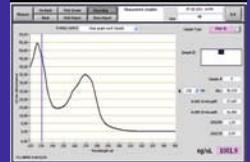


Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die TGF β -Freisetzung & Signalwege in mikrovaskulären Endothelzellen

Mona Christine Prieß



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



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2012

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

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Gerhild Euler

Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die TGF β - Freisetzung & Signalwege in mikrovaskulären Endothelzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Mona Christine Prieß

Tierärztin aus Leverkusen-Opladen

Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. M. Diener
Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 02.10.2012

Meinen Eltern Dietmar und Renate
Meinem Bruder Marcel
Meinem geliebten Simon

Eidesstattliche Erklärung:

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

Gießen, Oktober 2012

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Transforming growth factor β (TGFβ).....	2
1.2.1 Aktivierung von latentem TGF β in seine bioaktive Form.....	2
1.2.2 TGF β /SMAD-Signalkaskade	4
1.3 Endothelzellen	5
1.3.1 Endothelzellen: Aufbau und Funktion.....	6
1.3.2 Endothelzellen im Zusammenhang mit Myokard-Infarkt	7
1.4 Apoptose	7
1.4.1 TGF β und Apoptose	9
1.5 GATA-Transkriptionsfaktoren.....	9
1.5.1 GATA-Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit TGF β im Herzen	10
1.6 MikroRNA	11
1.6.1 MikroRNA Biogenese	11
1.6.2 Regulation von mikroRNAs durch SMAD.....	12
1.6.3 MikroRNA im Herzen.....	13
1.7 Fragestellung dieser Arbeit.....	15
2 Material.....	16
2.1 Chemikalien	16
2.2 Antikörper für Immunoblots.....	18
2.3 Primer für RT-PCR und real time PCR.....	19
2.4 Puffer und Lösungen	19
2.5 Geräte und Laborbedarf.....	22
2.5.1 Allgemein verwendete Geräte	22
2.5.2 Zellkultur	22
2.5.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.5.4 Western Blot	23
2.5.5 PCR	23
2.5.6 Software.....	24
3 Methoden	25
3.1 Isolierung von koronaren Endothelzellen der Ratte	25
3.1.1 Versuchstiere.....	25
3.1.2 Präparation und Zellkultur von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Rattenherz.....	25
3.1.3 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen.....	26
3.2 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten	27
3.2.1 Versuchstiere.....	27

3.2.2	Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus der Ratte	27
3.2.3	Vorinkubation der Kulturschalen für ventrikuläre Kardiomyozyten.....	27
3.2.4	Ausplattieren der ventrikulären Kardiomyozyten.....	27
3.3	Hypoxie/Normoxie und Reoxygenierung der Endothelzellen	28
3.4	Proteinnachweis	29
3.4.1	Zellernte zur Isolierung von Gesamtprotein	29
3.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	29
3.4.3	Probenaufbereitung mittels Lämmli-puffer.....	30
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
3.4.5	Western Blot.....	32
3.4.6	Immundetektion der transferierten Proteine	33
3.5	Nachweis von RNA.....	34
3.5.1	Zellernte von Endothelzellen zur Isolierung von Gesamt RNA	34
3.5.2	Isolation von Gesamt-RNA.....	34
3.5.3	DNase-Verdau.....	35
3.5.4	Messung der RNA-Konzentration.....	35
3.5.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36
3.5.6	Alternativmethode zur DNase-Behandlung und cDNA-Synthese	36
3.5.7	Realtime RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (Realtime RT-PCR).....	36
3.5.8	Auswertung der PCR.....	39
3.5.9	DNA-Gelelektrophorese	40
3.6	Nachweis von mikroRNA.....	41
3.6.1	Polyadenylierung mittels Poly-A Schwanz	41
3.6.2	cDNA Synthese	42
3.6.3	Quantitative Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) von mikroRNA	42
3.7	Nachweis von Apoptose.....	43
3.7.1	Apoptose Nachweis mittels HOE-Assay	43
3.8	Statistik.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Expression von TGFβ	44
	in mikrovaskulären Endothelzellen	44
4.1.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA-Expression von TGF β_1 in Endothelzellen ...	44
4.1.2	Hypoxie/Reoxygenierung erniedrigt zu einem frühen Zeitpunkt der Reoxygenierung	45
	die mRNA-Expression von TGF β_2	45
4.1.3	Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von TGF β_3	46
4.1.4	Hypoxie und Reoxygenierung steigert die Proteinexpression des TGF β -Vorläuferproteins ..	47
	in mikrovaskulären Endothelzellen	47
4.2	Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle	48
	in mikrovaskulären Endothelzellen	48
4.2.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD2 in Endothelzellen ..	48
4.2.2	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD3 in Endothelzellen ..	49
4.2.3	Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die SMAD4-mRNA-Expression	50
	in Endothelzellen	50
4.2.4	Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die SMAD7-mRNA-Expression in Endothelzellen	51
4.2.5	Es findet eine Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen	52
	unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt.....	52
4.2.6	TGF β -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen	53
	wieder auf	53

4.2.7	Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt.....	54
4.3	Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf GATA-Transkriptionsfaktoren in mikrovaskulären Endothelzellen	55
4.3.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die GATA2-Proteinexpression in Endothelzellen	55
4.3.2	Es findet keine Expression von GATA4 und 6 in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte statt	56
4.4	Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf mikroRNAs in Endothelzellen	56
4.4.1	MikroRNA1 wird nicht in mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert	57
4.4.2	Hypoxie und Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA21	57
4.4.3	Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA24	58
4.5	Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle in Kardiomyozyten	59
4.5.1	Durch Hypoxie und Reoxygenierung freigesetztes TGF β phosphoryliert SMAD2 parakrin in Kardiomyozyten	59
4.5.2	TGF β -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Kardiomyozyten wieder auf	60
4.5.3	Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Kardiomyozyten statt	61
4.6	Einfluss von freigesetztem TGFβ auf Apoptose von Kardiomyozyten	62
4.6.1	Durch Hypoxie/Reoxygenierung freigesetztes TGF β induziert parakrin Apoptose in Kardiomyozyten	62
5	Diskussion	64
5.1	Endothelzellen als Quelle der TGFβ-Expression	64
5.2	Autokrine Aktivierung der SMADs	64
5.3	Induktion von GATA2 im Zusammenhang mit TGFβ	65
5.4	Induktion von mikroRNA21 und 24	66
5.5	Parakrine Wirkung in Kardiomyozyten	68
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick	70
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	74
8	Literaturverzeichnis	75
9	Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AA	Acrylamid
ALK	activin receptor-like kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
Ang	Angiotensin
AP-1	Activated Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
BAA	Bisacrylamid
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor
Bp	Basenpaare
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovines-serum-albumin (Rinderserumalbumin)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCT	Cretain, Carnitin, Taurin
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
Co-SMAD	Common SMAD
Dgcr 8	DiGeorge critical region 8
DANN	Desoxyribonucleinacid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESM1	Endothelial cell specific molecule 1
et al.	und andere
FasL	Fas Ligand
FCS	fetal calfe serum (Fetales Kälberserum)
G	Gramm
GSK 3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
H	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2- Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser

HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I-SMAD	Inhibitorisches SMAD
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LAP	latency associated protein
LLC	large latent complex
LTBP	latent TGFβ binding protein
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	moloney murine leukemia virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRTF	myocardin related transcription factors
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
N	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	neonatal calf serum (neonatales Kälberserum)
ng	Nanogramm
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NTN4	Netrin 4
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
P	Irrtumswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphat buffered salt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD4	Programmed cell death 4
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
pre-mikroRNA	precursor mikroRNA
pri-mikroRNA	primary mikroRNA
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
RAN-GTP	RAN-Guanosintriphosphat
RhoB	Ras homologue gene family member B
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygene species
R-SMAD	Rezeptor abhängige SMADs
RT	Reverse Transkriptase
SBE	SMAD binding element
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT 1	Sirtuin 1
SMAD	small mother against decapentaplegic
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TAK1	TGFβ activated kinase 1
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamine
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	Thrombospondin 1
UTR	untranslated protein
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Das Herz (anatomisch Cor, Cardia) ist ein muskulöses Hohlorgan, welches durch wechselnde Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) von Vorhöfen und Kammern die Aufgabe hat, den Blutstrom in den Gefäßen in Bewegung zu halten (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, 1990). Das Blut wird somit in den Körperkreislauf ausgeworfen und versorgt diesen mit Sauerstoff. Das Herz wird durch eine Scheidewand, das Septum, in eine linke und eine rechte Herzhälfte unterteilt (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, 1990). Jede Hälfte besteht aus einem Vorhof (Atrium), welcher das ankommende Blut aus dem Kreislauf sammelt, und einer Kammer (Ventrikel), welche dieses aktiv in die Arterien auswirft. Zwischen Vorhöfen und Kammern, sowie zwischen Kammern und den anschließenden Arterien befinden sich Herzklappen, welche gewährleisten, dass das Blut nur in eine Richtung fließen kann. Sauerstoffarmes Blut aus dem großen Kreislauf (Körperkreislauf) gelangt in den Vorhof der rechten Herzhälfte und wird über die rechte Kammer aktiv in den kleinen Kreislauf (Lungenkreislauf) ausgeworfen. Das in der Lunge mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt über den linken Vorhof in die linke Herzhälfte und wird über die linke Herzkammer wieder in den Körperkreislauf gepumpt.

Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt eine unzureichende Funktion des Herzens, bei der das Herz nicht mehr im Stande ist, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu bringen (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, 1990). Sie ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen in Europa. 2006 war die Herzinsuffizienz in Deutschland bei Männern mit 147000 Fällen die dritthäufigste, bei Frauen mit 170000 Fällen die am häufigsten gestellte Diagnose. Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz sind altersabhängig; die Prozentzahl der Erkrankten steigt von weniger als 1% bei den 45-55jährigen bis auf 10% bei den über Achtzigjährigen (Statistisches Bundesamt Deutschland). Die Herzinsuffizienz wird durch unterschiedlichste kardiale Erkrankungen ausgelöst. Sie muss immer im Zusammenhang mit der eigentlichen Grunderkrankung betrachtet werden. Der Herzinsuffizienz können unter anderem eine direkte Schädigung des Myokards (z.B. als Folge eines Infarkts oder einer Herzmuskelentzündung); ein erhöhter Blutbedarf des Organismus (z.B. bei einer Anämie); eine Hypertonie, Reiz-Leitungsstörungen oder Klappeninsuffizienzen zugrunde liegen. Als Folge der Herzinsuffizienz können die peripheren Organe nicht ausreichend mit Blut versorgt werden. Der Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des Organismus ist somit nicht gewährleistet. Als Reaktion auf die Minderdurchblutung der Organe werden Kompensationsmechanismen aktiviert (Kurzlehrbuch der Physiologie, 2003). Durch vermehrte Ausschüttung verschiedener Signalstoffe kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz, was kurzfristig zu einer verbesserten Organdurchblutung führt, langfristig gesehen jedoch in Umbauprozesse des Myokards, wie Fibrose, Hypertrophie und gesteigerter Apoptose mündet (Narula et al., 1996). Diesen Vorgang nennt man kardiales Remodelling.

Im Gegensatz zum Menschen spielt der Herzinfarkt bei Tieren eine eher untergeordnete Rolle, beim Hund kommen vor allem Herzklappeninsuffizienzen als

Ursache für koronare Herzerkrankungen vor (Praktikum der Hundeklinik, Niemand und Suttner, 2008). Beim Pferd spielen eher sekundäre Myokardschädigungen aufgrund Erkrankungen der großen Gefäße, des Endo- oder des Perikards eine Rolle (Handbuch Pferdepraxis, 2006). Dennoch ist die Grundlagenforschung auf zellulärer Ebene oft vom Tiermodell auf den Menschen übertragbar, was die Untersuchungen am Rattenmodell rechtfertigt.

Der Herzinfarkt ist eine häufige Ursache und Auslöser von kardialem Remodelling und Herzinsuffizienz. Deshalb gilt der Erforschung von Mechanismen, die nach Infarkt zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen, besonders hohes Interesse. Durch die Sauerstoffunterversorgung bei Infarkt kommt es zum Absterben von Kardiomyozyten, aber auch zur Freisetzung verschiedenster Signalmoleküle, die zum Remodelling beitragen. Hierzu gehört neben anderen der Wachstumsfaktor TGF β .

1.2 Transforming growth factor β (TGF β)

Zytokine der TGF β -Superfamilie sind Proteindimere mit pleiotropen Funktionen in vitro und in vivo (Kawabata et al., 1998). Bei Säugern konnten um die 30 Mitglieder dieser Superfamilie klassifiziert werden; unter anderem drei Isoformen von TGF β (TGF β_{1-3}), die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Aktivine (Heldin et al., 1997; Shi et al., 2003; Schmierer et al., 2007). TGF β übernimmt eine wichtige Rolle bei verschiedensten essentiellen biologischen Prozessen, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Entwicklung, Immunantwort und Apoptose (Park, 2005). Annähernd alle Körperzellen produzieren TGF β und haben eigene TGF β -Rezeptoren, sind also zugleich empfänglich für seine Wirkung (Denkler et al., 2002). Im Herzen ist TGF β am kardialen Remodelling beteiligt.

1.2.1 Aktivierung von latentem TGF β in seine bioaktive Form

Die extrazelluläre Konzentration von reifem, bioaktivem TGF β wird in erster Linie durch Umbauprozesse eines latenten, nicht bioaktiven TGF β zu einer reifen, aktiven Form reguliert. In vielen Geweben findet man signifikante Mengen von latentem TGF β ; die Aktivierung von einer nur kleinen Fraktion dieses inaktiven TGF β erzielt maximale zelluläre Aufgaben (Annes et al., 2003). Die genauen Mechanismen der Sekretion, Lagerung und Aktivierung sind noch nicht endgültig geklärt. Annes et al. (2003) zeigten ein Modell, in dem latentes TGF β als molekularer Sensor agiert und auf verschiedenste spezifische Reize mit der Überführung in aktives TGF β reagiert. TGF β sitzt als Teil eines latenten Komplexes (LLC=Large Latent Complex) an der äußeren Zellmembran vieler Körperzellen. Dieser Komplex besteht aus drei Komponenten: aus TGF β mit einer Größe von 24 kDa, welches gebunden an das "Latency-associated-protein" (LAP) vorliegt, sowie dem "Latent-TGF β -binding-protein" (LTBP), welches über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten mit dem LAP verbunden ist (Saharinen et al., 1996; Gleizes et al., 1996; Miyazono et al., 1991) (Abb.1). Als Teil des latenten Komplexes kann TGF β nicht mit seinen Rezeptoren agieren, da die Propeptide (LAPs) als Inhibitoren des aktiven TGF β agieren (Lawrence et al., 1984; Dubois et al., 1995). In dem Modell von Annes et al. bilden

die drei Komponenten des LLC (TGF β , LAP und LTBP) einen Sensor. Dieser Sensor besteht aus einem Effektor (TGF β), einem Detektor (LAP) und einem Lokalisator (LTBP). Bei Freisetzung des aktiven TGF β aus dem LLC kann TGF β an Rezeptoren binden und weitere Mechanismen in Gang setzen; daher handelt es sich hierbei um den Effektor. Aufgrund der hohen Affinität des LTBP zur extrazellulären Matrix handelt es sich hierbei um den Lokalisator, und LAP agiert als Detektor, weil sämtliche Aktivierungsmechanismen auf LAP wirken müssen, da dessen Bindung an TGF β dessen Funktionen inhibieren kann (Gentry und Nash, 1990).

Die Bioverfügbarkeit von der Synthese bis zur Freisetzung im Sensormodell läuft nach folgendem Schema ab (Annes et al. 2003): TGF β wird als ProTGF β intrazellulär gebildet (LAP gebunden an TGF β). Dieser Komplex verbindet sich mit dem LTBP. Im nächsten Schritt findet die proteolytische Spaltung der Disulfidbrücken zwischen dem Detektor (LAP) und dem Effektor (TGF β) statt. Die Spaltung versetzt den Sensor in einen kompetenten, also aktivierbaren Zustand. Dies kann intrazellulär oder auch erst nach Sekretion aus der Zelle stattfinden. Einmal sezerniert, sitzt der Komplex an der extrazellulären Matrix. Bei Spaltung der Brücken zwischen der Matrix und LTBP kann es zur Lösung des Komplexes kommen. Dieser freigesetzte Komplex aus TGF β und LAP befindet sich nach wie vor in einem latenten Zustand. Die letztendliche Freisetzung von aktivem TGF β kann dann durch verschiedene Aktivatoren bewirkt werden. Zu den bekannten Aktivatoren zählen z.B. Thrombospondin-1 (TSP-1), das Integrin $\alpha_v\beta_6$, reaktive oxygene Species (ROS), Proteasen (MMP2, MMP9, Plasmin), Schäden an der extrazellulären Membran, Veränderungen des extrazellulären Milieus z.B. eine Veränderung des pH-Wertes in einen sauren Bereich. Alle Aktivatoren haben gemeinsam, dass es zur Ablösung des LAP von TGF β kommt und dieses somit an seine Rezeptoren binden kann und weitere Kaskaden in Gang setzt. Es ist bekannt, dass TGF β nach einem Myokard-Infarkt, also einem Zustand von Hypoxie und anschließender Reoxygenierung, massiv induziert ist. Es ist vor allem in der Randzone des Infarkts vermehrt zu finden (Deten et al., 2001). Birdsall et al. (1997) beschreiben einen Anstieg von bioaktivem TGF β ungefähr 3-5 Stunden nach einem reperfundiertem Infarkt. Die genauen Mechanismen der Freisetzung/Aktivierung sind dabei jedoch nicht endgültig geklärt. Bujak et al. (2006) vermuten einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten TSP-1 Induktion im Randgebiet des Infarkts und der Aktivierung der TGF β -Signalkaskade.

