könnte die Apoptoserate von Kardiomyozyten während des Remodelings vermindern. Für PI3K konnte jedoch ebenfalls eine kardioprotektive Wirkung im Zuge des Remodeling-Prozesses nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Förderung des PI3K/AKT-Signalweges und die Inhibition des PI3K-Antagonisten PTEN

zu einer Apoptoseresistenz führt (Zhu et al. 2021). Eine PTEN-Inhibition bewirkt des Weiteren eine verringerte Fibrose des kardialen Gewebes, zu der es ebenfalls während des Remodelings kommt (Zhuang et al. 2022). Auch in der Methodik der ischämischen Präkonditionierung wird der Einfluss von PI3K diskutiert. Dabei wird das Herz kurzen subletalen ischämischen Perioden ausgesetzt und anschließend reperfundiert. Ein Knockout von PI3K γ führte zu einer geringeren funktionellen Erholung sowie einer verstärkten Gewebsverletzung nach ischämischen Perioden. Dagegen waren Herzen von Mäusen mit einem PI3K α -Knockout resistent gegenüber Ischämie-induzierten Schäden (Ban et al. 2008). Versuche mit Doppelmutanten in denen sowohl PI3K α und PI3K γ deletiert waren, zeigten ebenfalls eine verbesserte Regeneration (McLean et al. 2013). Daher bietet eine selektive PI3K α -Deletion ebenfalls einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung ischämischer Herzerkrankungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der PI3K-Signalweg und seine nachgeschalteten Moleküle die Herzfunktion vielfältig beeinflussen. In Kardiomyozyten werden die Isoformen PI3K α und PI3K γ exprimiert, die in physiologischen und pathologischen Zuständen die Herzfunktion sowohl verbessern als auch zu einer Progredienz einer Insuffizienz beitragen können. Zukünftig gilt es genauer zu definieren, inwieweit die kardioprotektiven Eigenschaften von PI3K bei einer selektiven Inhibition der einzelnen Isoformen beibehalten werden können und wie das therapeutische Potenzial dieses Signalweges für die Behandlung einer Herzinsuffizienz genutzt werden kann.

5 Zusammenfassung

Der Wachstumsfaktor TGF- β_1 trägt entscheidend zu der Entstehung und Progression einer Herzinsuffizienz bei. Im Zuge des kardialen Remodelings fördert TGF- β_1 Umbauprozesse, die Hypertrophie, Fibrose und Apoptose einschließen. Seine Wirkung wird u.a. über den SMAD-Signalweg vermittelt. Über einen non-SMAD-Signalweg wird des Weiteren die PI3K aktiviert, dessen Isoform PI3K γ in Kardiomyozyten exprimiert wird. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit PI3K γ an dem TGF- β_1 -induzierten Funktionsverlust sowie an der Apoptose von Kardiomyozyten beteiligt ist. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob PI3K γ Einfluss auf die TGF- β_1 -vermittelte Aktivierung des SMAD-Signalweges nimmt.

Um die kontraktile Funktion zu beurteilen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten im elektrischen Feld stimuliert. Die Untersuchungen von Kardiomyozyten der Wistar Ratte, die mit TGF- β_1 stimuliert wurden, legten einen deutlichen Kontraktilitätsverlust im Vergleich zu den Kontrollzellen dar. Dieser Effekt von TGF- β_1 wurde durch eine Inhibition der PI3K γ durch AS605240 aufgehoben. Bestätigend konnte dargelegt werden, dass TGF- β_1 bei PI3K γ -KO-Mäusen keinen Effekt auf das Ausmaß der Kontraktion von isolierten Kardiomyozyten hat. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ein Knockout der PI3K γ zu einer Erhöhung der basalen Kontraktion führt. Um die Fragestellung zu klären, inwieweit PI3K γ zur TGF- β_1 -induzierten Apoptose beiträgt, wurde die Chromatin-Kondensation als Nachweis der späten Apoptose genutzt. Es wurde gezeigt, dass die pro-apoptotische Wirkung von TGF- β_1 durch die Inhibition von PI3K γ reduziert und durch einen Knockout vollständig supprimiert wird. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass PI3K γ sowohl die verminderte Kontraktilität als auch die TGF- β_1 -induzierte Apoptose vermittelt. Anhand von Western Blots und Untersuchungen der SMAD-Bindungsaktivität, die mit Zytosol- und Kernextrakten von Kardiomyozyten der Wistar Ratten durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass PI3K γ keinen Einfluss auf die Expression oder Aktivierung der SMAD-Proteine hat. Die Einleitung des SMAD-Signalweges durch TGF- β_1 findet dementsprechend unabhängig von PI3K γ statt.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass PI3K γ ein Mediator der destruktiven kardialen Effekte von TGF- β_1 ist und damit zur Progression der Herzinsuffizienz beiträgt. Eine Inhibition dieser Kinase stellt daher ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel in der Behandlung der Herzinsuffizienz dar.

6 Summary

TGF- β_1 is a growth factor that contributes to the development and progression of heart failure. This cytokine promotes cardiac remodeling including hypertrophy, fibrosis, and apoptosis. The effects are usually mediated by the SMAD signaling pathway. In addition, TGF- β_1 activates non-SMAD signaling pathways mediated by kinases such as PI3K. Its isoform PI3K γ is highly expressed in cardiomyocytes. The aim of this work was to investigate if PI3K γ is involved in the TGF- β_1 -induced apoptosis and contractile dysfunction of cardiomyocytes. Moreover, it was examined whether PI3K γ influences the TGF- β_1 -mediated activation of the SMAD signaling pathway.

To measure contractile function, ventricular cardiomyocytes were isolated and stimulated in an electric field. Investigating cardiomyocytes from Wistar rats incubated with TGF- β_1 revealed a significant loss of contractility compared to control cardiomyocytes. Additionally, inhibition of PI3K γ by the selective inhibitor AS605240 prevented this effect. In PI3K γ -KO mice, TGF- β_1 was confirmed to have no effect on the extent of contraction in the absence of PI3K γ . Furthermore, it was shown that a loss of PI3K γ leads to an increase of basal contractility. To answer the question whether PI3K γ contributes to TGF- β_1 -induced apoptosis, chromatin condensation was used as marker for late apoptosis. The pro-apoptotic effect of TGF- β_1 was reduced by inhibition of PI3K γ through AS605240. In PI3K-KO mice, TGF- β_1 had no effect on apoptosis, indicating that PI3K γ is necessary for TGF- β_1 -induced apoptosis. Thus, PI3K γ mediates both decreased contractility and TGF- β_1 -induced apoptosis. However, based on Western Blots and retardation assays performed with cytosolic and nuclear extracts of cardiomyocytes from Wistar rats, it was shown that PI3K γ has no influence on the expression or activation of SMAD proteins. Accordingly, the initiation of the SMAD signaling pathway by TGF- β_1 takes place independently of PI3K γ .