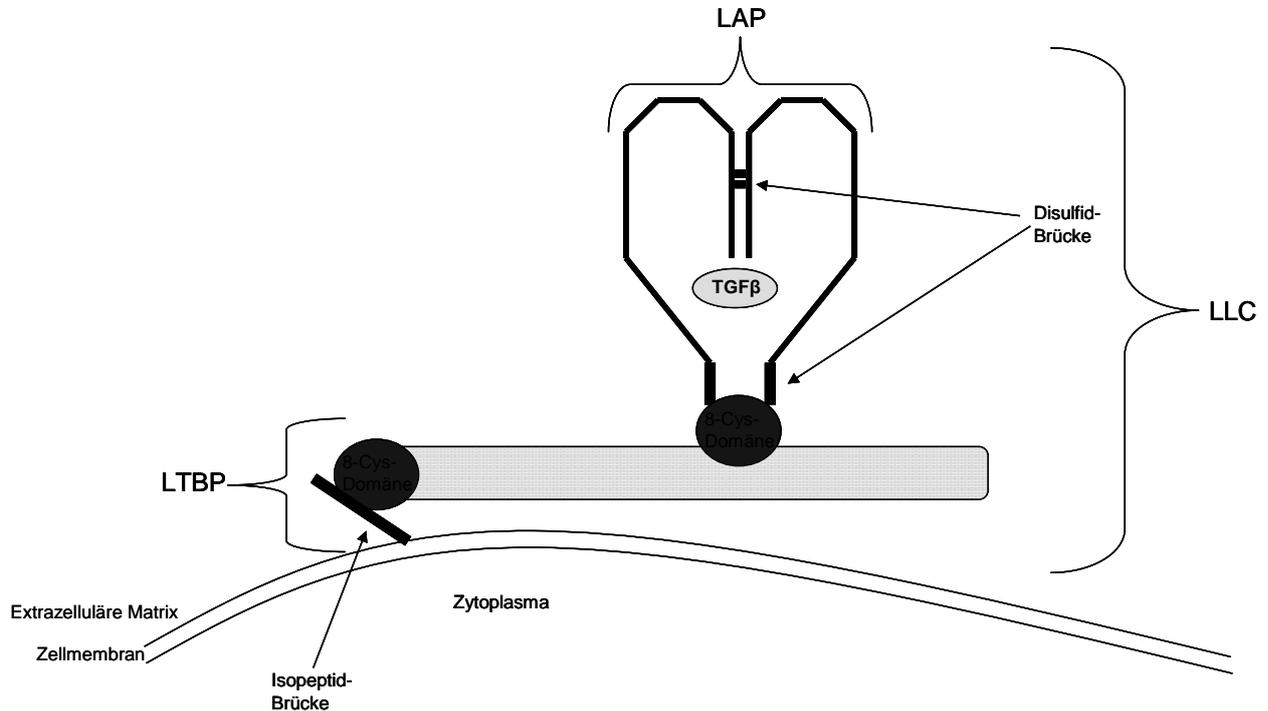


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des Large Latent Complex (LLC). Das Latent TGF Binding Protein (LTBP) ist über eine Isopeptid-Brücke mit der Zellmembran verbunden. TGFβ ist an einer Cys-Domäne über Disulfid-Brücken mit dem LTBP in Kontakt und sitzt eingebunden in dem Latent Assoziierten Protein (LAP).

1.2.2 TGFβ/SMAD-Signalkaskade

Klassische intrazelluläre Signaleffektoren der TGFβ Superfamilie (TGFβ und BMP Familie) sind die SMAD-Proteine (small mother against decapentaplegic). Man unterscheidet drei verschiedene Klassen von SMAD-Proteinen: die rezeptorabhängigen SMADs (R-SMADs: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8), Common-SMAD (Co-SMAD: SMAD4) und die inhibitorischen SMADs (SMAD6, SMAD7). Alle drei Klassen konnten im Herzen nachgewiesen werden (Euler-Tamior & Heger, 2006).

Freies, bioaktives TGFβ bindet an einen an der äußeren Zellmembran sitzenden TGFβ-TypII-Rezeptor (TGFβRII). Dieser Rezeptor ist eine aktive Serin/Threonin Kinase und phosphoryliert nach Bindung des Liganden einen ebenfalls als Kinase aktiven TGFβ-TypI-Rezeptor (TGFβRI = activin-receptor-like kinase (ALK5)) (Massague, 2000). Der TypI-Rezeptor ALK5 wird von vielen verschiedenen Zellarten exprimiert, unter anderem auch in Herzmuskelzellen und Endothelzellen. In Endothelzellen existiert zusätzlich ein weiterer TGFβ TypI Rezeptor, ALK1 (Goumans et al., 2002). Die Aktivierung des TypI-Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung der R-SMADs. Eine Aktivierung über den ALK5-Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung von SMAD2 und 3, wobei eine Aktivierung des ALK1-Rezeptors zur Phosphorylierung von SMAD1, 5 und 8 führt. Einmal phosphoryliert, bilden die R-SMADs mit dem Co-SMAD (SMAD4) einen Komplex, translozieren in den Nukleus und regulieren und modulieren dort die Transkription verschiedener Zielgene (Abb.2) (Goumans et al., 2009).

Neben dem SMAD vermittelten Signalweg kann TGFβ auch weitere Kinasen, wie die Extracellular Signal-Regulated Kinase (Erk), c-Jun-N-terminal Kinase (JNK), TGFβ-Activated Kinase 1 (TAK1) oder p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) aktivieren (Derynck et al., 2003).

Im Herzen ist bekannt, dass nach einem Myokard-Infarkt eine Induktion von TGFβ (Dean et al., 2005), sowie eine Induktion der SMAD Signaleffektoren stattfindet (Hao et al., 1999). Quelle dieser Freisetzung im Herzen könnten Kardiomyozyten und Endothelzellen sein.

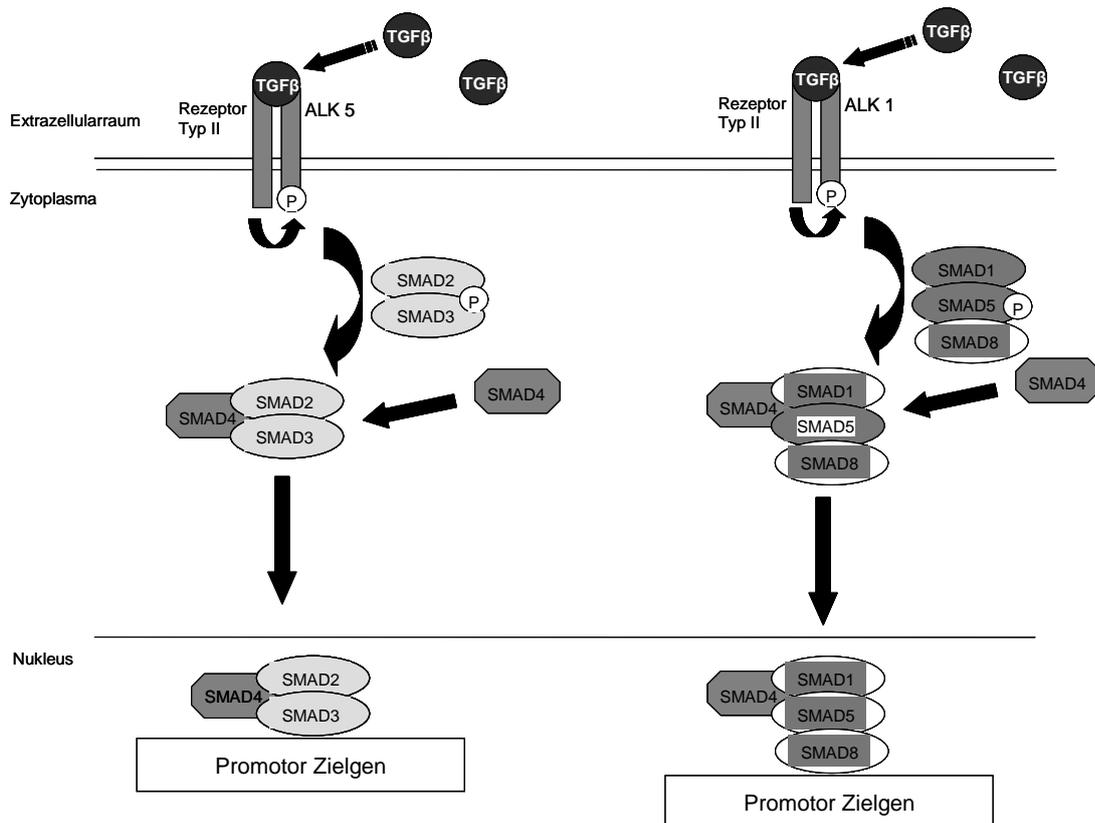


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TGFβ/SMAD-Signalkaskade. Links ist die Aktivierung von SMAD2 und 3 über den ALK5 Rezeptor, rechts die Aktivierung von SMAD1, 5 und 8 über den ALK1-Rezeptor zu sehen.

1.3 Endothelzellen

Wie zu Beginn beschrieben, werden in Kardiomyozyten nach Myokard-Infarkt Mechanismen in Gang gesetzt, die zu einer Expression/Freisetzung von TGFβ und einer anschließenden Aktivierung verschiedener Signalmoleküle führen. Diese resultieren letztendlich in kardialem Remodelling und dem Entstehen einer Herzinsuffizienz. Grundsätzlich können auch andere Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen als Quelle einer TGFβ-Freisetzung dienen.

Somit könnten Mechanismen ausgehend von mikrovaskulären Endothelzellen des Herzens katalysiert werden, welche am kardialen Remodelling beteiligt sind.

1.3.1 Endothelzellen: Aufbau und Funktion

Als Endothel bezeichnet man die innerste zellige Auskleidung von Lymph- und Blutgefäßen und serösen Höhlen (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, 1990). Es handelt sich hierbei um einschichtiges Plattenepithel, welches einer Basallamina aufsitzt. Das Endothel ist maßgeblich am Stoffaustausch zwischen interstitiellem Raum und Blut beteiligt. Es ist eine hochselektive Barriere, die für den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, Ionen und Makromolekülen und der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks verantwortlich ist. Daher kann man, je nach Gewebe, drei verschiedene Arten von Endothel unterscheiden: das geschlossene oder auch kontinuierliche Endothel (*Endotheliocytus nonfenestratus*), das fenestrierte Endothel (*Endotheliocytus fenestratus*), sowie das offene oder auch diskontinuierliche Endothel. Das fenestrierte Endothel kommt bevorzugt in Geweben vor, bei denen ein erhöhter und beschleunigter Stoffaustausch stattfindet, wie z.B. in den Nierenglomeruli, im Darm, oder in endokrinen Drüsen. Es ist durch eine große Anzahl von Poren siebartig durchbrochen. Das diskontinuierliche Endothel ist durch einen sehr lockeren Zellverband mit interzellulären Spalten gekennzeichnet: Die Basalmembran ist unterbrochen oder fehlt ganz. Es herrschen eine Vielzahl von großen Poren und eine sehr unregelmässige Form vor. Ein Beispiel für ein diskontinuierliches Endothel stellt das Endothel der Leber oder der Milz dar. Ein beschleunigter Stoffaustausch ist hier möglich (Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Liebich, 4.Auflage, 2003).

Bei dem kontinuierlichen Endothel handelt es sich um einen lückenlosen Zellverband. Es stellt den häufigsten Endotheltyp dar. Die Endothelwand ist hierbei sehr dick und erschwert somit einen schnellen transendothelialen Stoffaustausch (Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4.Auflage, 2003). Ein Beispiel stellt die Blut-Hirn-Schranke dar. Der dennoch notwendige Stoffaustausch findet über verschiedene hochselektive Transportmechanismen statt. Auch bei den im Herzen vorkommenden Endothelzellen handelt es sich um kontinuierliches Endothel.

Desweiteren ist das Endothel in vielfältiger Weise an der lokalen Gefäßreaktion beteiligt. Es produziert für die Regulation des Blutdrucks vasoaktive, parakrin wirksame Substanzen, die eine Vasodilatation (NO, Prostazyklin) oder Vasokonstriktion (Endothelin) vermitteln (Kurzlehrbuch Physiologie, Huppelsberg und Walter, 2003). Zu weiteren wichtigen Aufgaben gehört z.B. die Angiogenese. Weiterhin ist das Endothel an Entzündungsvorgängen sowie Gerinnungsprozessen (Produktion von Tissue Plasminogen Activator) beteiligt. Als erste Verteidigungslinie zwischen Blutstrom und interstitiellem Raum ist es der erste Angriffspunkt von vaskulären Noxen wie z.B. Entzündungen, traumatischen Gewebsverletzungen, Koagulationen oder Hypoxie. Auch Risikofaktoren wie Zigarettenrauch oder Hypercholesterinämie greifen in erster Linie das Endothel als Grenzschicht an (Raveendran et al., 2005). Die verschiedenen vaskulären Noxen können zu einer Funktionsstörung des Endothels (Endotheldysfunktion) führen. Die lebensnotwendige Wichtigkeit einer ungestörten Endothelintegrität wird deutlich vor dem Hintergrund, dass Erkrankungen wie der Bluthochdruck, Arteriosklerose oder Myokard-Infarkt durch Endotheldysfunktion ausgelöst werden können.

1.3.2 Endothelzellen im Zusammenhang mit Myokard-Infarkt

Die Anpassungsfähigkeit von Zellen an hypoxische Bedingungen ist ein entscheidender lebenswichtiger Faktor; variiert jedoch deutlich zwischen den verschiedenen Zelltypen. Viele Wirbellose oder niedere Wirbeltiere haben eine sehr bemerkenswerte Toleranz gegenüber Hypoxie; im Gegensatz dazu verfügen die meisten Säugerzellen nur über limitierte Strategien, um eine Sauerstoffarmut zu bewältigen. Es herrschen jedoch auch unter den Säugerzellen große Differenzen in der Sensitivität gegenüber Hypoxie (Tretyakov et al., 1995).

Endothelzellen besitzen starke Adaptationsmechanismen an hypoxische Bedingungen. Im Vergleich zu anderen Zelltypen wie z.B. Kardiomyozyten ist die Toleranz gegenüber Hypoxie hier viel ausgeprägter. Diese Fähigkeit ist essentiell, da sie als Grenzschicht und durch den direkten Kontakt mit strömendem Blut wie kein anderes Gewebe besonders großen Sauerstoffpartialschwankungen unterliegen (Noll et al, 1990; Stempien-Otero et al., 1999).

Vorangegangene Studien an humanen Endothelzellen und in vivo Tiermodellen zeigten eine Beteiligung von SMAD-Proteinen als Reaktion auf mechanischen und entzündlichen Stress (Ohno et al., 1995; Topper et al., 1997). Akman et al. (2001) führten Studien durch, in denen der Einfluss von Hypoxie und anschließender Reoxygenierung auf humane Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) analysiert wurde. In ihrer Studie zeigten Akman et al. einen besonders starken Anstieg der mRNA-Expression der TGF β ₂-Isoform unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen. Desweiteren ergab sich unter diesen Bedingungen auch eine vermehrte Freisetzung von bioaktivem TGF β , eine vermehrte Expression der mRNA des TGF β -II-Rezeptors, sowie eine erhöhte Aktivierung der SMAD-Proteine. Die genauen Mechanismen, welche letztendlich zur Induktion/Freisetzung führen, sowie die weiteren Auswirkungen sind noch ungenügend erforscht.

Weitere Studien zeigten eine vermehrte TGF β ₁-mRNA-Expression sowie eine erhöhte Bioverfügbarkeit von reifem TGF β ₁ in Zusammenhang mit erhöhter laminarer Schubbeanspruchung in bovinen Aorta-Endothelzellen (Ohno et al., 1995). Diese Studien betrachtend, erschienen Untersuchungen an mikrovaskulären Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen im Zusammenhang mit TGF β und einer eventuellen Beteiligung am kardialen Remodelling sinnvoll.

1.4 Apoptose

Einen wichtigen Teil des kardialen Remodellings stellt die Apoptose dar. Die Apoptose bezeichnet einen spezifischen, physiologisch programmierten Zelltod, welcher zur Aufrechterhaltung der Homöostase des zellulären Aufbaus von Geweben und Organen beiträgt. Sie ist durch verschiedenste zelluläre Prozesse, wie z.B. den Abbau von DNA, die Aggregation des Chromatins, einer Auflösung von Kernstrukturen und Fragmentierung der Zellen gekennzeichnet. Die Zellreste werden in kleine apoptotische Körperchen zerlegt, welche dann von Makrophagen oder benachbarten Epithelzellen abgebaut werden (Lexikon der Medizin, 16.Auflage, 2005). Im Unterschied zur Nekrose wird bei der Apoptose kein Zellplasma freigesetzt und führt somit nicht zu Entzündungsreaktionen. Die Apoptose kann in allen Körperzellen ablaufen.

Man kann den Mechanismus der Apoptose in verschiedene Phasen einteilen: die Initiationsphase, bei der man nochmals zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg unterscheidet, und die dadurch eingeleitete Effektorphase. Beim extrinsischen Weg der Initiationsphase wird die Apoptose von außen, also durch Ligandenbindung an einen an der Zellmembran liegenden Rezeptor, z.B. durch Zytokine (z.B. TGF β), eingeleitet. Beim intrinsischen Weg dagegen wird die Apoptose durch zellinterne Prozesse, wie die Freisetzung von pro-apoptotischen, also für die Zelle tödlichen Faktoren aus den Mitochondrien ins Cytosol eingeleitet; man nennt dies daher auch den mitochondrialen Weg. Auslöser für eine Freisetzung dieser pro-apoptotischen, mitochondrialen Faktoren stellen z.B. Strahlungen, Hypoxie oder Toxine dar. Beide Wege der Initiationsphase münden in einer gegenseitigen Aktivierung verschiedener Proteasen (Caspasen), welche letztendlich die Effektorphase, oder Ausführungsphase, einleiten. Die Caspasen bewirken einen aktiven Umbau der Zellmembran, bei der innen liegendes Phosphatidylserin auf die äußere Zellmembran transloziert (Bisphoric et al., 2001). Diesen Vorgang nutzt man bei der Detektion von Apoptose, da außen liegendes Phosphatidylserin durch Bindung an fluoreszenzmarkiertes Annexin unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Desweiteren erfolgt eine Aktivierung weiterer Zielproteine, wie z.B. Endonukleasen, welche genomische DNA in internukleosomale Fragmente zerlegen. Letztendlich beginnen die Zellen zu schrumpfen, es findet eine Chromatinkondensation statt und die Zelle schnürt sich in kleine Vesikel, sogenannte „apoptotische Körperchen“ ab (Ellis et al., 1991). Die apoptotischen Körperchen werden von benachbarten Fresszellen, Phagozyten, abgebaut.

Die Funktion der Apoptose liegt in der Eliminierung von geschädigten, alten, transformierten oder auch infizierten Zellen. Sie spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung von Organen und Geweben im Wachstum. Eine Inhibition des Apoptosemechanismus kann zu unkontrolliertem Tumorwachstum (Wyllie, 1997), eine gesteigerte Apoptoserate jedoch auch zu degenerativen Erkrankungen führen.

Auch am Herzen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Narula et al. (1996) zählen die Apoptose zu einem wichtigen Bestandteil der myokardialen Umbauprozesse, des kardialen Remodellings. Freude et al. (2000) beschreiben eine gesteigerte Apoptose im ischämischen und reperfundierten Herzen. Weiterhin wird ein gesteigerter Zelltod von Kardiomyozyten im Spätstadium einer Herzinsuffizienz von Guerra et al. (1999) beschrieben.

Eine Aktivierung der Apoptose kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Apoptose kann von zellinternen Prozessen, sowie von äußeren Einflüssen angeregt werden. Unter anderem zählen Zytostatika, radioaktive Strahlung, Toxine, freie O₂ Radikale, aber auch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zu den wichtigsten Apoptose-Auslösern. Zu einem wichtigen Wachstumsfaktor gehört der Transforming Growth Factor β (TGF β), welcher Apoptose in ventrikulären Kardiomyozyten induziert (Schneiders et al., 2005).