In conclusion, PI3K γ is a mediator of the deleterious cardiac effects of TGF- β_1 and thereby contributes to the progression of heart failure. An inhibition or knockout of this kinase is therefore a desirable pharmacological goal in the treatment of heart failure.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Circulus vitiosus bei chronischer Herzinsuffizienz.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrinsischen Apoptoseweges.....	6
Abbildung 3: Schema des intrinsischen Apoptoseweges	7
Abbildung 4: Darstellung des TGF- β_1 -induzierten SMAD-Signalweges	12
Abbildung 5: Strukturformel von Phosphatidylinositol	16
Abbildung 6: schematische Darstellung der Untereinheiten der PI3K γ	23
Abbildung 7: Relative Zellverkürzung adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF- β_1 und/oder AS605240	62
Abbildung 8: Relaxationsgeschwindigkeit adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF- β_1 und/oder AS605240.....	63
Abbildung 9: Kontraktionsgeschwindigkeit adulter Kardiomyozyten von WT-Ratten unter Stimulation mit TGF- β_1 und/oder AS605240.....	63
Abbildung 10: Relative Zellverkürzung adulter ventrikulärer Maus-Kardiomyozyten bei WT- und PI3K γ -Knockout-Mäusen nach Inkubation mit TGF- β_1	64
Abbildung 11: Apoptoseinduktion adulter Kardiomyozyten der Maus nach Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240 und zusätzlicher TGF- β_1 -Stimulation.....	66
Abbildung 12: Nekroserate adulter Kardiomyozyten der Maus nach Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240 und zusätzlicher TGF- β_1 -Stimulation.....	67
Abbildung 13: Apoptoseinduktion adulter Kardiomyozyten von WT-Mäusen und PI3K γ -KO-Mäusen nach TGF- β_1 -Stimulation	68
Abbildung 14: Nekroserate adulter Kardiomyozyten von WT-Mäusen und PI3K γ -KO-Mäusen nach TGF- β_1 -Stimulation	69
Abbildung 15: Analyse der SMAD2-Expression in adulten Kardiomyozyten der Ratte nach Stimulation mit TGF- β_1 und/oder dem PI3K γ -Inhibitor AS605240	70
Abbildung 16: Analyse der SMAD2-Phosphorylierung in adulten Kardiomyozyten der Ratte nach Stimulation mit TGF- β_1 und/oder dem PI3K γ -Inhibitor AS605240	72
Abbildung 17: Analyse der SMAD-Bindungsaktivität in adulten Kardiomyozyten der Ratte nach Stimulation mit TGF- β_1 und/oder dem PI3K γ -Inhibitor AS605240.....	73
Abbildung 18: SMAD-Bindungsaktivität in Kardiomyozyten von WT- und PI3K γ -Knockout-Mäusen nach TGF- β_1 -Stimulation.....	75
Abbildung 19: mRNA-Expression von SMAD7 in Kardiomyozytend der Ratte nach TGF- β_1 -Stimulation und/oder Zugabe des PI3K γ -Inhibitors AS605240	76
Abbildung 20: Einfluss des PI3K γ -Inhibitors bzw. des PI3K γ -KO auf die TGF- β_1 -induzierte Reduktion der kontraktile Funktion	79
Abbildung 21: Abhängigkeit der TGF- β_1 -induzierten Apoptose in Kardiomyozyten von PI3K γ	85
Abbildung 22: TGF- β_1 -induzierte Apoptose wird durch den SMAD-Signalweg vermittelt und läuft unabhängig von PI3K γ ab, Erklärungsansätze wie PI3K γ unabhängig vom SMAD-Signalweg als Mediator für die TGF- β_1 -induzierte Apoptose wirken kann	89

8 Literaturverzeichnis

- Aki, Sho; Yoshioka, Kazuaki; Okamoto, Yasuo; Takuwa, Noriko; Takuwa, Yoh (2015): Phosphatidylinositol 3-kinase class II α -isoform PI3K-C2 α is required for transforming growth factor β -induced Smad signaling in endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (10), S. 6086–6105. DOI: 10.1074/jbc.M114.601484.
- Alloatti, G.; Montrucchio, G.; Lembo, G.; Hirsch, E. (2004): Phosphoinositide 3-kinase gamma: kinase-dependent and -independent activities in cardiovascular function and disease. In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt 2). DOI: 10.1042/bst0320383.
- Alloatti, Giuseppe; Levi, Renzo; Malan, Daniela; Del Sorbo, Lorenzo; Bosco, Ornella; Barberis, Laura et al. (2003): Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient hearts are protected from the PAF-dependent depression of cardiac contractility. In: *Cardiovascular research* 60 (2), S. 242–249. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.08.008.
- Asano, T.; Kanda, A.; Katagiri, H.; Nawano, M.; Ogihara, T.; Inukai, K. et al. (2000): p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (23), S. 17671–17676. DOI: 10.1074/jbc.M910391199.
- Baillie, George S. (2009): Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. In: *The FEBS journal* 276 (7), S. 1790–1799. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06926.x.
- Bakin, A. V.; Tomlinson, A. K.; Bhowmick, N. A.; Moses, H. L.; Arteaga, C. L. (2000): Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (47), S. 36803–36810. DOI: 10.1074/jbc.M005912200.
- Ban, Kiwon; Cooper, Andrew J.; Samuel, Sara; Bhatti, Adil; Patel, Mikin; Izumo, Seigo et al. (2008): Phosphatidylinositol 3-kinase gamma is a critical mediator of myocardial ischemic and adenosine-mediated preconditioning. In: *Circulation research* 103 (6), S. 643–653. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.175018.