1.4.1 TGF β und Apoptose

Wie oben bereits erwähnt, ist TGF β ca. 24 Stunden nach einem Herzinfarkt hochreguliert und vor allem in der Randzone des Infarkts zu finden (Deten et al., 2001). Eine solche erhöhte Expression von TGF β unter pathophysiologischen Bedingungen kann zur Aktivierung der SMAD-Signalkaskade führen (Euler-Taimor & Heger, 2006). Neben fibrotischen Effekten haben SMAD-Proteine direkte Wirkung auf Kardiomyozyten: auf die Herzentwicklung, Zellwachstum und Apoptose (Euler-Taimor et Heger, 2005), und sind damit maßgeblich am kardialen Remodelling und somit an der Ausbildung einer Herzinsuffizienz beteiligt.

Ein weiterer Faktor, der nach Infarkt hochreguliert ist, ist AP-1. Dieser agiert als weiterer wichtiger Vermittler des kardialen Remodellings; in Kardiomyozyten wurde eine Erhöhung von AP-1 im Zusammenhang mit einer gesteigerten Apoptoserate beobachtet (Schneiders et al., 2005; Yang et al., 2003; Maulik et al., 1999). Die Mitglieder der SMAD-Familie sind dabei potentielle Bindungspartner von AP-1. Eine Stimulation von isolierten Kardiomyozyten mit TGF β_1 zeigte eine gesteigerte SMAD-Bindungsaktivität, eine gesteigerte AP-1-Bindungsaktivität sowie eine gesteigerte Apoptoserate. Durch Einsetzen von Oligonukleotiden konnte die Bindungsaktivität der SMAD Proteine und von AP-1 geblockt, sowie die Apoptoserate gesenkt werden. Somit vermitteln AP-1 und SMAD die durch TGF β induzierte Apoptose (Schneiders et al., 2005).

Neben AP-1 und SMAD kommen weitere Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner in Frage. Es ist bereits bekannt, dass z.B. die Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie zu einer Entwicklung von myokardialen Umbauprozessen beitragen können (Molkentin et al., 1998) und sie Bindungen mit AP-1 eingehen können (Schröder et al., 2006).

1.5 GATA-Transkriptionsfaktoren

GATA-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der Genexpression. In Wirbeltieren konnten bisher 6 verschiedene Transkriptionsfaktoren (1-6) identifiziert werden, von denen die Mitglieder 4-6 in Kardiomyozyten exprimiert werden (Pikkarainen et al., 2004). In mikrovaskulären Endothelzellen werden ausschließlich die Faktoren GATA2, 4 und 6 exprimiert, wobei GATA2 und GATA6 die mit Abstand am höchsten exprimierten GATA Faktoren sind (Froese et al., 2010).

Allen GATA-Faktoren gemeinsam sind zwei benachbarte Zinkfinger-Domänen; sie gehen jedoch nur mit dem C-terminalen Zinkfinger eine DNA-Bindung ein.

1.5.1 GATA-Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit TGF β im Herzen

Da die GATA-Faktoren als Bindungspartner für AP-1 in Betracht gezogen werden konnten und eine Beteiligung an myokardialen Umbauprozessen beschrieben wird, untersuchten Schröder et al. (2006) daher die GATA-Bindungsaktivität im Zusammenhang mit verschiedenen Apoptose-Stimuli an isolierten Kardiomyozyten. Sie zeigten eine gesteigerte GATA-Bindungsaktivität im Zusammenhang mit einer erhöhten TGF β_1 -Expression und -Freisetzung unter dem Einfluss von AngII. Durch Inhibition von GATA konnte die TGF β_1 -Expression und -Freisetzung wieder gesenkt werden. Daraus lässt sich schließen, dass GATA in Kardiomyozyten an der AngII-induzierten TGF β_1 -Expression und -Freisetzung beteiligt ist, welches im weiteren Signalweg autokrin oder parakrin zu späteren Zeitpunkten die SMAD Signalkaskade aktiviert (Schröder et al., 2006).

Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern zeigte genauer, dass die Faktoren GATA4 und 6 für die Vermittlung der TGF β_1 -Expression in Kardiomyozyten zuständig sind. An der AP-1 vermittelten Apoptose-Induktion konnte keine Beteiligung von GATA gezeigt werden.

Froese et al. (2010) untersuchten die Expression der einzelnen GATA-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hypoxie. Besonderes Augenmerk lag dabei auf GATA2 und 6, da diese vermehrt in mikrovaskulären Endothelzellen gebildet werden. Unter Stimulation von menschlichen Nabelvenenendothelzellen mit Wachstumsfaktoren oder Hypoxie konnte eine erhöhte Translokation von GATA2 und GATA6 in den Nukleus beobachtet werden. Froese et al. legten weiterhin besonderes Augenmerk auf GATA 6. Eine Herabregulation von GATA6 führte zu einer deutlich verminderten Zellproliferation, reduzierter Migration und verminderter Kapillarstrukturbildung. Desweiteren führte die herabregulierte Expression von GATA6 zu einer deutlich erhöhten Expression von TGF β_1 und TGF β_2 , wobei eine verstärkte GATA6-Expression zu einer verminderten Aktivität der TGF β_1 - Promoter-Aktivität führte. In den GATA6 verminderten Endothelzellen kam es außerdem zu einer erhöhten Aktivität des TGF β -Rezeptors Typ II, sowie des Signalmoleküls SMAD2. Durch Inhibition der TGF β abhängigen Signalkaskaden konnten in den GATA6 herabregulierten Endothelzellen die oben genannten Defizite (verminderte Zellproliferation, Angiogenese, reduzierte Migration) wieder aufgehoben werden. In Endothelzellen steht somit GATA6 im Zusammenhang mit der TGF β -Signalkaskade. Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Funktion und Überleben von Endothelzellen. Der Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor GATA2 und der TGF β -Signalkaskade ist dagegen weniger erforscht. GATA2 wird im Gegensatz zu GATA6 zwar auch im Herzen, jedoch nur in Endothelzellen und nicht in Kardiomyozyten exprimiert. Es spielt eine entscheidende Rolle in der vaskulären Biologie (Mammoto et al., 2009; Thum et al., 2000; Tian et al., 2009).

Eine Regulation von GATA2 in kardialen Endothelzellen nach Myokard-Infarkt wurde von Fiedler et al. (2010) untersucht. Sie konnten zeigen, dass eine kleine, nicht kodierende RNA (mikroRNA24) nach einem Infarkt in Endothelzellen massiv hochreguliert ist. In weiteren Analysen konnte der Transkriptionsfaktor GATA2 als direktes Zielgen von mikroRNA24 identifiziert werden. Mit mikroRNA24 transfizierte Endothelzellen zeigten eine gehemmte GATA2-Proteinexpression. Eine Inhibition

von mikroRNA24 mündete dagegen in einer gesteigerten GATA2-Expression. Eine Inhibition von GATA2 resultierte in einer deutlich induzierten Apoptose von Endothelzellen. GATA2 übernimmt somit ein komplexes Netzwerk an apoptotischen und angiogenetischen Programmen in Endothelzellen.

1.6 MikroRNA

MikroRNAs sind kurze, ungefähr 22 Nukleotide umfassende, nicht kodierende RNAs, welche eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation spielen. Sie werden nicht in Proteine umgeschrieben; sie modulieren jedoch die Proteinbiosynthese indem sie an das 3'UTR (Untranslated Region) - Ende der Protein-kodierenden Gentranskripte binden (Guo et al., 2010). Sie regulieren annähernd jede biologische Funktion, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellentwicklung, Zelltod und Stoffwechsel. Die Vielfältigkeit ihrer Funktionen wird nochmals deutlicher, wenn man bedenkt, dass eine einzige mikroRNA die Expression von über 100 verschiedenen Proteinen regulieren kann (Baek et al., 2009) und die Anzahl der im menschlichen Genom existierenden mikroRNAs auf ungefähr 1000 Isoformen geschätzt wird (Berezikov et al., 2005). Es wird geschätzt, dass ca. 60% aller menschlichen Gene durch mikroRNAs reguliert werden (Friedman et al., 2009). Die zeitliche und räumliche Expression zwischen den einzelnen mikroRNAs unterscheidet sich dabei erheblich. Sie spielen daher eine bedeutende Rolle in der (Patho)-physiologie fast aller Organe, insbesondere nehmen sie auch eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie im Kardiovaskulären System ein (Ikeda et al., 2007).

1.6.1 MikroRNA Biogenese

Die Biogenese von mikroRNAs beginnt im Nukleus. Dort transkribiert eine RNA-Polymerase II ein zunächst längeres Primärtranskript, die sogenannte primary mikroRNA (pri-miRNA) (Lee et al., 2004). Diese ist ca. 500-3000 Nukleotide lang und hat einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende, sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5' Ende. Das RNase-III-Enzym Drosha spaltet die pri-miRNA in ein kürzeres, ca. 100 Basenpaare großes Transkript, die precursor mikroRNA (pre-miRNA), welches typisch als Haarnadelstruktur im Nukleus vorliegt (Lee et al., 2003). Das Enzym Drosha ist dabei Teil eines großen Prozessor-Komplexes, der verschiedene Proteine, unter anderem das DiGeorge Critical Region8 Bindeprotein (Dgcr8 oder Pasha) beinhaltet (Gregory et al., 2004; Kim et al., 2009). Dgcr8 reguliert die Verbindung zwischen Drosha und pri-miRNA und bestimmt die genaue Lokalisation der Prozessierung (Gregory et al., 2004). Es existieren noch viele weitere Proteine, die Teil des Prozessor-Komplexes sind. Studien, in denen einzelne Proteine gehemmt wurden (z.B. Inhibition von p68 oder p72, beide Teil des Prozessor-Komplexes), führten zu embryonalem Zelltod. Dies zeigt, dass vermutlich viele Proteine für die Entwicklung von reifer mikroRNA essentiell sind (Fukuda et al., 2007). Die pre-mikroRNA wird mit Hilfe des Exportin-5 (EXP 5) und RAN-GTP als Energielieferant ins Zytoplasma der Zelle exportiert (Lund et al., 2004). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch das RNase III Enzym Dicer in eine ca. 22

Basenpaar große, doppelsträngige mikroRNA geschnitten. Diese mikroRNA enthält die reife mikroRNA (guide RNA), sowie den passenden Gegenstrang (mikroRNA*) (Lund et al., 2004). Die mikroRNA wird in einen Komplex, den RNA-induced silencing complex (RISC) befördert (Chendrimada et al., 2005), wobei jedoch nur ein Strang fest mit dem RISC-Komplex verbunden ist. RISC sorgt für Stabilität und Schutz der reifen mikroRNA und führt diese zur Regulation verschiedener mRNAs.

1.6.2 Regulation von mikroRNAs durch SMAD

Eine große Anzahl von mikroRNAs ändern ihre Expression als Folge einer Stimulation durch Mitglieder der TGF β Familie. In vitro und in vivo Studien belegen, dass R-SMAD Proteine die Modulation von bestimmten mikroRNAs steuern (Kong et al., 2008; Chung et al., 2010; Qin et al., 2011; Divakaran et al., 2009). Unter Stimulation mit TGF β_1 oder BMP4 konnte eine vermehrte Expression von ca. 20 mikroRNAs sowie eine inhibierte Expression von ca.10 mikroRNAs in arteriellen Muskelzellen der Lunge festgestellt werden (Davis et al., 2010). Andere Studien zeigten ähnliche Ergebnisse in Granulosazellen der Maus (Yao et al., 2010). Diese Daten lassen darauf schließen, dass mikroRNAs einen entscheidenden Bestandteil der TGF β /SMAD-Signalkaskade darstellen. Dabei kann die Stimulation mit Mitgliedern der TGF β Familie in eine positive oder negative Regulation von mikroRNAs münden. Die Art der Modulation kann dabei in 2 verschiedene Mechanismen eingeteilt werden: in eine transkriptionelle Regulation und eine posttranskriptionelle Regulation.

Bei der transkriptionellen Regulation wandert der durch TGF β induzierte Komplex aus R-SMADs/Co-SMAD in den Nukleus. Hier bindet er an spezifische SMAD-Binding-Elements (SBEs) an der Promoter-Region von mikroRNAs und kann so die Transkription der pri-mikroRNAs positiv oder negativ regulieren. Neben dieser direkten transkriptionellen Regulation, können SMADs die Transkription auch indirekt modulieren. In diesem Fall aktiviert die TGF β -Signalkaskade weitere Transkriptionsfaktoren, welche dann ihrerseits mit den Promoter-Regionen der mikroRNAs assoziieren. Die Induktion von mikroRNA 143 und mikroRNA 145 unter TGF β wird z.B. durch eine zwischengeschaltete Aktivierung von Myocardin und MRTFs (Myocardin Related Transcription factors) ausgelöst (Blahna et Hata, 2012). Die durch die transkriptionelle Regulation entstandene pri-mikroRNA durchläuft die weitere Biogenese wie bereits oben beschrieben.

Bei der posttranskriptionellen Regulation erfolgt die Modulation bei der Prozessierung von pri-mikroRNA in die pre-mikroRNA. Nach Ligandenbindung von Mitgliedern der TGF β -Familie wandern die aktivierten SMAD-Moleküle in den Nukleus. Hier binden sie an eine SBE (SMAD Binding Element)-ähnliche Sequenz, welche in der Haarnadelstruktur der pri-mikroRNA liegt und rekrutieren das RNase Enzym Drosha/DGCR8, den Mikroprozessor-Komplex, welcher daraufhin die Spaltung von pri-mikroRNA zu pre-mikroRNA vollzieht. Um den genaueren Mechanismus aufzuschlüsseln, konnten bei weiteren Untersuchungen die RNA-Helikase-Proteine p68 und p72 als SMAD-Interaktionspartner und gleichzeitig als Teile des Mikroprozessorkomplexes identifiziert werden (Fukuda et al., 2007). Neben p68 und p72 kommen jedoch noch weitere Interaktionspartner in Frage, die den Prozessorkomplex mit den SMAD-Molekülen verbinden.

Bei der transkriptionellen Bindung zwischen SMADs und DNA ist die Anwesenheit von SMAD 4 essentiell (Lagna et al., 1996). Die posttranskriptionelle pri-mikroRNA-Bindungsaktivität der R-SMADS erfolgt dagegen völlig unabhängig von SMAD 4 (Davis et al., 2008). Desweiteren ist bei der Modulation der pri-mikroRNA Prozessierung keine Phosphorylierung der R-SMADS notwendig, was die Unabhängigkeit von SMAD 4 erklärt. Die Prozessierung erfolgt hier also nicht durch einen R-SMAD/Co-SMAD Komplex, sondern nur durch nicht phosphorylierte R-SMADS (Blahna et Hata, 2012). Nicht nur mikroRNAs können durch SMADS reguliert werden, auch umgekehrt können SMAD-Proteine durch mikroRNAs, unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen moduliert werden (Blahna et al., 2012).

Kretzschmar et al. (1997) sowie Fuentealba et al. (2007) zeigten, dass auch andere Kinasen wie die Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) oder die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) die Aktivierung von R-SMADS und somit die pri-mikroRNA Prozessierung modulieren können.

1.6.3 MikroRNA im Herzen

Wie oben bereits erwähnt, ist das kardiale Remodelling durch molekulare, zelluläre und interstitielle Veränderungen charakterisiert und manifestiert sich in Änderungen von Größe, Form und Funktion des Herzens. Pathologische Veränderungen wie Fibrose, Hypertrophie und Apoptose sind Determinanten des kardialen Remodellings, welches zu späteren Zeitpunkten zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen (Bonauer et al., 2009; van Rooij et al., 2007; Urbich et al., 2008; Callis et al., 2009). Der Gedanke, dass mikroRNAs Mechanismen des kardialen Remodellings steuern, ist relativ neu (Cordes et al., 2009; Latronico et al., 2009). Vermutungen kamen auf, dass mikroRNAs bedeutend für das kardiovaskuläre System sind, da Änderungen in ihrer Expression während der Kardiogenese, jedoch auch mit zunehmenden Herzerkrankungen beobachtet werden konnten (Ikeda et al., 2007; Zhao et al., 2007; Thum et al., 2008). Die Wichtigkeit von mikroRNAs im Herzen wurde deutlich an genetischen Dicer-Knockdown-Tieren mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Hemmung einer essentiellen Komponente der mikroRNA-Biogenese (Chen et al., 2008; da Costa Martins et al., 2008). Eine Dicer-Hemmung in Kardiomyozyten mündete in einer abnormalen Morphogenese und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Zebrafisch (Wienholds et al., 2003). In Mäusen resultierte die Hemmung der mikroRNA-Biogenese in Embryonaltod (Bernstein et al., 2003).

Weitere Studien zeigen eine Beteiligung von mikroRNAs an vielfältigen weiteren molekularen und zellulären Prozessen im Herzen, wie z.B. Apoptose (Chan et al., 2005; Xu et al., 2007; Cimmino et al., 2005), Zelldifferenzierung (Kwon et al., 2005; Silber et al., 2008; Tay et al., 2008) und Kardiogenese (Zhao et al., 2005, Chen et al., 2006; Rao et al., 2006; Zhao et al., 2006; Sokol et al., 2005). MikroRNAs sind außerdem in pathologische Prozesse wie kardiale Hypertrophie (van Rooij et al., 2006; Sayed et al., 2007; Care et al., 2007; Cheng et al., 2007), Herzinsuffizienz (Thum et al., 2007), Angiogenese (Ji et al., 2007) und der Genese von Arrhythmien (Yang et al., 2007) involviert.

MikroRNAs treten aber nicht nur in Zusammenhang mit pathologischen Prozessen am Herzen auf. Vorangegangene Studien zeigten, dass im Herzen durch verschiedene Stressoren, wie z.B. nach einem Infarkt, Mechanismen in Gang gesetzt werden können, welche die Entstehung eines Myokard-Infarkts reduzieren (Marber et al., 1993; Currie et al., 1993; Hutter et al., 1994). Yin et al. (2008) bestätigten diese These. Sie zeigten eine Induktion von mikroRNA1, 21 und 24 nach kardialen Stress. Eine Stimulation von Kardiomyozyten mit diesen mikroRNAs reduzierte die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion deutlich. Sie zeigten weiterhin, dass dieser Schutzmechanismus vor Ischämie /Reperfusion mit der durch mikroRNAs vermittelten Inhibition von pro-apoptischen Genen (z.B. die Caspase Familienmitglieder 1, 2, 8, 14; Bid (BH3 interacting domain death agonist); Bcl-10 (B-cell leukemia/lymphoma 10) und der Induktion von anti-apoptischen Genen (z.B. Bag-3 (Bcl-2-associated athanogene), Prdx2 (Peroxisredoxin 2) einhergeht. Durch Einsetzen eines mikroRNA-Inhibitors konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden.

Neben Kardiomyozyten spielen auch Endothelzellen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion. Sie übernehmen wichtige Funktionen in der Angiogenese. Die Wichtigkeit von mikroRNAs für die Angiogenese und die Endothelzellfunktion wurde in Dicer-knockdown-Mäusen deutlich. Eine endothelspezifische Inhibition von Dicer, einem entscheidenden Enzym für die mikroRNA-Prozessierung, resultierte in einer reduzierten Angiogenese als Antwort auf Reize wie Ischämie, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder Wundheilung (Kuehbacher et al., 2007; Suarez et al., 2007).

Es existiert eine hohe Anzahl von mikroRNAs im Herzen. In der vorliegenden Arbeit soll das Interesse den mikroRNAs 1, 21 und 24 gelten, da diese in vorangegangenen Studien im Zusammenhang mit kardialen Umbauprozessen erwähnt wurden (Yin et al., 2008).