- Bi, Lei; Okabe, Ichiro; Bernard, David J.; Wynshaw-Boris, Anthony; Nussbaum, Robert L. (1999): Proliferative Defect and Embryonic Lethality in Mice Homozygous for a Deletion in the p110 α Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase *. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (16), S. 10963–10968. DOI: 10.1074/jbc.274.16.10963.
- Bishopric, N. H.; Andreka, P.; Slepak, T.; Webster, K. A. (2001): Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. In: *Current opinion in pharmacology* 1 (2), S. 141–150. DOI: 10.1016/s1471-4892(01)00032-7.
- Böhmer, A. (2014): Was ist fortgeschrittene Herzinsuffizienz, was ist terminale Herzinsuffizienz? In: *Journal of Cardiology*.
- Boluyt, M.; O'Neill, L.; Meredith, A.; Bing, O.H.; Brooks, W.; Conrad, C. et al. (1994): Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. In: *undefined*. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/Alterations-in-cardiac-gene-expression-during-the-Boluyt-O'Neill/93a523314be3e9192ce3b41d5c13ae1ac24eabbe>.
- Brosinsky, Paulin; Bornbaum, Julia; Warga, Björn; Schulz, Lisa; Schlüter, Klaus-Dieter; Ghigo, Alessandra et al. (2021): PI3K as mediator of apoptosis and contractile dysfunction in TGF β 1-stimulated cardiomyocytes 2021.
- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S. et al. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. In: *Cell* 96 (6), S. 857–868. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80595-4.
- Buzaglo, Nahum; Golomb, Mordechai; Rosen, Haim; Beeri, Ronen; Ami, Hagit Cohen-Ben; Langane, Fattal et al. (2019): Augmentation of Ouabain-Induced Increase in Heart Muscle Contractility by Akt Inhibitor MK-2206. In: *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 24 (1), S. 78–89. DOI: 10.1177/1074248418788301.
- Camps, Montserrat; Rückle, Thomas; Ji, Hong; Ardisson, Vittoria; Rintelen, Felix; Shaw, Jeffrey et al. (2005): Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. In: *Nature medicine* 11 (9), S. 936–943. DOI: 10.1038/nm1284.

- Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F.; Stanbridge, E. et al. (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392), S. 1318–1321. DOI: 10.1126/science.282.5392.1318.
- Castellano, Esther; Downward, Julian (2011): RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. In: *Genes & cancer* 2 (3), S. 261–274. DOI: 10.1177/1947601911408079.
- Castillo, Jorge J.; Furman, Michael; Winer, Eric S. (2012): CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110 δ inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. In: *Expert opinion on investigational drugs* 21 (1), S. 15–22. DOI: 10.1517/13543784.2012.640318.
- Chen, Si; Zhang, Yishuai; Lighthouse, Janet K.; Mickelsen, Deanne M.; Wu, Jiangbin; Yao, Peng et al. (2020): A Novel Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. In: *Circulation* 141 (3), S. 217–233. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042178.
- Clayton, Elizabeth; Bardi, Giuseppe; Bell, Sarah E.; Chantry, David; Downes, C. Peter; Gray, Alexander et al. (2002): A Crucial Role for the p110 δ Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase in B Cell Development and Activation. In: *The Journal of Experimental Medicine* 196 (6), S. 753–763. DOI: 10.1084/jem.20020805.
- Cohen, Gerald M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. In: *Biochem J* 326 (1), S. 1–16. DOI: 10.1042/bj3260001.
- Cohn, Jay N.; Levine, T. Barry; Francis, Gary S.; Goldsmith, Steven (1981): Neurohumoral control mechanisms in congestive heart failure. In: *American Heart Journal* 102 (3), S. 509–514. DOI: 10.1016/0002-8703(81)90739-0.
- Cohn, JN; Ferrari, R; Sharpe, N. (2000): Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. In: *J Am Coll Cardiol.* DOI: 10.1016/s0735-1097(99)00630-0.
- Conery, Andrew R.; Cao, Yanna; Thompson, E. A.; Townsend Jr, C. M.; Ko, T. C.; Luo, Kunxin (2004): Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β -induced apoptosis.

- Crackower, Michael A.; Oudit, Gavin Y.; Kozieradzki, Ivona; Sarao, Renu; Sun, Hui; Sasaki, Takehiko et al. (2002): Regulation of Myocardial Contractility and Cell Size by Distinct PI3K-PTEN Signaling Pathways. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00969-8.
- Cushing, Timothy D.; Metz, Daniela P.; Whittington, Douglas A.; McGee, Lawrence R. (2012): PI3K δ and PI3K γ as targets for autoimmune and inflammatory diseases. In: *Journal of medicinal chemistry* 55 (20), S. 8559–8581. DOI: 10.1021/jm300847w.
- Datta, Sandeep Robert; Dudek, Henryk; Tao, Xu; Masters, Shane; Fu, Haiyan; Gotoh, Yukiko; Greenberg, Michael E. (1997): Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. In: *Cell* 91 (2), S. 231–241. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80405-5.
- Dennler, S.; Goumans, M. J.; ten, Dijke P. (2002): Transforming growth factor beta signal transduction. In: *Journal of leukocyte biology* 71 (5). Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11994497/>.
- Deten, A.; Hölzl, A.; Leicht, M.; Barth, W.; Zimmer, H. G. (2001): Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 33 (6). DOI: 10.1006/jmcc.2001.1383.
- Dey, Nirmalya; Ghosh-Choudhury, Nandini; Kasinath, Balakuntalam S.; Choudhury, Goutam Ghosh (2012): TGF β -stimulated microRNA-21 utilizes PTEN to orchestrate AKT/mTORC1 signaling for mesangial cell hypertrophy and matrix expansion. In: *PloS one* 7 (8), e42316. DOI: 10.1371/journal.pone.0042316.
- Doukas, John; Wrasidlo, Wolfgang; Noronha, Glenn; Dneprovskaja, Elena; Fine, Richard; Weis, Sara et al. (2006): Phosphoinositide 3-kinase γ/δ inhibition limits infarct size after myocardial ischemia/reperfusion injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (52), S. 19866–19871. DOI: 10.1073/pnas.0606956103.
- D'Souza, Cletus A.; Heitman, Joseph (2001): Dismantling the Cryptococcus coat. In: *Trends in Microbiology*. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01945-4.
- Edlund, Sofia; Bu, Shizhong; Schuster, Norbert; Aspenström, Pontus; Heuchel, Rainer; Heldin, Nils-Erik et al. (2003): Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-

- induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. In: *Molecular biology of the cell* 14 (2), S. 529–544. DOI: 10.1091/mbc.02-03-0037.
- Edlund, Sofia; Landström, Maréne; Heldin, Carl-Henrik; Aspenström, Pontus (2004): Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 9), S. 1835–1847. DOI: 10.1242/jcs.01036.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Endoh, Masao (2006): Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. In: *Journal of pharmacological sciences* 100 (5), S. 525–537. DOI: 10.1254/jphs.cpj06009x.
- Engel, M. E.; McDonnell, M. A.; Law, B. K.; Moses, H. L. (1999): Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (52), S. 37413–37420. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37413.
- Engelman, Jeffrey A.; Luo, Ji; Cantley, Lewis C. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. In: *Nature reviews. Genetics* 7 (8), S. 606–619. DOI: 10.1038/nrg1879.
- Euler-Taimor, Gerhild; Heger, Jacqueline (2006): The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. In: *Cardiovascular research* 69 (1), S. 15–25. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.07.007.
- Evans, Catherine A.; Liu, Tao; Lescarbeau, André; Nair, Somarajan J.; Grenier, Louis; Pradeilles, Johan A. et al. (2016): Discovery of a Selective Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)- γ Inhibitor (IPI-549) as an Immuno-Oncology Clinical Candidate. In: *ACS medicinal chemistry letters* 7 (9), S. 862–867. DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00238.
- Falkenburger, Björn H.; Jensen, Jill B.; Dickson, Eamonn J.; Suh, Byung-Chang; Hille, Bertil (2010): Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. In: *The Journal of Physiology* 588 (Pt 17), S. 3179–3185. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.192153.

- Folgiero, V.; Di Carlo, S. E.; Bon, G.; Spugnini, E. P.; Di Benedetto, A.; Germoni, S. et al. (2012): Inhibition of p85, the non-catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, exerts potent antitumor activity in human breast cancer cells. In: *Cell death & disease* 3 (12), e440. DOI: 10.1038/cddis.2012.179.
- Forrester, Steven J.; Booz, George W.; Sigmund, Curt D.; Coffman, Thomas M.; Kawai, Tatsuo; Rizzo, Victor et al. (2018): Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. In: *Physiological reviews* 98 (3), S. 1627–1738. DOI: 10.1152/physrev.00038.2017.
- Frey, R. S.; Mulder, K. M. (1997): Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. In: *Cancer research* 57 (4), S. 628–633.
- Fujio, Yasushi; Nguyen, Thao; Wencker, Detlef; Kitsis, Richard N.; Walsh, Kenneth (2000): Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart. In: *Circulation* 101 (6), S. 660–667.
- Galluzzo, Maria; Ciraolo, Elisa; Lucattelli, Monica; Hoxha, Eriola; Ulrich, Martina; Campa, Carlo Cosimo et al. (2015): Genetic Deletion and Pharmacological Inhibition of PI3K γ Reduces Neutrophilic Airway Inflammation and Lung Damage in Mice with Cystic Fibrosis-Like Lung Disease. In: *Mediators of inflammation* 2015, S. 545417. DOI: 10.1155/2015/545417.
- Galvão, Izabela; Queiroz-Junior, Celso Martins; de Oliveira, Vivian Louise Soares; Pinho, Vanessa; Hirsch, Emilio; Teixeira, Mauro Martins (2018): The Inhibition of Phosphoinositide-3 Kinases Induce Resolution of Inflammation in a Gout Model. In: *Frontiers in pharmacology* 9, S. 1505. DOI: 10.3389/fphar.2018.01505.
- Gamell, C.; Osses, N.; Bartrons, R.; Rückle, T.; Camps, M.; Rosa, J. L.; Ventura, F. (2008): BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 23). DOI: 10.1242/jcs.031286.
- Gao, Tianyan; Furnari, Frank; Newton, Alexandra C. (2005): PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. In: *Molecular cell* 18 (1), S. 13–24. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.008.

- Gasparo, M. de; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. In: *Pharmacological reviews* 52 (3), S. 415–472.
- Gersdorff, G. von; Susztak, K.; Rezvani, F.; Bitzer, M.; Liang, D.; Böttinger, E. P. (2000): Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (15), S. 11320–11326. DOI: 10.1074/jbc.275.15.11320.
- Ghigo, Alessandra; Laffargue, Muriel; Li, Mingchuan; Hirsch, Emilio (2017): PI3K and Calcium Signaling in Cardiovascular Disease. In: *Circulation research* 121 (3), S. 282–292. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310183.
- Ghigo, Alessandra; Li, Mingchuan (2015): Phosphoinositide 3-kinase: friend and foe in cardiovascular disease. In: *Frontiers in pharmacology* 6, S. 169. DOI: 10.3389/fphar.2015.00169.
- Ghigo, Alessandra; Perino, Alessia; Mehel, Hind; Zahradníková, Alexandra, JR; Morello, Fulvio; Leroy, Jérôme et al. (2012): Phosphoinositide 3-kinase γ protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. In: *Circulation* 126 (17), S. 2073–2083. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114074.
- Glaves, John Paul; Primeau, Joseph O.; Espinoza-Fonseca, L. Michel; Lemieux, M. Joanne; Young, Howard S. (2019): The Phospholamban Pentamer Alters Function of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump SERCA. In: *Biophysical journal* 116 (4), S. 633–647. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.01.013.
- Gudermann, T.; Nürnberg, B.; Schultz, G. (1995): Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 73 (2). DOI: 10.1007/BF00270578.
- Hanafusa, H.; Ninomiya-Tsuji, J.; Masuyama, N.; Nishita, M.; Fujisawa, J.; Shibuya, H. et al. (1999): Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (38), S. 27161–27167. DOI: 10.1074/jbc.274.38.27161.

- Hao, J.; Wang, B.; Jones, S. C.; Jassal, D. S.; Dixon, I. M. (2000): Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279 (6), H3020-30. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.279.6.H3020.
- Heger, J.; Peters, S. C.; Piper, H. M.; Euler, G. (2009): SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. In: *Journal of cellular physiology* 220 (2). DOI: 10.1002/jcp.21805.
- Heger, Jacqueline; Warga, Björn; Meyering, Bettina; Abdallah, Yaser; Schlüter, Klaus-Dieter; Piper, Hans Michael; Euler, Gerhild (2011): TGF β receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. In: *J. Cell. Physiol.* 226 (10), S. 2683–2690. DOI: 10.1002/jcp.22619.
- Heldin, C.H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P (1997): TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. In: *Nature* 390 (6659). DOI: 10.1038/37284.
- Hirsch, E.; Katanaev, V. L.; Garlanda, C.; Azzolino, O.; Pirola, L.; Silengo, L. et al. (2000): Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5455), S. 1049–1053. DOI: 10.1126/science.287.5455.1049.
- Hirsch, Emilio; Braccini, Laura; Ciralo, Elisa; Morello, Fulvio; Perino, Alessia (2009): Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. In: *Trends in biochemical sciences* 34 (5), S. 244–248. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.02.003.
- Holler, Nils; Zaru, Rossana; Micheau, Olivier; Thome, Margot; Attinger, Antoine; Valitutti, Salvatore et al. (2000): Fas triggers an alternative, caspase-8– independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. DOI: 10.1038/82732.
- Hu, Shiping; Chang, Xixi; Zhu, Hongbin; Wang, Dongxu; Chen, Guozhu (2020): PI3K mediates tumor necrosis factor induced-necroptosis through initiating RIP1-RIP3-MLKL signaling pathway activation. In: *Cytokine* 129, S. 155046. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155046.
- Huntgeburth, Michael; Tiemann, Klaus; Shahverdyan, Robert; Schlüter, Klaus-Dieter; Schreckenber, Rolf; Gross, Marie-Luise et al. (2011): Transforming growth factor β_1 oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to β -adrenergic