MikroRNA1 ist eine muskelspezifische mikroRNA (Lim et al., 2005), welche bei Patienten mit Schäden der Koronararterien vermehrt exprimiert wird.

MikroRNA21 wird in allen Zelltypen des kardiovaskulären Systems (Kardiomyozyten (Cheng et al., 2010), vaskulären Muskelzellen (Davis et al., 2008) und Endothelzellen (Suarez et al., 2007)), am prominentesten jedoch in kardialen Fibroblasten exprimiert (Thum et al., 2008). Im gesunden Herzen wird sie nur schwach exprimiert, in fibroblastenreichen Infarktregionen tritt sie jedoch stark hochreguliert auf. (Bauersachs et al., 2010). Sie gehört zu einer der am stärksten regulierten mikroRNAs als Reaktion auf kardialen Stress. In kardialen hypertrophen Tiermodellen sowie bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beim Menschen ist sie 5-10fach hochreguliert (Thum et al., 2008; van Rooij et al., 2006).

MikroRNA24 wird in vielen Organen exprimiert (Landgraf et al., 2007), in Endothelzellen ist sie jedoch mit Abstand am meisten vertreten (Zhou et al., 2011). Fiedler et al. (2011) identifizieren mikroRNA24 als entscheidenden Regulator von endothelialer Zellapoptose und Angiogenese. Im Herzen konnte eine Anreicherung von mikroRNA24 mit Abstand am höchsten in Endothelzellen gezeigt werden, welche unter hypoxen Bedingungen vermehrt exprimiert wird (Fiedler et al., 2011). Als Interaktionspartner konnte unter anderem der im Endothel stark angereicherte Transkriptionsfaktor GATA2, ein wichtiger Faktor in der vaskulären Biologie, identifiziert werden (Mammoto et al., 2009; Thum et al., 2000; Tian et al., 2009).

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Die Bedeutung der Freisetzung von TGF β unter Hypoxie/Reoxygenierung aus Endothelzellen sollte im Hinblick auf Vorgänge des kardialen Remodellings untersucht werden. Dabei wurden folgende wichtige Punkte analysiert:

- 1) Es sollte untersucht werden, ob mikrovaskuläre Endothelzellen des Herzens unter hypoxen und reoxygenierten Bedingungen Quelle einer vermehrten TGF β -Expression und/oder -Freisetzung sind. Im Detail sollte geklärt werden, um welche Isoform es sich bei der TGF β Expression/Freisetzung handelt und zu welchem Zeitpunkt der Reoxygenierung diese stattfindet.
- 2) Im Weiteren sollten die intrazellulären Signalkaskaden untersucht werden, die durch TGF β ausgelöst werden; besonderes Augenmerk lag dabei auf den SMAD-Proteinen. Es interessierte jedoch nicht nur die autokrine Aktivierung von SMAD-Proteinen in Endothelzellen, sondern auch die parakrine Wirkung auf Kardiomyozyten.
- 3) Da GATA-Transkriptionsfaktoren als Bindungspartner von SMAD-Molekülen identifiziert wurden und eine Beteiligung dieser an kardialen Umbauprozessen bekannt ist, interessierte auch eine Beteiligung von GATA an der intrazellulären Signalkaskade.
- 4) Die hypoxische Induktion von mikroRNAs in Abhängigkeit von der TGF β /SMAD-Signalkaskade sollte in Endothelzellen überprüft werden.
- 5) Apoptose stellt einen Anteil des kardialen Remodellings dar, der zum Verlust von Herzmuskelzellen führt. Deshalb sollte überprüft werden, ob von Endothelzellen freigesetztes TGF β Apoptose in Kardiomyozyten induziert und ob damit eine neue Quelle als Auslöser für kardiales Remodelling identifiziert werden konnte.

2 Material

2.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Amphotericin B	Invitrogen, Karlsruhe
ATP	Invitrogen, Karlsruhe
Basenpaar DNA Marker (100bp)	New England Biolabs, Frankfurt
Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
β - Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
β - Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol	Sigma, Taufkirchen
DNase	Novagen, Darmstadt
DNase-Puffer	Novagen, Darmstadt
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Cölbe
First-strand Reaktionsmix, 2x	Invitrogen, Karlsruhe
Folin-Ciocalteu` sches Phenolreagenz	Sigma, Taufkirchen
gDNA Wipeout Puffer, 7x	Qiagen, Hilden
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂ x6H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
miRNA Reaktionspuffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
MnCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Roth, Karlsruhe
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidect P40	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Oligo dT	Roche, Mannheim
PCR Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Poly A Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Applichem, Darmstadt
Primerhybridisierungspuffer (Annealing buffer)	Invitrogen, Karlsruhe
Rainbow Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
RNasin	Promega, Mannheim
RT-Puffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
RT-Puffer	Qiagen, Hilden
RT Primer Mix	Qiagen, Hilden
SB 431542	Cayman Chemical Company, Michigan , USA
SDS	Merck, Darmstadt
Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot

SuperScript III RT/RNaseOUT Enzym Mix	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal [®] West Pico-Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific, Rockfort
SYBR [®] Safe	Invitrogen, Karlsruhe
iQ-SYBR [®] green-Supermix	Biorad, München
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TCA	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Invitrogen, Karlsruhe
TGF β ₁	Cell Systems, Köln
TRIS	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Sigma, Taufkirchen
Universeller RT Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Universeller qPCR Primer	Invitrogen, Karlsruhe
W-1 (1%)	Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Calbiochem (Bad Soden) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Antikörper für Immunoblots

Anti-mouse IgG	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
Anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Aktin	Sigma, Taufkirchen
Donkey anti-goat	Dianova, Hamburg
GATA2	Santa Cruz Biotechnology, INC.
GATA4	Santa Cruz Biotechnology, INC.
GATA5	Santa Cruz Biotechnology, INC.
GATA6	Santa Cruz Biotechnology, INC.
P-SMAD1/3	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
P-SMAD1/5	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
P-SMAD1/5/8	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
P-SMAD2	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
P-SMAD3	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
SMAD2	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
SMAD3	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
SMAD4	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
TGF β	Cell Signaling, NEB, Frankfurt a.M.
Vinculin	Sigma, Taufkirchen

2.3 Primer für RT-PCR und real time PCR

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

B2M	forward reverse	GCC GTC GTG CTT GCC ATT C CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C
HPRT	forward reverse	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC
microRNA24	forward reverse	TGG CTC AGT TCA GCA GGA ACA G Universeller Primer
microRNA21	forward reverse	TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A Universeller Primer
microRNA1	forward reverse	TGG AAT GTA AAG AAG TGT GTA Universeller Primer
SMAD2	forward reverse	AGA CGG CTT TAC AGA TCC ATC TTA GGC ACT CGG CAA ACA CTT
SMAD3	forward reverse	ACA GCA TGG ACG CAG GTT CT TCA CTG AGG CAC TCC GCA AA
SMAD4	forward reverse	GTT GCA GAT AGC TTC AGG GC TGC TGA AGA TGG CCG TTT TGG TG
SMAD7	forward reverse	GCT GCT ACC CCA TCT TCA TC CAG CCC TTC ACG AAG CTT AT
TGFβ	forward reverse	AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT

2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Puffer, Lösungen und Medien mit Aqua bidest. als Lösungsmittel angesetzt. Häufig verwendete Lösungen wurden mehrfach konzentriert angesetzt, autoklaviert und steril filtriert. Bei Gebrauch wurden die mehrfach konzentrierten Stammlösungen mit Aqua bidest. auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Angaben beziehen sich auf einen Liter Gesamtvolumen, wenn nicht anders angegeben.

<u>1 x Anodenpuffer:</u>	Tris, 30 mM	3,63 g
	Methanol	20 % (vol/vol)
	Aqua bidest.	Ad 1 l
	pH auf 10,4 einstellen	

<u>10 x Anodenpuffer:</u>	Tris, 30 mM	36,3 g
	Methanol	20 % (vol/vol)
	Aqua bidest	Ad 1 l
	pH auf 10,4 einstellen	
<u>Ausplattiermedium/Waschmedium für isolierte Endothelzellen:</u>	M199/CO ₂	x ml
	Streptomycin/Penicillin	4 %
	FCS	10 %
	NCS	10 %
<u>Ausplattiermedium/Waschmedium für isolierte Kardiomyozyten:</u>	CCT Medium	x ml
	Streptomycin/Penicillin	2 %
	Gentamycin	0,1 %
<u>CCT-Kulturmedium:</u>	M199/HEPES- Stammlösung	x ml
	Kreatin	5 mM
	Karnitin	2 mM
	Taurin	5 mM
	Penicillin	100 IU/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	Cytosin-β-	10 µM
	Arabinofuranosid	
<u>DNA-Lade-Puffer:</u>	Bromphenolblau	0,25% (vol/vol)
	Glyzerin	30,00% (vol/vol)
<u>HEPES-Medium:</u>	NaCl	125,0 mM
	KCl	2,6 mM
	MgCl ₂ x6H ₂ O	1,2 mM
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
	HEPES	25 mM
<u>Kathodenpuffer:</u>	Tris, 25 mM	3,03 g
	6-Aminohexansäure, 40 mM	5,25 g
	Methanol	20 % (vol/vol)
	Aqua bidest.	Ad 1 l
	pH 9,4 einstellen	
<u>4 x Lämmli-Puffer:</u>	Tris/HCl pH 6,8	0,5 mol/l
	Glycerin	25 % (vol/vol)
	SDS	4 % (wt(vol))
	β-Mercaptoethanol	1 % (vol/vol)
	Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)

		Material
<u>1 x Laufpuffer :</u>	Tris/HCl pH 8,2-8,5 Glycin SDS	24,8 mM 192,0 mM 1 %
<u>M199/HEPES-Stammlösung:</u>	M199 HEPES Aqua bidest. pH 7,4 einstellen	9,62 g/l 15,1 mM Ad 10 l
<u>M199/CO₂-Stammlösung:</u>	M199 HEPES NaHCO ₃ Aqua bidest. pH 7,4 einstellen	9,5 g 15,0 mmol/l 17,9 mmol/l Ad 1l
<u>10 x PBS:</u>	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	2,7 mM 1,5 mM 150,0 mM 8,1 mM
<u>Powell-Medium:</u>	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ NaHCO ₃ Glukose	110,0 mM 2,6 mM 1,2 mM 1,0 mM 25,0 mM 11,0 mM
<u>Reagenz A:</u>	Natrium-Kalium-Tatrat 3,3% Cu ₂ SO ₄ 1,25% Na ₂ CO ₃ 2,5%	200 µl (wt/vol) 200 µl (wt/vol) 19,6ml (wt/vol)
<u>Ripa Puffer (1ml):</u>	Ripa Stocklösung PMSF (0,1M) EDTA (0,2M) β-Glycerophosphat (1M)	945 µl 10 µl 5 µl 40 µl
<u>Ripa Stocklösung:</u>	Tris pH 7,5 NaCl Nonidect P 40 Desoxycholat SDS	50 mM 150 mM 1% (wt/vol) 0,5 % (wt/vol) 0,1 % (wt/vol)
<u>50 x TAE-Puffer:</u>	Tris Eisessig EDTA (0,5M)	2 M 1 M 50 mM

		Material
<u>10 x TBS:</u>	Tris NaCl pH 7,4	10 mM 150 mM
<u>TE-Puffer:</u>	Tris (1M) pH8,0 EDTA (0,5M)	10 mM 1 mM
<u>Vorplattiermedium für Kardiomyozyten:</u>	CCT-Kulturmedium FCS	x ml 4 %

2.5 Geräte und Laborbedarf

2.5.1 Allgemein verwendete Geräte

Glaswaren	Schott, Mainz
Gummiunterlage für Hypoxiekammern	Eigenbau Physiologie Gießen
Heizblock	Techne AG, Burkhardsdorf
Heizrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen
Hypoxiekammern	Eigenbau Physiologie Gießen
Hypoxiekammerklemmen	Eigenbau Physiologie Gießen
Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnetheizrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen
Mikrotiterplatten 96well	Dynatech, Denkendorf
Mikrotiterplattenphotometer	Dynatech, Denkendorf
Microplate reader Tecan infinite 200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Pellet pestle [®]	Kimble Kontes, New Jersey, USA
pH 211 Microprozessor pH-Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Photometer	Perkin Elmer, Waltham USA
Sample Mixer Dynal [®] Model Mixi	Invitrogen, Darmstadt
Schüttler Type Polymax 2040	Heidolph, Kelheim
Wärmeplatten	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Wasserbad	Julabi, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge Allegra [™] 25 R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.5.2 Zellkultur

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Gewebehacker	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten

Langendorff-Apparatur
Mikroskop
Nylonnetz (Polyamid, 200µm)
Präparationsbesteck
Sterilbank

Eigenbau Physiologie, Gießen
TMS-F, Nikon, Japan
NeoLab, Heidelberg
Aeskulap, Heidelberg
Heraeus, Hanau

2.5.3 Verbrauchsmaterialien

Falcons 50 ml
Frischhaltefolie
Kulturschalen Typ 3001
Kulturschalen Typ 3004
Kulturschalen Typ 3803
Mikrotiterplatten Typ 3910
Parafilm
Pipettenspitzen
Reaktionsgefäße 0,5ml
Reaktionsgefäße 1ml
Reaktionsgefäße 2ml
Sterilfilter
Thermo-Strips Reaktionsgefäße
Zellschaber

Becton Dickonson, Heidelberg
Aldi Süd, Mühlheim
Becton Dickonson, Heidelberg
Becton Dickonson, Heidelberg
Becton Dickonson, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg
Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
GE Healthcare Europe, München
Thermo-Scientific, Rockfort
Becton Dickinson, Heidelberg

2.5.4 Western Blot

Chemi-Doc System
Elektroblotkammer
Filterpapier
Hamiltonspritze 50 ml
Hofer-Elektrophoresekammer
Hofer Glasplatten
Hofer-Kamm
Hofer-Plattenklemmen
Hofer-Spacer
Immobilon P (PVDF Membran)
Netzgerät
Nitrozellulose Transfer Membran
PEQLAB System, Chemi-Smart-5100
Trockenpapiere Universal

BioRad, München
Biometra, Göttingen
Biotech-Fischer, Reiskirchen
Hamilton, Bonaduz, Schweiz
GE Healthcare Europe, München
Millipore, Eschborn
Biometra, Göttingen
Millipore, Eschborn
PEQLAB, Erlangen
Biotech-Fischer, Reiskirchen

2.5.5 PCR

Elektrophoresekammer (DNA)
iCycler
Nano Drop® ND-1000

GE Healthcare Europe, München
BioRad, München
PEQLAB, Erlangen

Thermocycler

Techne, Wertheim-Bestenheid

2.5.6 Software

Adobe Photoshop

Adobe Systems, San Jose, USA

Microsoft Windows XP®

Microsoft Corp., Redmont, USA

Microsoft Word 2000®

Microsoft Corp., Redmont, USA

Microsoft Excel 2000®

Microsoft Corp., Redmont, USA

Microsoft Power Point®

Microsoft Corp., Redmont, USA

Microsoft Paint®

Microsoft Corp., Redmont, USA

iCycler™ iQ Optical System Software

BioRad, München

Quantity One

BioRad, München

SPSS

SPSS GmbH Software, München

3 Methoden

3.1 Isolierung von koronaren Endothelzellen der Ratte

3.1.1 Versuchstiere

Zur Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen wurden Ratten aus hauseigener Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet. Es handelte sich dabei um 3-4 Monate alte, männliche Wistar Ratten mit einem Lebendgewicht von ca. 300-400g. Den Tieren stand Futter (Standardfutter Altromin[®]) und Wasser zur freien Verfügung.

3.1.2 Präparation und Zellkultur von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Rattenherz

Die Sektion der Ratten, die Präparation ihrer Herzen und die Isolierung der Endothelzellen sowie Kardiomyozyten erfolgte nach der Methode von Schlüter und Schreiber (Schlüter und Schreiber, 2005). Vor Beginn der Präparation wurde das Langendorff-Perfusionssystem mit Aqua bidest. und anschließend mit Powell-Medium gespült. Daraufhin folgte das luftblasenfreie Befüllen der Anlage mit Powell-Medium. Dieses wurde kontinuierlich mit Carbogen begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Das Perfusionsmedium wurde konstant auf 37°C gehalten. Nach einer kurzen Isoflurannarkose bis zum Erreichen einer tiefen Bewusstlosigkeit wurden die Ratten durch Überstreckung des Rückenmarks, und somit durch Genickbruch, getötet. Über eine dorsolaterale Thorakotomie wurde das Herz zusammen mit der Lunge entfernt und sofort in eine Petrischale mit 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung verbracht. Hier wurde das Herz von anhängenden Organ- und Geweberesten befreit, und die Aorta weiter freipräpariert. Dann wurde das Herz mittels einer Perfusionskanüle an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit ca. 50 ml Powell-Medium blutleer gespült. Darauf folgte die retrograde, rezirkulierende Perfusion mit 50 ml Kollagenasepuffer für 25 Minuten. Die Flussrate wurde auf 5ml/min/Herz eingestellt. Nach Beendigung der Reperfusion wurden von dem Herz die Vorhöfe, große Gefäße und Bindegewebe entfernt. Das Herz wurde zunächst in 5 mm große Stücke zerkleinert. Anschließend folgte eine weitere mechanische Zerkleinerung mit einem Gewebehacker (Schnittstärkeneinstellung: 0,7mm) in zwei Ebenen. Für einen weiteren enzymatischen Aufschluss wurde der Gewebebrei in 37°C warmen Kollagenasepuffer überführt. Unter ständiger Carbogen-Begasung wurde unter kontinuierlichem Auf- und Abpipettieren eine zunehmende Separierung des Homogenats erreicht. Nach dem zehnmütigen Nachverdau wurde die Zellsuspension durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und anschließend drei Minuten bei 400 U/min zentrifugiert, um intakte Zellen von Zelldetritus und Gewebetrümmern zu separieren. Der Überstand des Zentrifugats

wurde nun zur Endothelzellisolierung, das gewonnene Sediment zur Isolierung von Kardiomyozyten (s.Kapitel 3.2.2) verwendet. Der Überstand wurde mit 10 mg Trypsin und 30 ml CaCl_2 -Lösung (100mmol/l) versetzt und bei 37 °C mittels eines elektrischen Rührers für 30 Minuten unter ständiger Carbogenbegasung durchmischt. Die gewonnene Zellsuspension wurde nach erfolgter Inkubation in 60 ml M199/ CO_2 aufgenommen. Das durch eine anschließende Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in 10 ml 37 °C warmes Ausplattiermedium überführt. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellsuspension wurde nun unter der Sterilbank auf einer Primariaschale® Falcon Typ 3803 in 20 ml Medium ausplattiert und für 4 Stunden im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit Waschmedium gewaschen, um nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden nun mehrere Tage im CO_2 -Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenten Zellrasen ausgebildet hat. Währenddessen wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt, wobei sich die Antibiotikakonzentration von anfänglich 5% auf 2 % reduzierte.