- stimulation in the heart. In: *PloS one* 6 (11), e26628. DOI: 10.1371/journal.pone.0026628.
- Hussey, George S.; Chaudhury, Arindam; Dawson, Andrea E.; Lindner, Daniel J.; Knudsen, Charlotte R.; Wilce, Matthew C. J. et al. (2011): Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step. In: *Molecular cell* 41 (4), S. 419–431. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.02.003.
- Iizuka, K.; Sano, H.; Kawaguchi, H.; Kitabatake, A. (1994): Transforming growth factor beta-1 modulates the number of beta-adrenergic receptors in cardiac fibroblasts. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 26 (4), S. 435–440. DOI: 10.1006/jmcc.1994.1054.
- Ikeuchi, Masaki; Tsutsui, Hiroyuki; Shiomi, Tetsuya; Matsusaka, Hidenori; Matsushima, Shouji; Wen, Jing et al. (2004): Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. In: *Cardiovascular research* 64 (3), S. 526–535. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.07.017.
- Jung, Su Myung; Lee, Ji-Hyung; Park, Jinyoung; Oh, Young Sun; Lee, Sung Kyun; Park, Jin Seok et al. (2013): Smad6 inhibits non-canonical TGF- β 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. In: *Nature communications* 4, S. 2562. DOI: 10.1038/ncomms3562.
- Kaduszkiewicz, H.; Gerste, B.; Eisele, M.; Schäfer, I.; Scherer, M. (2014): Herzinsuffizienz: Epidemiologie und Versorgung. in J Klauber, C Günster, B Gerste, B-P Robra & N Schmacke (Hrsg.), *Versorgungs-Report 2013/2014* Schwerpunkt: Depression., 9, Versorgungs-Report, Schattauer, Stuttgart, S. 209-229.
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. (1972): Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. In: *Br J Cancer* 26 (4), S. 239–257. DOI: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kretschmar, Marcus; Doody, Jacqueline; Timokhina, Inna; Massagué, Joan (1999): A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. In: *Genes & Development* 13 (7), S. 804–816.

- Kurig, Barbara; Shymanets, Aliaksei; Bohnacker, Thomas; Prajwala; Brock, Carsten; Ahmadian, Mohammad Reza et al. (2009): Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase p87/p110gamma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. DOI: 10.1073/pnas.0905506106.
- Kurosu, H.; Maehama, T.; Okada, T.; Yamamoto, T.; Hoshino, S.; Fukui, Y. et al. (1997): Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (39), S. 24252–24256. DOI: 10.1074/jbc.272.39.24252.
- Lamouille, Samy; Connolly, Erin; Smyth, James W.; Akhurst, Rosemary J.; Derynck, Rik (2012): TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 5), S. 1259–1273. DOI: 10.1242/jcs.095299.
- Lamouille, Samy; Derynck, Rik (2007): Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. In: *The Journal of Cell Biology* 178 (3), S. 437–451. DOI: 10.1083/jcb.200611146.
- Latronico, Michael V. G.; Costinean, Stefan; Lavitrano, Maria Luisa; Peschle, Cesare; Condorelli, Gianluigi (2004): Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015, S. 250–260. DOI: 10.1196/annals.1302.021.
- Lawler, S.; Feng, X. H.; Chen, R. H.; Maruoka, E. M.; Turck, C. W.; Griswold-Prenner, I.; Derynck, R. (1997): The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (23). DOI: 10.1074/jbc.272.23.14850.
- Liang, Wenbin; Oudit, Gavin Y.; Patel, Mikin M.; Shah, Ajay M.; Woodgett, James R.; Tsushima, Robert G. et al. (2010): Role of phosphoinositide 3-kinase {alpha}, protein kinase C, and L-type Ca²⁺ channels in mediating the complex actions of angiotensin II on mouse cardiac contractility. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 56 (3), S. 422–429. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149344.

- Liggett, S. B.; Tepe, N. M.; Lorenz, J. N.; Canning, A. M.; Jantz, T. D.; Mitarai, S. et al. (2000): Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. In: *Circulation* 101 (14), S. 1707–1714. DOI: 10.1161/01.cir.101.14.1707.
- Liu, Pixu; Cheng, Hailing; Roberts, Thomas M.; Zhao, Jean J. (2009): Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. In: *Nature reviews. Drug discovery* 8 (8), S. 627–644. DOI: 10.1038/nrd2926.
- Maier, Lars S.; Bers, Donald M. (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 34 (8), S. 919–939. DOI: 10.1006/jmcc.2002.2038.
- Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 753–791. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
- Maxwell, Mhairi J.; Tsantikos, Evelyn; Kong, Anne M.; Vanhaesebroeck, Bart; Tarlinton, David M.; Hibbs, Margaret L. (2012): Attenuation of phosphoinositide 3-kinase δ signaling restrains autoimmune disease. In: *Journal of autoimmunity* 38 (4), S. 381–391. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.04.001.
- McKay, M. M.; Morrison, D. K. (2007): Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. In: *Oncogene* 26 (22), S. 3113–3121. DOI: 10.1038/sj.onc.1210394.
- McLean, Brent A.; Kienesberger, Petra C.; Wang, Wang; Masson, Grant; Zhabyeyev, Pavel; Dyck, Jason R. B.; Oudit, Gavin Y. (2013): Enhanced recovery from ischemia-reperfusion injury in PI3K α dominant negative hearts: investigating the role of alternate PI3K isoforms, increased glucose oxidation and MAPK signaling. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 54, S. 9–18. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.015.
- McMullen, Julie R.; Amirahmadi, Fatemeh; Woodcock, Elizabeth A.; Schinke-Braun, Martina; Bouwman, Russell D.; Hewitt, Kimberly A. et al. (2007): Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2), S. 612–617. DOI: 10.1073/pnas.0606663104.

- McMullen, Julie R.; Shioi, Tetsuo; Zhang, Li; Tarnavski, Oleg; Sherwood, Megan C.; Kang, Peter M.; Izumo, Seigo (2003): Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (21), S. 12355–12360. DOI: 10.1073/pnas.1934654100.
- Miyamoto, Shigeki; Murphy, Anne N.; Brown, Joan Heller (2009): Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (2), S. 169–180. DOI: 10.1007/s10863-009-9205-y.
- Møller, Jesper V.; Olesen, Claus; Winther, Anne-Marie L.; Nissen, Poul (2010): The sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. In: *Quarterly reviews of biophysics* 43 (4), S. 501–566. DOI: 10.1017/S003358351000017X.
- Moustakas, Aristidis; Heldin, Carl-Henrik (2005): Non-Smad TGF-beta signals. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 16), S. 3573–3584. DOI: 10.1242/jcs.02554.
- Mufti, Solaiman; Wenzel, Sibylle; Euler, Gerhild; Piper, Hans Michael; Schlüter, Klaus-Dieter (2008): Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. In: *Journal of cellular physiology* 217 (1), S. 242–249. DOI: 10.1002/jcp.21501.
- Mulder, K. M.; Morris, S. L. (1992): Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (8), S. 5029–5031.
- Naga Prasad, S. V.; Esposito, G.; Mao, L.; Koch, W. J.; Rockman, H. A. (2000): Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (7), S. 4693–4698. DOI: 10.1074/jbc.275.7.4693.
- Naga Prasad, Sathyamangla V.; Jayatilleke, Arundathi; Madamanchi, Aasakiran; Rockman, Howard A. (2005): Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. In: *Nature cell biology* 7 (8), S. 785–796. DOI: 10.1038/ncb1278.