3.1.3 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen

Nach ca. 5 Tagen hatte sich ein konfluenten Zellrasen ausgebildet. Nachdem die Zellen mikroskopisch auf Wachstum und Verkeimung kontrolliert wurden, wurden sie mehrmals mit 37°C vorgewärmtem M199- Medium gewaschen. Nach dem Absaugen des Waschmediums wurde der konfluente Zellrasen durch 5minütiges Inkubieren in 5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank gelöst. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen von der Kulturschale, sowie die Lösung der Zellen untereinander erneut mikroskopisch kontrolliert und die enzymatische Reaktion durch Überführen in Ausplattiermedium gestoppt. Um die Zelldichte zu bestimmen, wurden ca. 10 μl des zellhaltigen Mediums in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop die Zellen von 4 Großquadraten ausgezählt. Mit diesem Wert konnte man nun die Zelldichte errechnen:

Summe der gezählten Zellen * 2500 = Zellzahl pro ml

Um die gewünschte Zellzahl zu errechnen, benutzt man folgende Formel:

Gewünschte Zellzahl pro Kulturschale / Zellzahl pro ml = x ml endothelzellhaltiges Medium

Die errechnete Menge endothelzellhaltigen Mediums wurde nun auf die je nach Versuchsansatz benötigte Anzahl Kulturschalen ausplattiert. Es wurden ungefähr 200000 Zellen pro Kulturschale ausplattiert. Bei den Kulturschalen handelte es sich je nach Versuchsprotokoll um Falcon Typ 3001 oder Falcon Typ 3004. Die Zellen wurden nun im Brutschrank unter CO_2 -haltigen Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Weiterverwendung der Zellen erfolgte je nach Wachstumsrate nach 1 bis 3 Tagen, nachdem sich wieder ein konfluenten Zellrasen ausgebildet hatte.

3.2 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten

3.2.1 Versuchstiere

Zur Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten wurden die gleichen Ratten verwendet, die auch bei der Isolierung der mikrovaskulären Endothelzellen verwendet wurden.

3.2.2 Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus der Ratte

Als Quelle für die Kardiomyozyten dienten dieselben Herzen, die auch für die Isolierung der Endothelzellen (s.Kapitel 3.1.2.) verwendet wurden. Das bei der Filtration der Zellsuspension durch das Nylonnetz gewonnene Sediment wurde zur Kardiomyozytenisolierung verwendet. Das Sediment wurde in 10 ml Powellmedium mit 200 μM Calciumchlorid resuspendiert und für weitere zwei Minuten bei 400 U/min zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Zellpellet wurde anschließend in 15 ml Powellmedium mit 400 μM Calciumchlorid aufgenommen und zu einer homogenen Masse aufgeschüttelt. Durch die ansteigende Konzentration des Calciumchlorids konnten sich die Kardiomyozyten langsam an das Calcium gewöhnen. Die homogene Zellmasse wurde nun in mehrere Reagenzgläser gefüllt und einer letzten, abschließenden Zentrifugation für eine Minute bei 300 U/min unterzogen. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erhielt man eine Zellpopulation mit 40-60 % intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.2.3 Vorinkubation der Kulturschalen für ventrikuläre Kardiomyozyten

Damit ein Anheften der Kardiomyozyten an die Kulturschalen (Falcon Typ 3001 oder 3004) gewährleistet werden konnte, wurden diese mit Vorplattiermedium für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Ausplattieren der ventrikulären Kardiomyozyten

Kurz vor dem Ausplattieren der Zellen wurde das Vorplattiermedium abgesaugt. Das aus der Präparation gewonnene Zellhomogenat wurde in Ausplattiermedium überführt und auf die Kulturschalen ausplattiert. Nach mikroskopischer Kontrolle und einer ca. zweistündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C unter CO₂-freien Bedingungen wurden die Kardiomyozyten zweimal mit Waschmedium gewaschen. Die nicht funktionsfähigen und somit nicht angehafteten Zellen wurden somit entfernt. Auf die verbliebenen Zellen wurde erneut Ausplattiermedium gegeben. Der Anteil an intakten, stäbchenförmigen Zellen betrug nun ca. 90%. Nach einer 10minütigen Ruhepause für die Kardiomyozyten wurden diese je nach Versuchsansatz induziert.

3.3 Hypoxie/Normoxie und Reoxygenierung der Endothelzellen

Für den Versuchsansatz wurden die Endothelzellen zunächst einem Mediumwechsel unterzogen. Das Ausplattiermedium wurde abgesaugt und stattdessen wurden die Zellen in 3 ml HEPES-Puffer und zusätzlich 1,3 mmol Calciumchlorid resuspendiert. Nach einer halbstündigen Ruhepause auf 37°C warmen Wärmeplatten wurden die Deckel der Kulturschalen entfernt und durch Deckel ersetzt, welche mittig eine im Durchmesser ca. zwei cm große Öffnung besitzen. Die Kulturschalen, welche sich weiterhin auf den Wärmeplatten befanden, wurden nun mit luftdichten Kunststoffkammern bedeckt. Diese Kammern wurden mit ihren Kanten auf eine Gummiunterlage gesetzt, damit die Dichte der Kammern gewährleistet werden konnte. Die Kammern besitzen zwei Öffnungen an zwei gegenüberliegenden Seiten, welche beide mit einem Schlauch verbunden wurden. Somit war ein Gaszufluss und ein Gasabfluss möglich. Eine Kammer wurde über einen Schlauch mit einer N₂-Gasflasche verbunden, die andere Kammer wurde mit einer Pumpe verbunden. Die jeweils abführenden Schläuche mündeten in einen Kolben, der mit Wasser gefüllt war. Eine Hypoxie, bzw. Normoxie wurde durch ein zweistündiges Begasen der Zellen mit N₂, bzw. Luft erzeugt. Dabei wurde auf einen gleichmäßigen Gasfluss in beiden Kammern geachtet. Um ein Austrocknen der Zellen während der Begasung zu verhindern, wurde im Sinne eines Hygrophors in Wasser getränkter Zellstoff mit unter die Kammern gelegt. Die normoxen Endothelzellen dienten in diesem Versuchsansatz als Kontrolle. Weitere Kontrollzellen stellten völlig unbehandelte Zellen, sowie nur mit Mediumwechsel behandelte Zellen derselben Präparation dar. Im Anschluss an die Begasung wurde erneut das Medium gewechselt. Die Endothelzellen wurden wiederum mit Ausplattiermedium versetzt und im Brutschrank unter CO₂-haltigen Bedingungen bei 37°C inkubiert und somit reoxygeniert. Je nach Versuchsprotokoll wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Reoxygenierung geerntet.

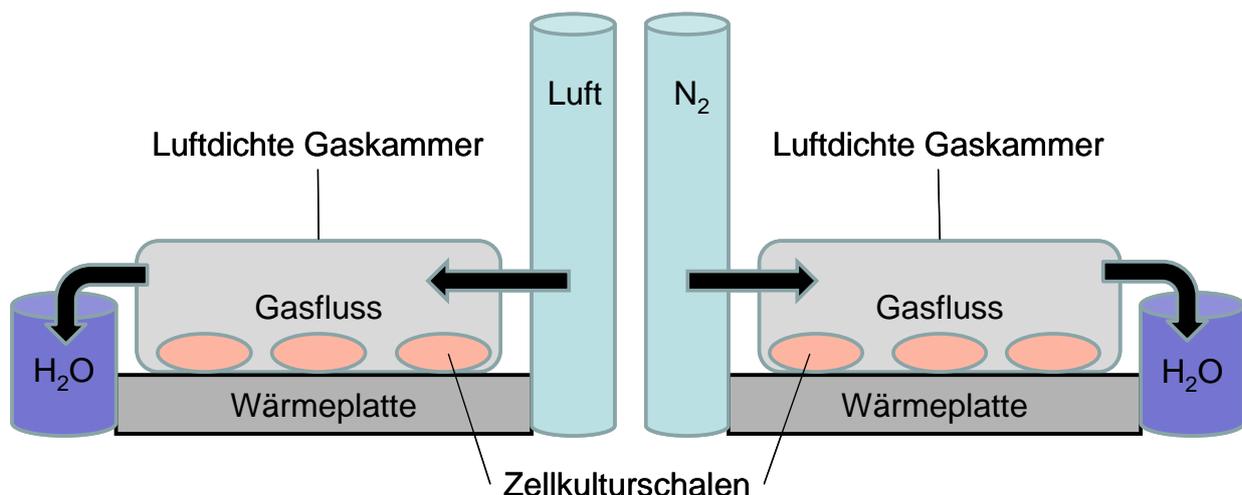


Abbildung 3:

Darstellung der Begasung von Zellkulturen mit Stickstoff/Sauerstoff. Die Zellen befinden sich auf 37°C warmen Wärmeplatten und werden unter luftdichten Gaskammern kontinuierlich über 2 Stunden begast. Die Gase werden in einen mit Wasser gefüllten Kolben abgeleitet.

3.4 Proteinnachweis

3.4.1 Zellernte zur Isolierung von Gesamtprotein

Die Zellernte zur Isolierung von Gesamtprotein verlief bei Endothelzellen sowie Kardiomyozyten auf die gleiche Weise. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen zwei Mal mit einfach konzentrierter, kalter PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden zur Zellmembranlyse, je nach Größe der Kulturschale, 100 µl (Falcon Typ 3001) bzw. 200 µl (Falcon Typ 3004) Ripa-Puffer auf die Zellen gegeben. Um die Nukleinsäuren zu lysieren wurden zusätzlich 5 µl Benzonase[®] und 4 µl Magnesiumchlorid (130mmol) zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die noch angehafteten und gelösten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 12000 U/min und 4°C. Der Überstand, der nun das extrahierte Protein enthielt, wurde erneut in ein Eppendorfgefäß verbracht. Die so aufbereiteten Proben konnten nun zur Proteinmengenbestimmung direkt weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren und gelagert werden. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde verworfen.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinmengenbestimmung nach Lowry ist eine Methode zur Bestimmung der Konzentration löslicher und unlöslicher Proteine (Lowry et al., 1951). Grundsätzlich kann man eine quantitative Proteinmengenbestimmung auch mit der Methode nach Bradford durchführen. Die Methode nach Lowry ist allerdings sensitiver. Außerdem können in der Methode nach Lowry auch Proteinkonzentrationen in Lösungen bestimmt werden, in denen Natriumlaurylsulfat (SLS) enthalten ist, was in der Methode nach Bradford nicht möglich wäre.

Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe von BSA gelöst in Wasser hergestellt. Die Verdünnungsstufen betragen 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml BSA. Nun wurden 50 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe zusammen mit 10 µl Probenpuffer in Reaktionsgefäße verbracht. Parallel dazu wurden 50 µl Wasser mit 10 µl proteinhaltiger Probe gemischt. In jede Probe und jede Stufe der Verdünnungsreihe wurden 50 µl NaOH (5M) und 500 µl Reagenz A zugegeben. Die Ansätze wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; hierbei fand der erste Reaktionsschritt, nämlich die Biuret-Reaktion statt, eine Komplexbildung aus den Peptidbindungen mit den Kupfer(II)-ionen. Im nächsten Schritt wurden je Ansatz 100 µl Folin-Ciocalteusches Phenolreagenz zugegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend einem Zentrifugationsschritt von 30 Minuten bei 13.000 U/min unterzogen. In diesem zweiten Reaktionsschritt wurde das Folin-Ciocalteusche Phenolreagenz durch bereits reduziertes Kupfer (I) zu Molybdänblau reduziert, was sich in einem Farbumschlag von gelb nach blau zeigte. Die resultierende Blaufärbung wurde zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Von den Überständen der Ansätze, die man im Zentrifugationsschritt gewonnen hat, wurden je 200 µl auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und im Mikrotiterplattenphotometer bei 595

nm gemessen. Grundlage der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration ist das Lambert Beersche Gesetz. Es besagt, dass die Extinktion bei konstanter Wellenlänge, sowie konstanter Schichtstärke der durchstrahlten Probe direkt proportional zur Konzentration der Probe ist. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde eine Standardgerade im Sinne einer Eichgeraden bestimmt. Diese bildet die Ergebnisse ab, die aus der Umsetzung der Standardverdünnungsreihe mit demselben Reaktionsansatz wie dem für die Proteinproben gewonnen wurden. Somit resultiert die zu bestimmende Proteinkonzentration als einzige Variable.

3.4.3 Probenaufbereitung mittels Lämmli-Puffer

Die Proteinbestimmung nach Lowry diente der exakten Auftragung gleicher Konzentrationsmengen der einzelnen Proben auf ein SDS-Gel. Hierzu wurden die Proben auf den gleichen Konzentrationsbereich von ca. 50 – 120 µg eingestellt und dabei entstandene Volumenunterschiede durch Probenpuffer ausgeglichen. Das Gesamtvolumen von 61,8 µl setzte sich aus 45 µl Proben/Probenpuffer-Gemisch, 15 µl 4fach konzentriertem Lämmli-Puffer und 1,8 µl DTT zusammen. Das im Lämmli-Puffer enthaltene Glycin beschwert die Proben, so dass diese besser in die Geltaschen absinken können. Die Blaufärbung des Lämmli-Puffers diente der einfacheren Beobachtung der Lauffront der Proteine. Außerdem enthält dieser Puffer SDS, welches der Aufspaltung der Sekundär- sowie Tertiärstrukturen dient. SDS ist ein anionisches Tensid, welches die Eigenladungen der Proteine überdeckt und diese somit eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Dies ermöglicht den Proteinen nach angelegter Spannung Richtung Anode zu wandern. DTT kann durch Reduktion von Disulfidbrücken die Faltung der Proteine zerstören.

Die vorbereiteten Proben wurden nun 10 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert, was wiederum der Spaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen diente. Anschließend konnten sie direkt in der Gelelektrophorese weiterverarbeitet, oder bei – 80 °C eingefroren werden.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nun in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach unterschiedlicher Proteingröße aufgetrennt. In einem diskontinuierlichen System müssen die Proben zunächst ein oberes, grobporiges Sammelgel durchlaufen, in welchem diese konzentriert werden, um anschließend ein unteres, feinporiges Trenngel zu durchlaufen, in welchem die Proben der Größe nach aufgetrennt werden. Die beiden Gele unterscheiden sich im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und wie oben schon erwähnt, die Porengröße.

Zum Gießen des Gels mussten zunächst 2 Glasplatten sorgfältig gereinigt und mit Klammern aufeinander befestigt werden. Als Abstandhalter zwischen diesen beiden Glasplatten dienten zwei ca.1 mm dicke, und ca. 10 mm breite Spacer, welche am rechten und linken Rand vertikal aufgestellt wurden. Als unterer, luftdichter Abschluss zwischen den Glasplatten diente ein Gummischlauch. Die unteren zwei

Drittel des so entstandenen Zwischenraums wurden nun, je nach zu untersuchender Proteingröße, mit einem Trenngel einer bestimmten Konzentration befüllt. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde dieses mit Sammelgel überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, welcher nach der Polymerisierung des Gels wieder entfernt wurde. Die Glasplatten wurden in eine Gel-Elektrophoresekammer eingebaut. Die obere und untere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt, so dass das Gel zu beiden Seiten Kontakt mit dem Puffer hatte. Nachdem die durch den Kamm entstandenen Gel-Taschen mit Laufpuffer durchgespült wurden, konnten die aufbereiteten Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt werden. Eine oder mehrere Randtaschen wurden mit Molekulargewichtsmarker zur Größenorientierung befüllt. Aufgrund der konstanten negativen Ladungsverteilung der Proben, wanderten alle Proben nach Anlegen eines elektrischen Feldes nach unten, Richtung Anode. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Chlorid-Ionen aus dem Sammelgel mit hoher Mobilität Richtung Anode (Leitionen); die aus dem Laufpuffer in das Sammelgel dringenden großen Glycin-Ionen weisen eine geringere Nettoladung und somit eine geringere Mobilität als die Chloridionen auf und wandern somit langsamer (Folgeionen). Die Proteine der Proben ordnen sich zwischen diesen beiden Ionengruppen an. Da sich zwischen den Leitionen und den Folgeionen ein Spannungsgradient aufbaut, werden langsamer laufende Proteine bis kurz hinter die Leitionen beschleunigt, und schneller laufende Proteine werden kurz hinter den Leitionen abgebremst, so dass alle Proteine gleichzeitig stark konzentriert an der Grenze zum Trenngel ankommen. Hier liegt das Glycin durch den erhöhten pH-Wert des Gels vollständig dissoziiert vor und erhält dadurch eine deutlich erhöhte Nettoladung. Somit steigt die Laufgeschwindigkeit des Glycins und es überholt die Proteine. Die Proteine befinden sich nun nicht mehr in der Konzentrierungszone der erhöhten Feldstärke und können so nach unterschiedlichem Molekulargewicht im feinporigen Gel aufgetrennt werden. Bei einer Spannung von 200 V benötigt die Ionenfront etwa 2 bis 4 Stunden bis Sammel- und Trenngel komplett durchlaufen sind.

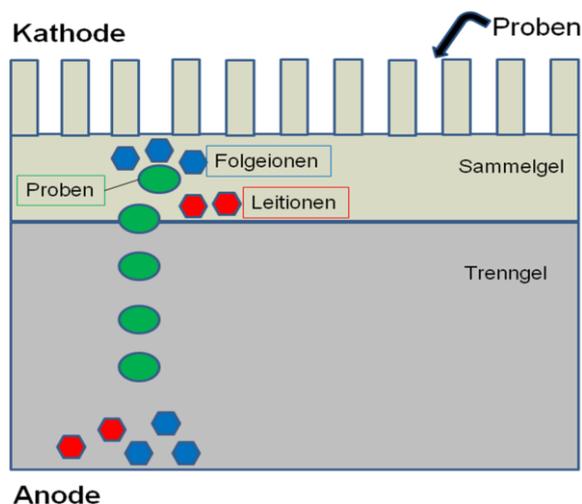


Abbildung 4:

Schema einer SDS-Gelelektrophorese. Im Sammelgel ordnen sich die Proben zwischen den schnelleren Leitionen und den langsameren Folgeionen an und erreichen somit konzentriert die Front zwischen Sammel- und Trenngel. Im Trenngel erfolgt die siebartige Auftrennung.

3.4.5 Western Blot

Um die über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit Antikörpern nachweisen zu können, mussten diese erst mittels einer Blotkammer auf eine geeignete Matrix übertragen werden. Als Träger hierfür eignen sich besonders Nylon- und Nitrozellulosemembranen. Im vorliegenden Fall wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ übertragen. Im Semi-Dry Blotverfahren wurden die Proteine nach Anlegen eines senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feldes auf die Trägermembran übertragen. Das Gel und die darunterliegende Membran wurden dabei sandwichartig in Filterpapiere eingelegt, welche zuvor in verschiedenen Puffern getränkt wurden. Die untersten Schichten der Filterpapiere wurden in 10fach konzentriertem Anodenpuffer, gefolgt von 1fach konzentriertem Anodenpuffer getränkt. Nun folgten die Nitrocellulosemembran, welche zuvor in 1fach konzentrierten Anodenpuffer getaucht wurde, und das Elektrophorese-Gel. Schließlich dienten in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere als oberster Abschluss. Bei dieser Methode war immer auf luftblasenfreies Stapeln der einzelnen Filterpapiere zu achten, damit ein kontinuierlicher Stromfluss gewährleistet werden konnte. Die Filterpapiere dienten hierbei als Ionen-Reservoir, das in den Puffern enthaltene Methanol diente dem Auswaschen des SDS aus den Protein-Komplexen, damit diese besser an die Membran binden können. Nun wurde das elektrische Feld angelegt; die Spannung sollte $50\ \text{V}$ nicht überschreiten, die benötigten Stromstärke errechnete sich aus folgender Formel: pro cm^2 Membran wurden $1,5\ \text{mA}$ eingestellt. Die Übertragung der Proteine dauerte je nach Größe der Proteine etwa 1 bis 2 Stunden. Im Anschluss an den Blot wurde die Membran mit einer Ponceaurot-S-Lösung eingefärbt. Dies diente der Überprüfung der Auftrennung sowie der Übertragung der Proteine, da Ponceaurot sich unspezifisch an alle Proteine anlagert und somit ein Bandenmuster sichtbar wurde. Die einzelnen Größenstufen des Proteinmarkers wurden markiert und die gefärbte Membran wurde fotografiert. Zur weiteren Detektion der Proteine musste die Membran zunächst durch mehrmaliges Waschen in Wasser wieder entfärbt werden.

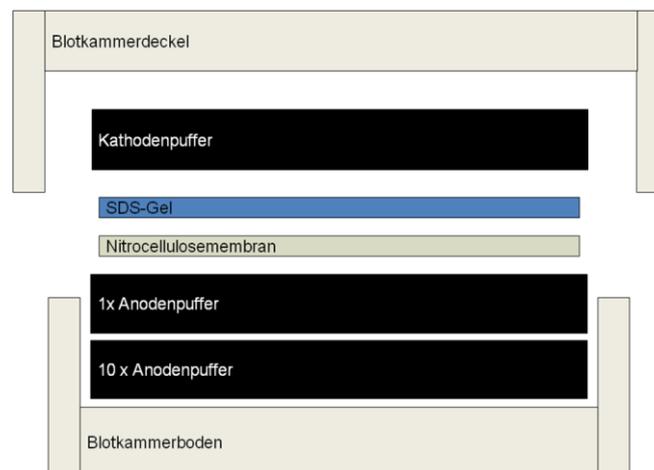


Abbildung 5:

Schema der „Sandwichartigen“ Anordnung der Filterpapiere, der Nitrozellulosemembran und des SDS-Gels in einer Blotkammer. Der Blotkammerdeckel bildet die Kathode und der Blotkammerboden bildet die Anode, der Stromfluss verläuft also von oben nach unten.

3.4.6 Immundetektion der transferierten Proteine

Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst mehrmals in Waschlösung (1xTBS/0,1%Tween) geschwenkt, um alle restlichen Farbstoffe zu entfernen. Nun wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung abgesättigt. Diese Blocklösung besetzt unspezifische Bindungsstellen und verhindert bei der späteren Detektion des spezifischen Proteins eine unspezifische Hintergrundreaktion. Als Blocklösung diente je nach Antikörper entweder 5%ige Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) oder 5%ige Magermilchlösung (MMP) in 1xTBS/0,1% Tween, da diese Proteine für die Antikörper nicht erkennbar sind. Nach dem Blocken der Membran wurde diese wiederum in Waschlösung gewaschen, um überschüssige Blocklösung zu entfernen. Der primäre Antikörper wurde je nach Herstellerangaben in einer bestimmten Konzentration, meist in 5%iger Rinderserumalbumin-Lösung oder in 5%iger Magermilchlösung in 1xTBS/0,1%Tween angesetzt. Nun wurde die Membran mit der verdünnten Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei der Erstantikörper spezifisch gegen das zu detektierende Protein auf der Membran gerichtet ist und an dieses binden konnte. Anschließend wurde die Membran zum erneuten Säubern mehrmals in Waschlösung geschwenkt, wobei schwächer haftende, unspezifische Antikörper entfernt wurden. Nun folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher spezifisch gegen bestimmte Fc-Bereiche des Primärantikörpers gerichtet ist und somit an den vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplex binden konnte. Die Inkubation in der Zweitantikörperlösung (Zweitantikörper gelöst in 5%iger Magermilchlösung in 1xTBS/0,1%Tween) fand für 1 Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine mittels ECL (enhanced chemiluminescence)-Verfahren. Das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym „Meerrettichperoxidase“ katalysiert die Umsetzung von Luminol und dessen Derivate in seine oxidierte Form (Chemilumineszenz-Reaktion). Auf diese Weise entsteht ein lichtemittierendes Produkt. Die Nitrocellulosemembran wurde 1 Minute in 2 ml ECL-Reagenz geschwenkt, welches das Substrat Luminol enthält. Im ECL-Imager wurden die stattgefundenen Chemilumineszenz-Reaktionen als lichtemittierende Banden sichtbar und zur weiteren Auswertung digital erfasst. Mit der Software Quantity One konnten die verschiedenen Intensitäten der einzelnen Banden ausgewertet werden. Zur Normierung der Ergebnisse wurden die Intensitäten der gesuchten Proteinbanden zur Intensität der Vinkulin-Banden derselben Membran ins Verhältnis gesetzt. Vinkulin wird in den Zellen nicht mitreguliert und liegt somit bei unterschiedlichen Bedingungen dennoch in gleicher Konzentration vor.

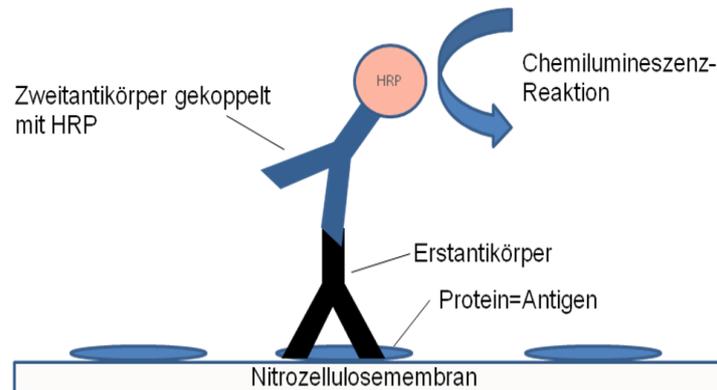


Abbildung 6:

Prinzip der Chemilumineszenzreaktion. Die Proteine stellen das Antigen dar, welche mit dem Erstantikörper eine Bindung eingehen. Ein Zweitantikörper, gekoppelt mit einem Enzym (HRP=Horseradish peroxidase) bindet an den Erstantikörper. Bei Zugabe von Luminol wird dieses durch HRP in seine oxidierte Form katalysiert und es entstehen leuchtmitternde Produkte.

3.5 Nachweis von RNA

3.5.1 Zellernte von Endothelzellen zur Isolierung von Gesamt RNA

Die Zellernte zur Isolierung von Gesamt-RNA verläuft bei Endothelzellen und Kardiomyozyten auf unterschiedliche Weise. Zunächst wurden die Mediumüberstände der Endothelzellen abgesaugt und die Zellen anschließend 2 Mal mit einfach konzentrierter, kalter PBS-Lösung gewaschen. Daraufhin wurden zu jeder Zellkulturschale 100 µl Trizol gegeben und diese leicht geschwenkt. Im Trizol enthaltenes Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig RNAsen und andere Enzyme. Nun wurden die teils gelösten, teils noch anhaftenden Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die so geernteten Zellen mussten direkt zur Isolation von Gesamt RNA weiterbehandelt werden.

3.5.2 Isolation von Gesamt-RNA

Nach der stattgefundenen Zellyse erfolgte nun die Phasentrennung. Nach Zugabe von je 200 µl Chloroform zu den in Trizol enthaltenen Endothelzellen und einer anschließenden 15minütigen Zentrifugation bei 12000 Upm und 4 °C konnten 3 Phasen erkannt werden. Eine obere wässrige Phase, in der RNA enthalten ist; eine mittlere milchige Phase mit DNA und eine untere rötliche Phase mit Proteinen. Die in der oberen Phase enthaltene RNA musste nun präzipitiert werden. Dies erfolgte indem zunächst der wässrige Überstand abgenommen und mit je 500 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert wurde (30 min.; 12000 Upm, 4°C). Der so entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde nach Zugabe von 500 µl 80%igem Ethanol erneut einem letzten Zentrifugationsschritt unterzogen (15 min.,

12000 Upm, 4°C). Das Ethanol wurde verworfen und das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet, um es anschließend in RNase-freiem Wasser auf Eis zu lösen. Die so gewonnene RNA stand nun zur weiteren Verarbeitung bereit oder konnte bei -80°C tiefgefroren werden.

3.5.3 DNase-Verdau

Die DNase Behandlung schloss sich der RNA-Isolation an, um die isolierte RNA von DNA zu reinigen. 10 µl isolierte RNA wurden mit 10 µl DNase-Mix gemischt. Dieser setzte sich zusammen aus 2,2 µl DNase-Puffer, 1 µl DNase, 1 µl RNase-Inhibitor und 5,8 µl DEPC - Wasser. Nach halbstündiger Inkubation bei 37°C wurden je Probe 80 µl TE – Puffer/1%SDS sowie 100 µl eines Phenol/Chloroforms-Gemisch zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 10 Minuten bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl eines Chloroform/Isopropanol - Gemisches (49:1) mit dem gewonnenen Überstand der Proben gemischt und erneut 10 Minuten bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µl 3M Na-Acetat und 2,5 VT Ethanol gemischt und wieder einem Zentrifugationsschritt (30 Minuten, 4°C, 12000 Upm) unterzogen. Nachdem das entstandene Pellet nach Zugabe von 200 µl Ethanol erneut zentrifugiert wurde (15 Minuten, 4°C, 12000 Upm), wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 20 µl DEPC – Wasser aufgenommen.

3.5.4 Messung der RNA-Konzentration

Nach der RNA-Isolation und DNase-Behandlung erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop ND -1000 UV/Vis-Spektralphotometer). Nach Kalibrierung des Messgeräts mit 1,5 µl Wasser, wurden 1,5 µl der zu bestimmenden Probe auf einen Sensor aufgetragen und die Konzentration im Wellenlängenbereich von 120 bis 750 nm gemessen. Es wird die RNA-Konzentration in ng/µl angegeben.

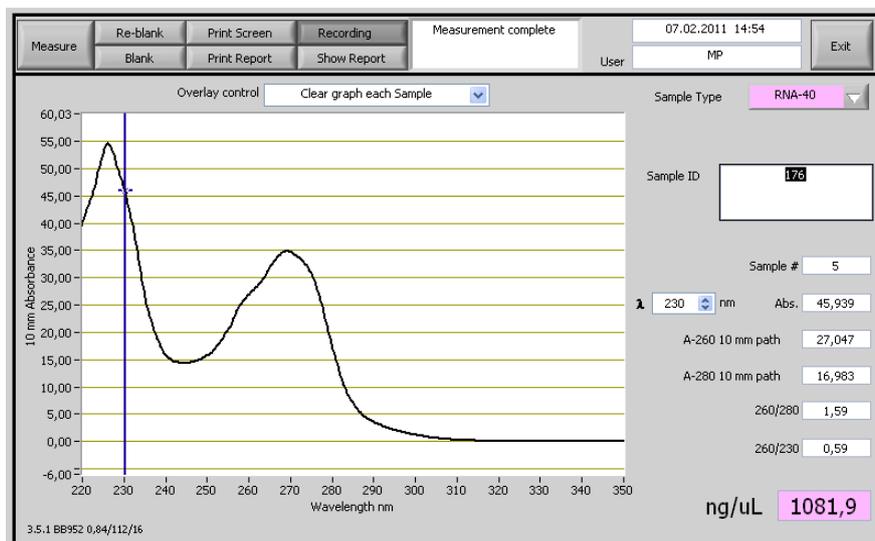


Abbildung 7: Darstellung des RNA-Gehalts am Nano-Drop Spektralphotometer.

3.5.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym aus der Gruppe der DNA-Polymerasen, welches eine komplementäre DNA (cDNA) zu einer als Matrize dienenden RNA katalysiert. Es wurden 1 µg RNA in DEPC-Wasser gelöst bis ein Gesamtvolumen von 5 µl je Versuchsansatz erreicht wurde. Diese wurden für 15 Minuten bei 60°C im Thermocycler denaturiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt. Dann wurden zu jeder Probe 5 µl Reaktionsmix gegeben.

<u>Reaktionsmix pro Probe:</u>	5xRT-Puffer	2,0 µl
	Oligo dT (5,5µM)	1,0 µl
	dNTPs (40mM)	1,0 µl
	DTT (100mM)	0,5 µl
	RNase-Inhibitor (25Units/ µl)	0,2 µl
	M-MLV-RT (200Units/µl)	0,3 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37 °C über eine Stunde im Thermocycler. Ein Erhitzen auf 95 °C für 10 Minuten denaturiert schließlich das Enzym.

3.5.6 Alternativmethode zur DNase-Behandlung und cDNA-Synthese

Bei dem unter Punkt 3.5.3 genannten Verfahren des DNase Verdaus konnte unter Umständen fälschlicherweise auch RNA zerstört werden. Daher wurde eine Alternativmethode gesucht, bei der kein RNA-Verlust stattfand. Mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen wurde genomische DNA entfernt und eine komplementäre DNA zur vorliegenden RNA hergestellt. Dieses Verfahren erspart einige Arbeitsschritte im Gegensatz zu den bisherigen Methoden. Zu 1 µg RNA wurden 2 µl DNA Wipeout Puffer (7x) gegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Bei 2minütiger Inkubation bei 42°C wurden die Proben so von genomischer DNA gereinigt. Anschließend wurden jedem Versuchsansatz 6 µl Reaktions-Mix dazugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand.

<u>Reaktionsmix pro Probe:</u>	Reverse Transkriptase	1,0 µl
	RT Puffer 5x	4,0 µl
	RT Primer Mix	1,0 µl

Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C und dauerte 15 Minuten. Dieser folgte die Denaturierung der cDNA über 3 Minuten bei 95°C.

3.5.7 Realtime RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (Realtime RT-PCR)

Die Realtime-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Sie beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, jedoch ermöglicht diese Methode ein zusätzliches Quantifizieren der gewonnenen DNA. Die

Methode der herkömmlichen PCR wurde durch Kary Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelt. Das Prinzip der PCR beruht auf einer exponentiellen Amplifikation von DNA. Der Vorgang der PCR besteht aus ca. 10-45 Zyklen, je nachdem welche DNA-Sequenz mit welchem Primer amplifiziert werden soll. Diese Zyklen bestehen aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die vorhandene DNA zur Denaturierung auf 95 °C erhitzt. Die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA lösen sich somit und es liegt einsträngige DNA vor. Im zweiten Schritt koppeln 2 zur DNA-Sequenz komplementäre Oligonukleotide (Primer) an die einzelsträngige DNA. Die Temperatur wird dabei auf die für jeden Primer spezifische Temperatur runtergekühlt, so dass die Primerhybridisierung (Annealing) stattfinden kann. Um die spezifische Temperatur eines Primers zu bestimmen, ermittelt man zuvor in einem Temperaturgradienten und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Primers die optimale Annealing-Temperatur und erstellt eine Standardkurve. Im dritten Schritt werden die beiden Einzelstränge nun durch die DNA-Polymerase zum jeweiligen Doppelstrang verlängert (Elongation), bis eine genaue Kopie der ursprünglichen DNA vorhanden ist. Die Elongation findet bei 72 °C statt. Die DNA-Synthese verläuft exponentiell, nach jedem Zyklus erhält man eine Verdopplung des ursprünglich vorhandenen Materials. Die zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA bei der Realtime-PCR beruht auf Fluoreszenz-Messungen, welche am Ende der Elongation während eines Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz-Farbstoffe lagern sich an doppelsträngige DNA an, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe zunimmt. Die Fluoreszenz nimmt somit proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und erlaubt so quantitative Aussagen über das gewonnene Material. Ein Nachteil dieser Methode ist eine geringe Spezifität, da der Farbstoff sich in jede doppelsträngige DNA einlagert. Um zwischen der gesuchten DNA und unspezifischer DNA zu differenzieren, wird die Schmelzkurvenanalyse herangezogen (Abb.8). Hierbei wird am Ende der PCR die DNA schrittweise um 1°C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Wenn die für das Fragment spezifische Schmelztemperatur erreicht ist, denaturiert der Doppelstrang und der gesamte Fluoreszenzfarbstoff wird auf einmal freigesetzt. Dies führt zu einer starken Fluoreszenzzunahme. Da die Schmelzpunkte von spezifischen und unspezifischen Produkten unterschiedlich sind, ist eine Unterscheidung zwischen diesen möglich.

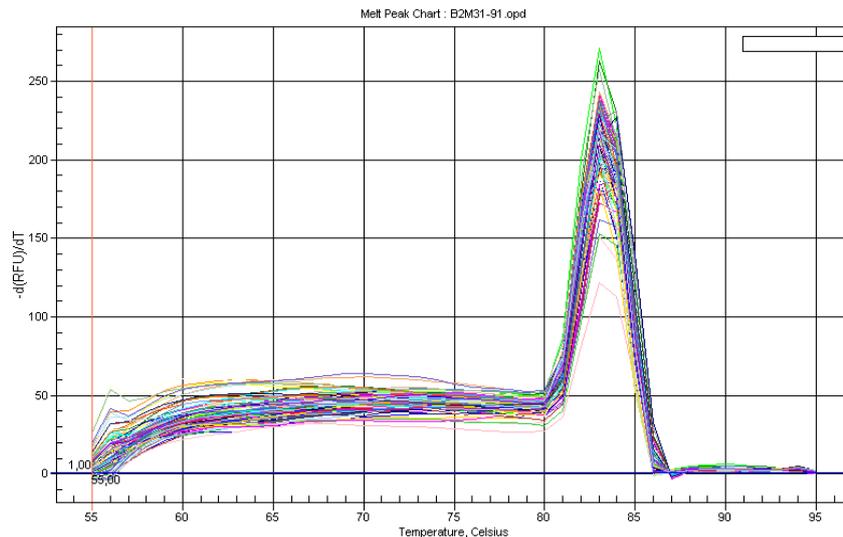


Abbildung 8

Darstellung einer Schmelzkurve von verschiedenen Proben bei Amplifikation mit gleichen Primern. Der Peak liegt bei 83 °C und signalisiert den Fluoreszenzabfall.

Die gewonnene cDNA aus Punkt 2.5.5. wurde in Verdünnungsstufen von 1 zu 10 mit Aqua bidest. verdünnt. Nun wurden je Bedingung 2 µl der verdünnten cDNA mit 18 µl eines PCR-Mix gemischt und in PCR-Stripes pipettiert.