- Nakao, A.; Afrakhte, M.; Morén, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R. et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. In: *Nature* 389 (6651). DOI: 10.1038/39369.
- Nationale Versorgungsleitlinie (NVL) Chronische Herzinsuffizienz: Ein Programm von Bundesärztekammer, Kassenärztlicher Bundesvereinigung und Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- Nürnberg, Bernd; Beer-Hammer, Sandra (2019): Function, Regulation and Biological Roles of PI3K γ Variants. In: *Biomolecules* 9 (9). DOI: 10.3390/biom9090427.
- Ono, Koh; Iwanaga, Yoshitaka; Hirayama, Madoka; Kawamura, Teruhisa; Sowa, Naoya; Hasegawa, Koji (2004): Contribution of caveolin-1 alpha and Akt to TNF-alpha-induced cell death. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287 (1), L201-9. DOI: 10.1152/ajplung.00293.2003.
- Opie, Lionel H.; Commerford, Patrick J.; Gersh, Bernard J.; Pfeffer, Marc A. (2006): Controversies in ventricular remodelling. In: *The Lancet* 367 (9507), S. 356–367. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68074-4.
- Oudit, Gavin Y.; Crackower, Michael A.; Eriksson, Urs; Sarao, Renu; Koziaradzki, Ivona; Sasaki, Takehiko et al. (2003): Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. In: *Circulation* 108 (17), S. 2147–2152. DOI: 10.1161/01.CIR.0000091403.62293.2B.
- Oudit, Gavin Y.; Kassiri, Zamaneh (2007): Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. In: *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 7 (4), S. 295–304. DOI: 10.2174/187152907782793545.
- Oudit, Gavin Y.; Sun, Hui; Kerfant, Benoit-Gilles; Crackower, Michael A.; Penninger, Josef M.; Backx, Peter H. (2004): The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* (2). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.015.
- Patrucco, Enrico; Notte, Antonella; Barberis, Laura; Selvetella, Giulio; Maffei, Angelo; Brancaccio, Mara et al. (2004): PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. In: *Cell* 118 (3), S. 375–387. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.017.

- Perino, Alessia; Ghigo, Alessandra; Ferrero, Enrico; Morello, Fulvio; Santulli, Gaetano; Baillie, George S. et al. (2011): Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110 γ . In: *Molecular cell* 42 (1), S. 84–95. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.01.030.
- Pretorius, Lynette (2009): Role of phosphoinositide 3-kinases in regulating cardiac function. In: *Front Biosci* Volume (14), S. 2221. DOI: 10.2741/3374.
- Programm für nationale Versorgungsleitlinien (2021): 2 Epidemiologie, Risiko- und Prognosefaktoren — ÄZQ, zuletzt aktualisiert am 12.02.2021, zuletzt geprüft am 12.02.2021.
- Remy, Ingrid; Montmarquette, Annie; Michnick, Stephen W. (2004): PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. In: *Nature cell biology* 6 (4), S. 358–365. DOI: 10.1038/ncb1113.
- Romashkova, J. A.; Makarov, S. S. (1999): NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. In: *Nature* 401 (6748), S. 86–90. DOI: 10.1038/43474.
- Rosenkranz, S. (2004): TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. In: *Cardiovascular research* 63 (3). DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.04.030.
- Rosenkranz, Stephan; Flesch, Markus; Amann, Kerstin; Haeuseler, Claudia; Kilter, Heiko; Seeland, Ute et al. (2002): Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283 (3), H1253-62. DOI: 10.1152/ajpheart.00578.2001.
- Runyan, Constance E.; Schnaper, H. William; Poncelet, Anne-Christine (2004): The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta1. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (4), S. 2632–2639. DOI: 10.1074/jbc.M310412200.
- Sabater, Alfonso L.; Andreu, Enrique J.; García-Guzmán, María; López, Tania; Abizanda, Gloria; Perez, Victor L. et al. (2017): Combined PI3K/Akt and Smad2 Activation Promotes Corneal Endothelial Cell Proliferation.
- Sadhu, Chanchal; Masinovsky, Boris; Dick, Ken; Sowell, C. Gregory; Staunton, Donald E. (2003): Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional

- movement. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (5), S. 2647–2654. DOI: 10.4049/jimmunol.170.5.2647.
- Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), S. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
- Schlüter, K. D.; Zhou, X. J.; Piper, H. M. (1995): Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. In: *The American journal of physiology* 269 (5 Pt 1), C1311-6. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1311.
- Schneider, Maxi: Rolle des PI3K-Signalweges bei der Regulation von Todesrezeptor-induzierter Apoptose in Neuroblastomzellen. Universität Ulm. Online verfügbar unter <https://oparu.uni-ulm.de/xmlui/handle/123456789/2096>.
- Schneiders, Daniela; Heger, Jacqueline; Best, Patrick; Michael Piper, Hans; Taimor, Gerhild (2005): SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. In: *Cardiovascular research* 67 (1), S. 87–96. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.02.021.
- Schröder, D.; Heger, J.; Piper, H. M.; Euler, G. (2006): Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84 (11). DOI: 10.1007/s00109-006-0090-0.
- Schultz, Jo El J.; Witt, Sandra A.; Glascock, Betty J.; Nieman, Michelle L.; Reiser, Peter J.; Nix, Stacey L. et al. (2002): TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. In: *The Journal of clinical investigation* 109 (6), S. 787–796. DOI: 10.1172/JCI14190.
- Seoane, Joan; Le, Hong-Van; Shen, Lijian; Anderson, Stewart A.; Massagué, Joan (2004): Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. In: *Cell* 117 (2), S. 211–223. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00298-3.
- Seropian, Ignacio M; Abbate, Antonio; Toldo, Stefano; Harrington, Jessica; Smithson, Lisa; Ockaili, Ramzi et al. (2010): Pharmacologic Inhibition of Phosphoinositide 3-