<u>Reaktionsmix pro Probe:</u>	Primer reverse (40ng/µl)	0,6 µl
	Primer forward (40ng/µl)	0,6 µl
	H ₂ O	6,8 µl
	SYBR Green SuperMix [®]	10,0 µl

Der SYBR Green SuperMix[®] wurde verwendet, um eine Kontaminationsgefahr möglichst gering zu halten, da dieser schon alle benötigten Ingredienzien wie Reaktionspuffer, Nukleotide, DNA-Polymerase, MgCl₂, Fluoreszein und weitere Stabilisatoren beinhaltet. Die PCR-Stripes wurden nun in einen Realtime Thermocycler gegeben. Die Einstellungen der spezifischen Annealing-Temperaturen richteten sich nach dem jeweils verwendeten Primer.

<u>Annealing Temperaturen:</u>	B2M	65,0 °C
	HPRT	63,0 °C
	mikroRNA24	60,0 °C
	mikroRNA21	60,0 °C
	mikroRNA1	60,0 °C
	SMAD2	60,7 °C
	SMAD3	63,4 °C
	SMAD4	59,4 °C
	SMAD7	60,8 °C
	TGFβ	53,0 °C

Die PCR wurde mit folgendem Laufprogramm durchgeführt:

Zyklus 1 (1x)	95 °C für 3 min
Zyklus 2 (45x)	95 °C für 30 sec x °C für 30 sec 72 °C für 30 sec
Zyklus 3 (1x)	72 °C für 10 min
Zyklus 4 (50x)	50°C (+1°C) für 10 sec

3.5.8 Auswertung der PCR

Bei der Auswertung wurde die relative Expression des Zielgens ins Verhältnis zur relativen Expression eines Referenzgens gesetzt. Diese Methode wurde 2001 von Pfaffl beschrieben. Als Referenzgen (Housekeeping-Gen) diente ein Gen, welches in genügender Menge in den vorliegenden Zellen vorhanden war und durch den angewandten Versuchsansatz nicht reguliert wurde. Im vorliegenden Fall wurde B2M als Housekeeping-Gen verwendet.

Den Schwellenwert, ab dem ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann, nennt man Threshold (Abb.9). Die DNA-Konzentration steigt exponentiell an, der vom Programm ermittelte Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem die Exponentialkurve den Threshold schneidet. Da von jeder Probe eine Doppelbestimmung erfolgte, wurden zur weiteren Auswertung jeweils die Mittelwerte der 2 Ct-Werte bestimmt. Anschließend wurde der Δ Ct-Wert aus der Differenz zwischen dem Zielgen und dem Housekeeping-Gen ermittelt.

$$\Delta\text{Ct-Wert (Zielgen)} = \text{Ct-Wert (Zielgen)} - \text{Ct-Wert (Referenzgen)}$$

Der Ct-Wert verhält sich zur DNA-Menge umgekehrt proportional. Je kleiner der Ct-Wert, desto mehr DNA war vorhanden. Zur Berechnung der relativen Expression wurden die Ergebnisse in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Relative Expression (Zielgen)} = 2^{-\Delta\text{Ct (Zielgen)}}$$

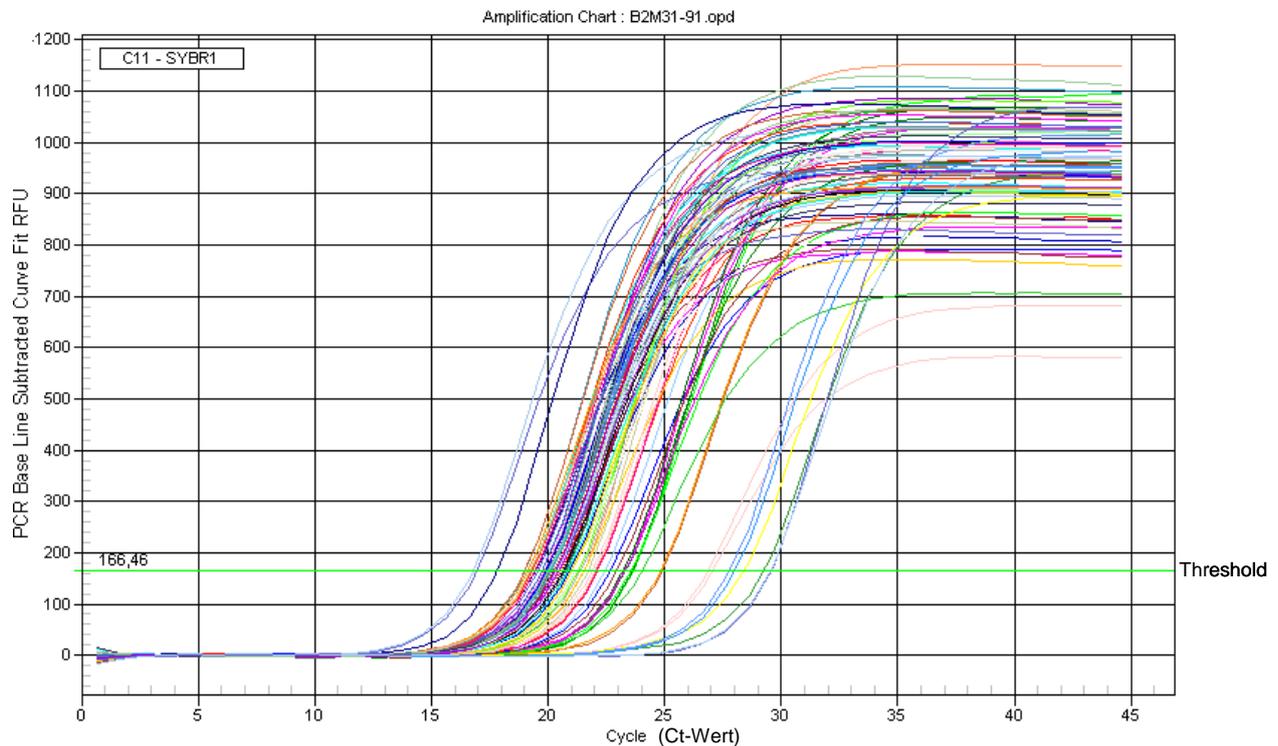


Abbildung 9:

Darstellung der Exponentialkurven verschiedener Proben bei Einsatz gleicher Primer. Sie schneiden den Threshold (grüne horizontale Linie) am jeweiligen Ct-Wert.

3.5.9 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von RNA oder DNA, sowie der Bestimmung ihrer Größe. Im vorliegenden Fall wurde diese Methode verwendet, um zu überprüfen, ob das richtige Fragment amplifiziert wurde. Hierfür wurde jede Probe mit 2 µl DNA-Ladepuffer gemischt. Um das Gel zu gießen, wurde 1xTAE-Puffer mit 2 % Agarose in der Mikrowelle mehrmals aufgeköcht bis eine klare Masse entstanden ist. Nachdem die Agarose etwas abgekühlt war, wurden 20 ml Agarose mit 1 µl SYBR-Safe[®] vermischt. Die noch flüssige Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und mit einem oder mehreren Probenaschenkämme versehen. Nach 30 Minuten war die Agarose erhärtet und fest und die Käme konnten entfernt werden. Die Kammer wurde mit 1xTAE-Puffer befüllt, bis das Gel vollständig von Puffer überdeckt war. Die Taschen konnten mit den Proben beladen werden. Zur Größenorientierung wurde eine Tasche mit DNA-Längenmarker befüllt.

<u>DNA-Längenmarker:</u>	100 Base Pair DNA Ladder	5 µl
	DNA-Ladepuffer	10 µl
	1 x TAE-Puffer	85 µl

Die Elektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 95 V statt. Nach ca. 1 bis 1,5 Stunden konnte der Lauf gestoppt und die Amplifikate unter UV-Beleuchtung betrachtet und digital erfasst werden (Abb.10).

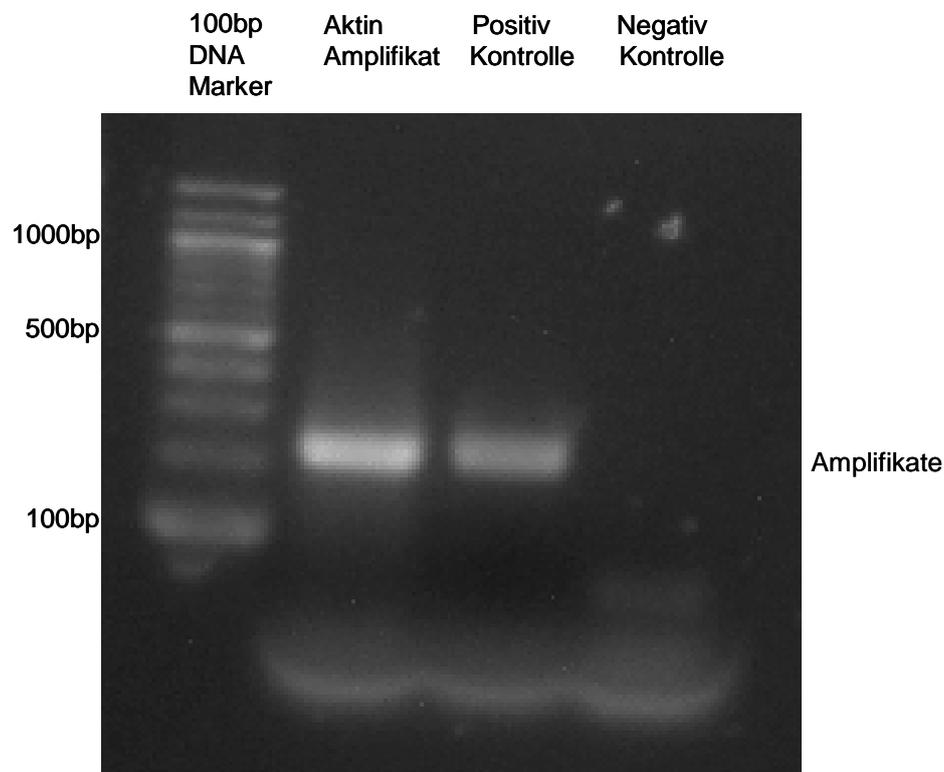


Abbildung 10:

Unter UV-Beleuchtung dargestellte Amplifikate einer DNA-Gelelektrophorese. Als Negativkontrolle diente Aqua bidest., als Positiv-Kontrolle diente eine zuvor gelaufene Probe, in der bereits das Aktin-Amplifikat gezeigt werden konnte.

3.6 Nachweis von mikroRNA

3.6.1 Polyadenylierung mittels Poly-A Schwanz

Der Nachweis der mikroRNAs erfolgte mit dem NCodeTM miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR Kit von Invitrogen.

MikroRNAs (miRNA) sind sehr kurze, nicht kodierende, einzelsträngige RNAs, welche meist eine Größe von 21-23 Nukleotiden aufweisen. Um diese kleinen RNAs in einer Realtime-PCR nachzuweisen, muss diese zunächst mit einem Poly-A Schwanz polyadenyliert werden. Die benötigte RNA wurde auf dieselbe Weise isoliert wie in Punkt 3.5.2. Es wurden zwischen 100 ng und 1 µg der isolierten RNA zusammen mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt und mit 20 µl Reaktionsmix vermischt.

<u>Reaktionsmix pro Probe:</u>	5 x Reaktionspuffer	5,0 µl
	25 mM MnCl ₂	2,5 µl
	gelöstes ATP (s.u.)	1,0 µl
	Poly A Polymerase	0,5 µl
	DEPC-Wasser	11,0 µl

Abhängig von der Menge der eingesetzten RNA, musste das benötigte ATP zunächst verdünnt werden. Hierfür mussten 10 mM ATP in 1 mM Tris (pH 8,0) nach folgender Formel verdünnt werden:

$$\text{ATP-Verdünnungsfaktor} = 5000 / x \text{ ng RNA}$$

Bei einer 15minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Adenin-Moleküle an das 3'Ende der einzelsträngigen miRNA angehängt, womit diese eine gewisse Größe erreichte, die essentiell für die weiteren Schritte war.

3.6.2 cDNA Synthese

Nun musste eine komplementäre DNA zur polyadenylierten RNA synthetisiert werden. Hierfür wurden 4 µl der polyadenylierten miRNA mit 1 µl Annealing Buffer und 3 µl universellem RT Primer (25 µM) zusammen pipettiert. Nach einer 5minütigen Inkubation bei 65°C, gefolgt von einer 1minütigen Abkühlung auf Eis, wurden je 10 µl 2x First-Strand Reaktionsmix sowie 2 µl SuperScript™ III RT/RNaseOUT™ Enzyme Mix hinzugegeben. Die so bearbeiteten Proben wurden nun für 50 Minuten bei 50°C und anschließend für 5 Minuten bei 85°C inkubiert, um die stattgefundene Reaktion zu stoppen. Die Proben konnten entweder bei -20°C eingefroren oder direkt in der qPCR weiterverwendet werden.

3.6.3 Quantitative Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) von mikroRNA

Die zur miRNA komplementäre DNA wurde in einer Realtime-PCR amplifiziert. Das Prinzip der Realtime-PCR ist unter Punkt 3.5.7 erläutert. Zunächst musste die cDNA in einer Verdünnungsstufe von 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt werden. Nun wurden zu 5 µl der verdünnten cDNA 45 µl eines Reaktionsmix gegeben.

<u>Reaktionsmix pro Probe:</u>	iQ-SYBRgreen-Supermix®	25 µl
	Forward Primer, 10 µM	1 µl
	Universal qPCR Primer, 10 µM	1 µl
	DEPC Wasser	18 µl

Der im Kit enthaltene Universal qPCR Primer wurde als reverser Primer in der PCR eingesetzt. Als forward Primer diente ein spezifischer Primer, der nach der zu amplifizierenden miRNA gerichtet war. Die Proben wurden in PCR-Stripes pipettiert und in einem Realtime-Thermocycler amplifiziert. Die PCR verlief nach folgendem Laufprogramm:

Zyklus 1 (1x)	50 °C für 2 min
Zyklus 2 (1x)	95 °C für 2 min

Zyklus 3 (40x)	95 °C für 15 sec
	60 °C für 30 sec

Die Auswertung verlief auf die gleiche Weise wie in Punkt 2.5.8 beschrieben.

3.7 Nachweis von Apoptose

3.7.1 Apoptose Nachweis mittels HOE-Assay

Der HOE-Assay ist ein quantitatives Bestimmungsverfahren zur Differenzierung von normalen, apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten. Diese wurden mit jeweils 5 µl Fluoreszenzfarbstoffen, Hoechst 33258 sowie Propidiumiodid für 5 Minuten inkubiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Hoe 33258 ist ein zellmembrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der das Chromatin von Zellen anfärbt. Die für die Apoptose typische Chromatinkondensation in den Zellkernen stellt sich somit durch eine Abkugelung der Kerne sowie durch eine intensive blaue Fluoreszenz dar. Intakte Zellen weisen längliche, schwach blau gefärbte Zellkerne auf. Erscheinen die Zellkerne rot fluoreszierend, handelt es sich um nekrotische Zellen. Propidiumiodid ist nicht zellmembrangängig und kann somit nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen.

Hoechst 33258 wird bei Wellenlängen von 340-360 nm, Propidiumiodid bei Wellenlängen von 510-550 nm angeregt. Die Zellen wurden nach Inkubation mit den beiden Farbstoffen bei 200facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Hierbei wurden 200 Kardiomyozyten aus zufällig gewählten Gesichtsfeldern gezählt und anschließend bei entsprechender Wellenlänge der Anteil apoptotischer sowie nekrotischer Zellen bestimmt.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SD) aus n verschiedenen Zellpräparationen ermittelt. Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgenden Tukey-Test oder einem zweiseitigen Student-T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Datenanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS erstellt.

4 Ergebnisse

In allen Analysen auf mRNA Ebene wurden zusätzlich zu den spezifisch eingesetzten Primern B2M als Housekeeping Gen eingesetzt. Zur Bestimmung der relativen Menge an mRNA des Zielgens wurde der ΔCt -Wert aus der Differenz zwischen dem Zielgen und dem Housekeeping-Gen ermittelt.

Bei den Analysen der Zielgene auf Proteinebene diente die Detektion von Vinkulin als Housekeeping Gen. Zur Normierung der Ergebnisse wurden die Intensitäten der gesuchten Proteinbanden zur Intensität der Vinkulin-Banden derselben Membran ins Verhältnis gesetzt.

4.1 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Expression von TGF β in mikrovaskulären Endothelzellen

4.1.1 Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA-Expression von TGF β_1 in Endothelzellen

Wie oben beschrieben ist TGF β_1 am kardialen Remodelling beteiligt und sollte daher genauer untersucht werden. Um eine Aktivierung von TGF β_1 durch Hypoxie und Reoxygenierung in mikrovaskulären Endothelzellen zu überprüfen, wurden diese nach zweistündiger Hypoxie und einer anschließenden Reoxygenierung von 4 bzw. 13 Stunden geerntet und die Expression von TGF β_1 auf mRNA Ebene mittels Realtime PCR im Vergleich zu normoxen Kontrollen analysiert. Es zeigte sich eine Erhöhung von TGF β_1 nach 4 Stunden auf $125,0 \pm 5\%$ ($n=9$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.11).

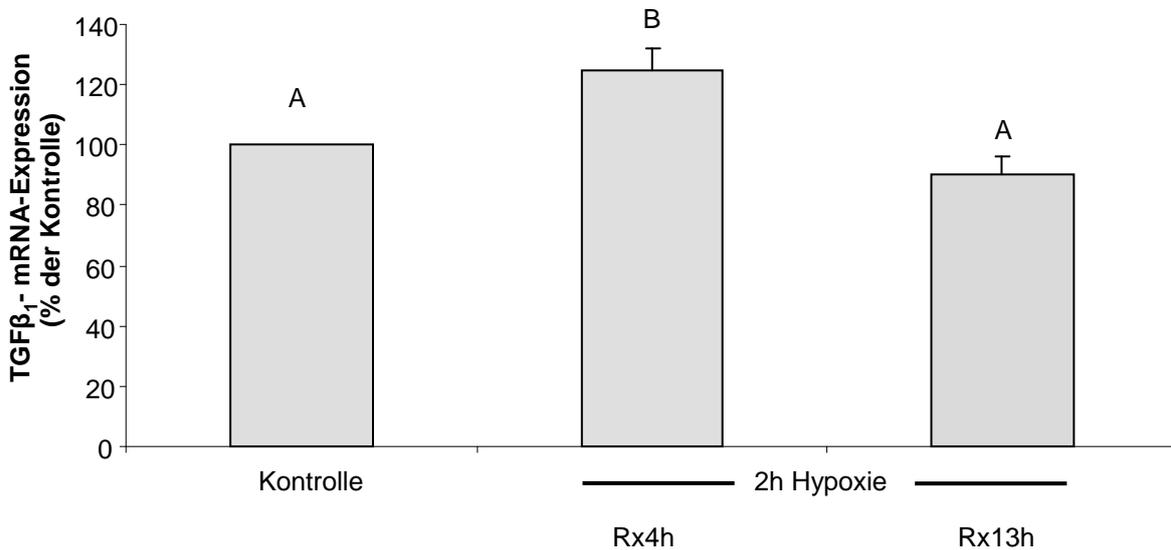


Abbildung 11:

Die Endothelzellen wurden einer 2stündigen Hypoxie unterzogen und nach 4 und 13 Stunden der Reoxygenierung mittels Realtime-PCR im Vergleich zu normoxen Kontrollen analysiert. Nach 4 Stunden wurde TGFβ₁ auf 125,0 ± 5 % (n=9, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle) hochreguliert.