- Kinase Gamma (PI3K γ) Promotes Infarct Resorption and Prevents Adverse Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. In: *J Cardiovasc Pharmacol*.
- Shi, Yigong; Massagué, Joan (2003): Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. In: *Cell* 113 (6), S. 685–700. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
- Shioi, T.; Kang, P. M.; Douglas, P. S.; Hampe, J.; Yballe, C. M.; Lawitts, J. et al. (2000): The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. In: *The EMBO journal* 19 (11), S. 2537–2548. DOI: 10.1093/emboj/19.11.2537.
- Shymanets, Aliaksei; Prajwal; Bucher, Kirsten; Beer-Hammer, Sandra; Harteneck, Christian; Nürnberg, Bernd (2013): p87 and p101 subunits are distinct regulators determining class IB phosphoinositide 3-kinase (PI3K) specificity. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (43), S. 31059–31068. DOI: 10.1074/jbc.M113.508234.
- Simeone, D. M.; Zhang, L.; Graziano, K.; Nicke, B.; Pham, T.; Schaefer, C.; Logsdon, C. D. (2001): Smad4 mediates activation of mitogen-activated protein kinases by TGF-beta in pancreatic acinar cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 281 (1). DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.1.C311.
- Srivastava, R. K.; Srivastava, A. R.; Korsmeyer, S. J.; Nesterova, M.; Cho-Chung, Y. S.; Longo, D. L. (1998): Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. In: *Molecular and cellular biology* 18 (6), S. 3509–3517. DOI: 10.1128/mcb.18.6.3509.
- Statistisches Bundesamt (2020): Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>, zuletzt aktualisiert am 30.11.2020, zuletzt geprüft am 12.02.2021.
- Stephens, L. R.; Eguinoa, A.; Erdjument-Bromage, H.; Lui, M.; Cooke, F.; Coadwell, J. et al. (1997): The G $\beta\gamma$ Sensitivity of a PI3K Is Dependent upon a Tightly Associated Adaptor, p101.

- Stoyanov, Borislav; Volinia, Stefano; Hanck., Theodor; Rubio, Ignacio; Loubtchenkov, Michael; Malek, Daria et al. (1995): Cloning and Characterization of a G Protein-Activated Human Phosphoinositide-3 Kinase.
- Suenaga, Atsushi; Takada, Naoki; Hatakeyama, Mariko; Ichikawa, Mio; Yu, Xiaomei; Tomii, Kentaro et al. (2005): Novel mechanism of interaction of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and ErbB3 receptor-derived phosphotyrosyl peptides. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (2), S. 1321–1326. DOI: 10.1074/jbc.M410436200.
- Suire, Sabine; Coadwell, John; Ferguson, G. John; Davidson, Keith; Hawkins, Phillip; Stephens, Len (2005): p84, a new $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110 γ . In: *Current biology : CB* 15 (6), S. 566–570. DOI: 10.1016/j.cub.2005.02.020.
- Sun, Hui; Kerfant, Benoit-Gilles; Zhao, Dongling; Trivieri, Maria G.; Oudit, Gavin Y.; Penninger, Josef M.; Backx, Peter H. (2006): Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3K α /PKB signaling. In: *Circulation research* 98 (11), S. 1390–1397. DOI: 10.1161/01.RES.0000223321.34482.8c.
- Swanton, E.; Savory, P.; Cosulich, S.; Clarke, P.; Woodman, P. (1999): Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. In: *Oncogene* 18 (10), S. 1781–1787. DOI: 10.1038/sj.onc.1202490.
- Swynghedauw, B. (1999): Molecular mechanisms of myocardial remodeling. In: *Physiological reviews* 79 (1), S. 215–262. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.1.215.
- Takekawa, Mutsuhiro; Tatebayashi, Kazuo; Itoh, Fumio; Adachi, Masaaki; Imai, Kohzoh; Saito, Haruo (2002): Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . In: *The EMBO journal* 21 (23), S. 6473–6482. DOI: 10.1093/emboj/cdf643.
- Tan, Sih Min; Zhang, Yuan; Connelly, Kim A.; Gilbert, Richard E.; Kelly, Darren J. (2010): Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298 (5), H1415-25. DOI: 10.1152/ajpheart.01048.2009.

- Taylor, Susan S.; Radzio-Andzelm, Elzbieta; Madhusudan; Cheng, Xiaodong; Ten Eyck, Lynn; Narayana, Narendra (1999): Catalytic Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase: Structure and Dynamics of the Active Site Cleft.
- Toker, A. (2002): Phosphoinositides and signal transduction. In: *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59 (5), S. 761–779. DOI: 10.1007/s00018-002-8465-z.
- Toyoshima, Chikashi (2009): How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (6), S. 941–946. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.008.
- Valderrama-Carvajal, Hector; Cocolakis, Eftihia; Lacerte, Annie; Lee, Eun-Hye; Krystal, Gerald; Ali, Suhad; Lebrun, Jean-Jacques (2002): Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. In: *Nature cell biology* 4 (12), S. 963–969. DOI: 10.1038/ncb885.
- Vanhaesebroeck, B.; Leever, S. J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P. C. et al. (2001): Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. In: *Annual review of biochemistry* 70. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.535.
- Vanhaesebroeck, Bart; Stephens, Len; Hawkins, Phillip (2012): PI3K signalling: the path to discovery and understanding. In: *Nature reviews*, zuletzt geprüft am 03.02.2021.
- Vasudevan, Neelakantan T.; Mohan, Maradumane L.; Gupta, Manveen K.; Hussain, Afshan K.; Naga Prasad, Sathyamangla V. (2011): Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3K γ regulates β -adrenergic receptor function. In: *Molecular cell* 41 (6), S. 636–648. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.02.025.
- Vivanco, Igor; Sawyers, Charles L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (7), S. 489–501. DOI: 10.1038/nrc839.
- Voigt, Philipp; Dorner, Martin B.; Schaefer, Michael (2006): Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (15), S. 9977–9986. DOI: 10.1074/jbc.M512502200.
- Walker, Edward H.; Perisic, Olga; Ried, Christian; Stephens, Len; Williams, Roger L. (1999): Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling.

- Wang, Huayi; Sun, Liming; Su, Lijing; Rizo, Josep; Liu, Lei; Wang, Li-Feng et al. (2014): Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. In: *Molecular cell* 54 (1), S. 133–146. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.003.
- Warga, Björn E. (2015): Stickstoffmonoxid als weiteres Signalmolekül in der TGF β -induzierten Apoptose adulter Kardiomyozyten der Ratte. Online verfügbar unter <https://pdfs.semanticscholar.org/93a5/23314be3e9192ce3b41d5c13ae1ac24eabbe.pdf>.
- Weeks, Kate L.; Gao, Xiaoming; Du, Xiao-Jun; Boey, Esther J. H.; Matsumoto, Aya; Bernardo, Bianca C. et al. (2012): Phosphoinositide 3-kinase p110 α is a master regulator of exercise-induced cardioprotection and PI3K gene therapy rescues cardiac dysfunction. In: *Circulation. Heart failure* 5 (4), S. 523–534. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.966622.
- Wenzel, S.; Taimor, G.; Piper, H. M.; Schlüter, K. D. (2001): Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (12), S. 2291–2293. DOI: 10.1096/fj.00-0827fje.
- Weston, Claire R.; Davis, Roger J. (2007): The JNK signal transduction pathway. In: *Current opinion in cell biology* 19 (2), S. 142–149. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.02.001.
- Wilkes, Mark C.; Mitchell, Hugh; Penheiter, Sumedha Gulati; Doré, Jules J.; Suzuki, Kaori; Edens, Maryanne et al. (2005): Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. In: *Cancer research* 65 (22), S. 10431–10440. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1522.
- Wójcik-Pszczola, Katarzyna; Chłoń-Rzepa, Grażyna; Jankowska, Agnieszka; Ślusarczyk, Marietta; Ferdek, Paweł E.; Kusiak, Agnieszka A. et al. (2020): A Novel, Pan-PDE Inhibitor Exerts Anti-Fibrotic Effects in Human Lung Fibroblasts via Inhibition of TGF- β Signaling and Activation of cAMP/PKA Signaling. In: *International journal of molecular sciences* 21 (11). DOI: 10.3390/ijms21114008.

- Wu, W.; Lee, W. L.; Wu, Y. Y.; Chen, D.; Liu, T. J.; Jang, A. et al. (2000): Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (51), S. 40113–40119. DOI: 10.1074/jbc.M004108200.
- Xia, Hongping; Ooi, London Lucien P. J.; Hui, Kam M. (2013): MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (2), S. 629–641. DOI: 10.1002/hep.26369.
- Xiao, L.; Pimental, D. R.; Amin, J. K.; Singh, K.; Sawyer, D. B.; Colucci, W. S. (2001): MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 33 (4), S. 779–787. DOI: 10.1006/jmcc.2001.1348.
- Xue, Gongda; Restuccia, David F.; Lan, Qiang; Hynx, Debby; Dirnhofer, Stephan; Hess, Daniel et al. (2012): Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. In: *Cancer discovery* 2 (3), S. 248–259. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0270.
- Yamashita, Motozo; Fatyol, Karoly; Jin, Chaoyang; Wang, Xiangchun; Liu, Zhenggang; Zhang, Ying E. (2008): TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. In: *Molecular cell* 31 (6), S. 918–924. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.002.
- Yan, Z.; Winawer, S.; Friedman, E. (1994): Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (18), S. 13231–13237.
- Yano, Naohiro; Tseng, Andy; Zhao, Ting C.; Robbins, Jeffrey; Padbury, James F.; Tseng, Yi-Tang (2008): Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3Kalpha induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295 (4), H1690-4. DOI: 10.1152/ajpheart.00531.2008.
- Yi, Jae Youn; Shin, Incheol; Arteaga, Carlos L. (2005): Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. In: *The*

Journal of biological chemistry 280 (11), S. 10870–10876. DOI: 10.1074/jbc.M413223200.

- Yoon, Seunghee; Seger, Rony (2006): The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 24 (1), S. 21–44. DOI: 10.1080/02699050500284218.
- Zhang, Li; Zhenfeng, Cheng; Yu, Haifeng; Mengting, Chen; Lifang, Li (2018): PTEN signaling inhibitor VO-OHpic improves cardiac myocyte survival by mediating apoptosis resistance in vitro. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 103, S. 1217–1222. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.141.
- Zhang, Long; Zhou, FangFang; Dijke, Peter ten (2013a): Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. In: *Trends in biochemical sciences* 38 (12), S. 612–620. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.10.001.
- Zhang, Long; Zhou, FangFang; Drabsch, Yvette; Gao, Rui; Snaar-Jagalska, B. Ewa; Mickanin, Craig et al. (2012): USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. In: *Nature cell biology* 14 (7), S. 717–726. DOI: 10.1038/ncb2522.
- Zhang, Long; Zhou, FangFang; García de Vinuesa, Amaya; Kruijf, Esther M. de; Mesker, Wilma E.; Hui, Li et al. (2013b): TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis. In: *Molecular cell* 51 (5), S. 559–572. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.014.
- Zhang, Suping; Fei, Teng; Zhang, Lixia; Zhang, Ran; Chen, Feng; Ning, Yuanheng et al. (2007): Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. In: *Molecular and cellular biology* 27 (12), S. 4488–4499. DOI: 10.1128/MCB.01636-06.
- Zhang, Ying E. (2017): Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a022129.
- Zhu, Jingyu; Li, Kan; Yu, Li; Chen, Yun; Cai, Yanfei; Jin, Jian; Hou, Tingjun (2021): Targeting phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ): Discovery and

development of its selective inhibitors. In: *Medicinal research reviews* 41 (3), S. 1599–1621. DOI: 10.1002/med.21770.

Zhuang, Chenchen; Guo, Ziyi; Zhu, Jumo; Wang, Wenjuan; Sun, Runmin; Qi, Miaomiao et al. (2022): PTEN inhibitor attenuates cardiac fibrosis by regulating the M2 macrophage phenotype via the PI3K/AKT/TGF- β /Smad 2/3 signaling pathway. In: *International journal of cardiology* 356, S. 88–96. DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.04.007.

9 Publikationsverzeichnis

Brosinsky P, Bornbaum J, Warga B, Schulz L, Schlüter KD, Ghigo A, Hirsch E, Schulz R, Euler G, Heger J. PI3K as Mediator of Apoptosis and Contractile Dysfunction in TGF β_1 -Stimulated Cardiomyocytes. *Biology (Basel)*. 2021 Jul 16;10(7):670. doi: 10.3390/biology10070670. PMID: 34356525; PMCID: PMC8301398.

10 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Frau PD Dr. Jacqueline Heger vom Fachbereich Humanmedizin, Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung meines Themas. Vielen Dank für die hervorragende, stets konstruktive und zuverlässige fachliche Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke außerdem Frau Prof. Dr. Gerhild Euler vom Fachbereich Humanmedizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für die angenehme Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ebenso den technischen Mitarbeitern des physiologischen Instituts für hervorragende Arbeitsbedingungen. Insbesondere danke ich Birgit Störr für die Einarbeitung im Labor, Anna Reis für ihre engagierte und hilfsbereite Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte und Martin Heisler für eine unkomplizierte und zuverlässige Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Freunden, dass sie die gemeinsamen Jahre in Gießen zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben und stets eine großartige Unterstützung in allen Lebenslagen waren.

Weiterhin danke ich Daniel Bermes, der mir mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft in schwierigen Phasen eine Stütze war und mich durch seinen unermüdlichen Ehrgeiz stets motiviert hat.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Danke, dass Ihr mich all die Jahre bedingungslos und liebevoll unterstützt habt und es mir ermöglicht habt, da zu sein, wo ich jetzt bin, ohne es jemals zu erwarten.