4.1.2 Hypoxie/Reoxygenierung erniedrigt zu einem frühen Zeitpunkt der Reoxygenierung die mRNA-Expression von TGFβ₂

Akman et al. (2001) zeigten in humanen Nabelvenenendothelzellen (HUVECs) unter hypoxen Bedingungen eine vermehrte TGFβ₂ mRNA - sowie Proteinexpression. Daher sollte auch hier der Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die TGFβ₂ mRNA-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte untersucht werden. Es wurde eine 2stündige Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung wie unter Punkt 4.1.1. beschrieben, durchgeführt und die mRNA-Expression von TGFβ₂ mittels Realtime-PCR im Vergleich zu normoxen Kontrollen untersucht. Hier ergab sich keine signifikante Erhöhung. Nach 4 Stunden der Reoxygenierung zeigte sich zunächst eine Herabregulation der mRNA Expression auf 68,8 ± 9% (n=8, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle), der nach 13 Stunden Reoxygenierung wieder Kontrollniveau erreichte (115,1 ± 7%, n=17) (Abb.12).

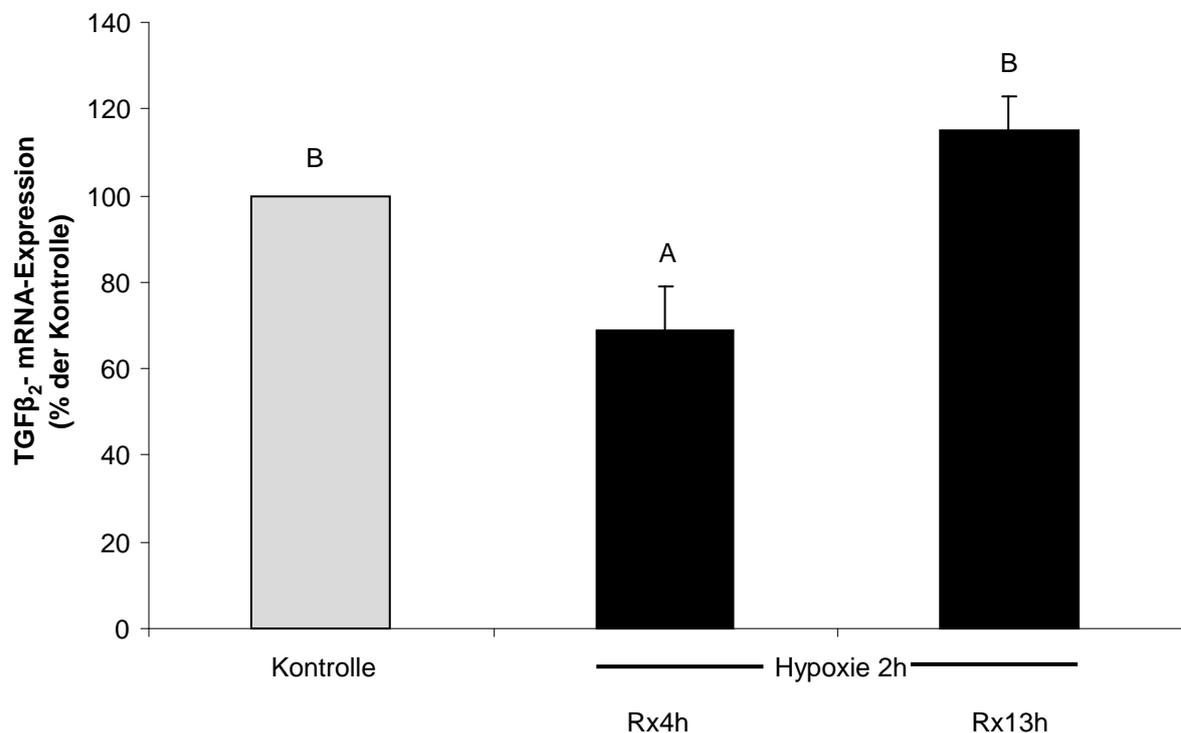


Abbildung 12:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden einer Hypoxie unterzogen und anschließend 4 bzw. 13 Stunden reoxygeniert. Die mRNA-Expression von TGFβ₂ wurde in einer Realtime PCR gemessen. Es ergab sich eine Herabregulation auf 68,8 ± 9% (n=8, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle). Tendenziell steigt die mRNA-Expression nach 13 Stunden Reoxygenierung auf 115,1 ± 7% (n=17, nicht signifikant vs. normoxer Kontrolle).

4.1.3 Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von TGFβ₃.

Schließlich wurde auch die mRNA Expression der Isoform TGFβ₃ in einer Realtime-PCR untersucht. Hier ergab sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zur normoxen Kontrolle (Abb.13).

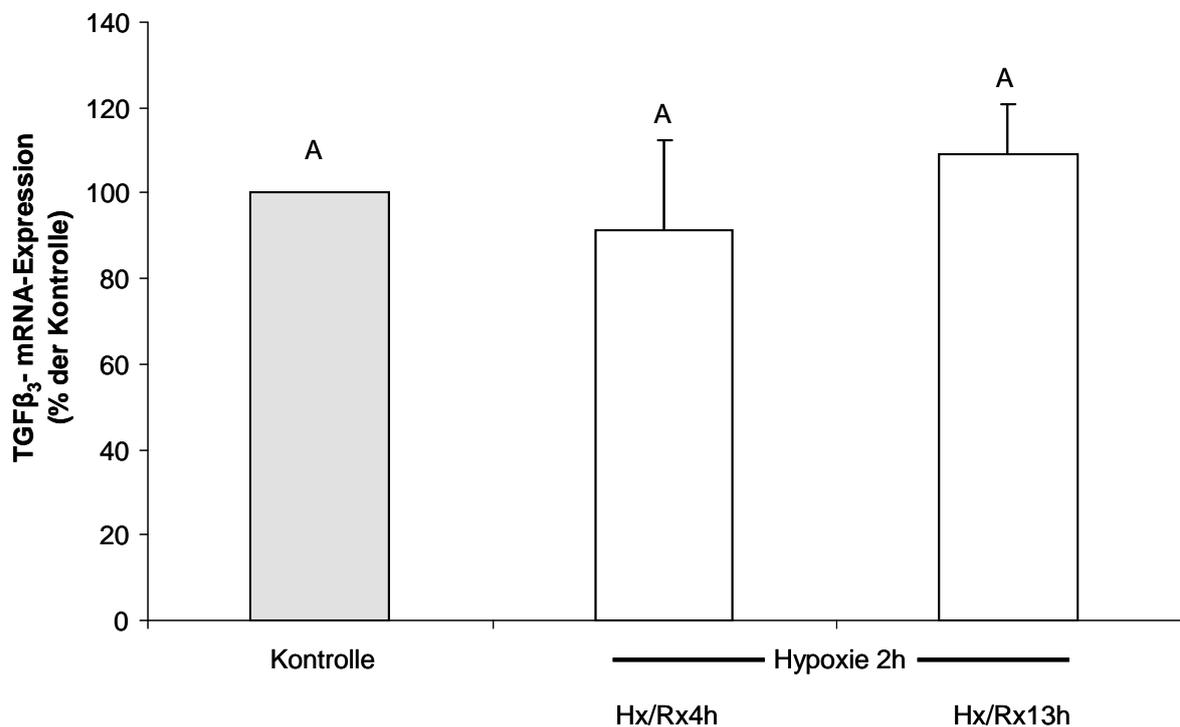


Abbildung 13:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden einer Hypoxie unterzogen und anschließend 4 bzw. 13 Stunden reoxygeniert. Die mRNA-Expression von TGFβ₃ wurde in einer Realtime-PCR gemessen. Es ergab sich kein signifikanter Effekt (nach 4 Stunden Reoxygenierung 91,4 ± 20%, n=9; nach 13 Stunden Reoxygenierung 109,2 ± 11%; n=23).

4.1.4 Hypoxie und Reoxygenierung steigert die Proteinexpression des TGFβ-Vorläuferproteins in mikrovaskulären Endothelzellen

Eine Erhöhung von TGFβ₁ auf mRNA-Ebene unter hypoxen und reoxygenierten Bedingungen konnte gezeigt werden. Nun sollte überprüft werden, ob dies auch zu einer gesteigerten Proteinexpression führt. Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden einer Hypoxie unterzogen und anschließend im Brutschrank reoxygeniert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reoxygenierung wurde das Vorläuferprotein aller Isoformen mittels Western Blot detektiert. In den hypoxisch begasten Endothelzellen ergab sich nach 15 Minuten Reoxygenierung mit 122,2 ± 8% eine erhöhte Proteinexpression des Vorläufer-Proteins im Vergleich zu den normoxen Endothelzellen (n=4, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle), sowie nach 24h mit 124,8 ± 4% (n=12, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle) (Abb.14).

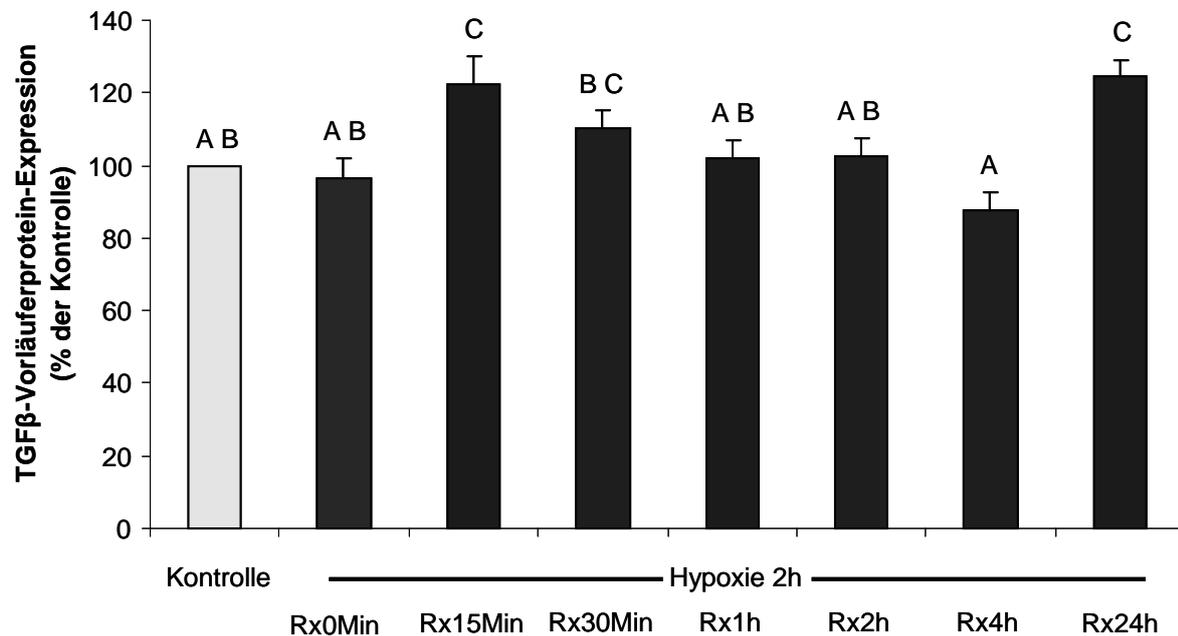


Abbildung 14:

Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden 2 Stunden mit Stickstoff, die Kontrollzellen 2 Stunden mit Luft begast. Anschließend wurden die Zellen im CO₂-Brutschrank mit Nährmedium reoxygeniert und zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels Western Blot analysiert. Eine signifikante Erhöhung ergab sich nach 15 Minuten Reoxygenierung auf $122,2 \pm 8\%$ ($n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) und nach 24h Reoxygenierung auf $124,8 \pm 4\%$ ($n=12$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle).

4.2 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle in mikrovaskulären Endothelzellen

4.2.1 Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD2 in Endothelzellen

Es wurde gezeigt, dass TGF β_1 unter hypoxen Bedingungen auf mRNA-Ebene sowie das TGF β -Vorläuferprotein hochreguliert werden. Um zu überprüfen, ob auch bioaktive Isoformen von TGF β durch Hypoxie und Reoxygenierung freigesetzt werden, wurden die klassischen Signalmoleküle, die SMAD-Proteine analysiert. Es ist bekannt, dass aktives TGF β die Signalmoleküle SMAD2 und SMAD3 über eine Phosphorylierung aktiviert. Nach zweistündiger Hypoxie/Normoxie und anschließender Reoxygenierung wurde zunächst die mRNA-Expression von SMAD2 in Endothelzellen mittels Realtime-PCR gemessen. Eine Hochregulierung von SMAD2 konnte nach 13 Stunden Reoxygenierung beobachtet werden ($135,2 \pm 15\%$, $n=21$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.15). Vermittelt durch Hypoxie/Reoxygenierung findet also eine vermehrte Expression von SMAD2 auf mRNA-Ebene statt.

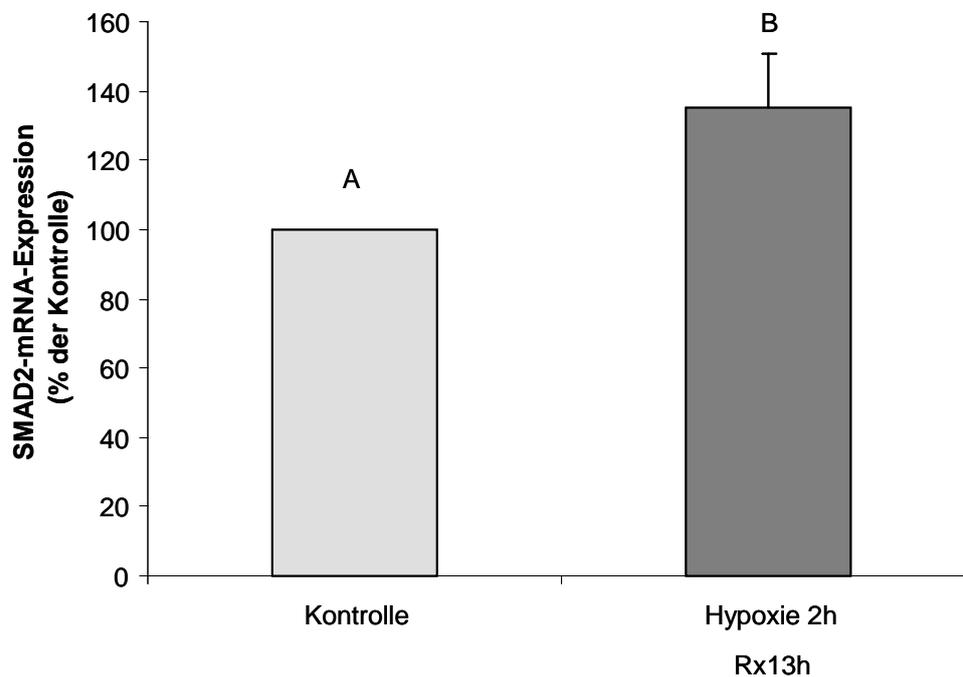


Abbildung 15:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Nach 4 Stunden und 13 Stunden der Reoxygenierung wurde die mRNA-Expression von SMAD2 mittels Realtime-PCR gemessen. Es ergab sich eine im t-Test und im Mann-Whitney-U Test signifikante Hochregulierung von SMAD2 nach 13 h Reoxygenierung auf $135,2 \pm 15\%$ ($n=21$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle).

4.2.2 Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD3 in Endothelzellen

Neben SMAD2 gibt es weitere typische Rezeptorabhängige Signalmoleküle von TGF β . Im folgenden Versuchsaufbau wurde das Signalmolekül SMAD3 genauer untersucht. Wie bei SMAD2 wird SMAD3 nach Bindung von TGF β an dessen Rezeptoren durch eine Phosphorylierung aktiviert. Zunächst sollte geklärt werden, ob SMAD3 nach Hypoxie/Reoxygenierung auf RNA-Ebene vermehrt exprimiert wird. Hierfür wurden mikrovaskuläre Endothelzellen 2 Stunden hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Nach 13 Stunden der Reoxygenierung wurde mittels Realtime PCR die mRNA-Expression von SMAD3 untersucht. Es konnte eine Hochregulierung auf $405,2 \pm 87\%$ beobachtet werden ($n=22$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.16).

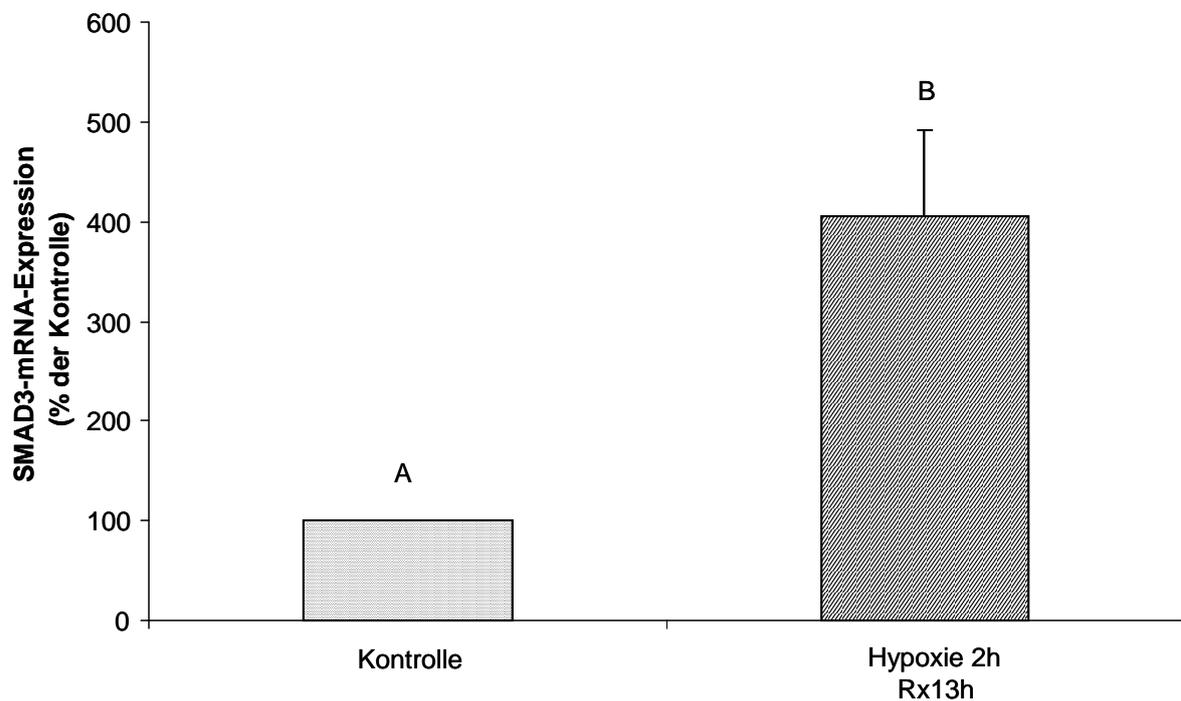


Abbildung 16:

Nach zweistündiger Hypoxie/Normoxie wurden die Endothelzellen im Brutschrank reoxygeniert. Nach 13 Stunden der Reoxygenierung wurde mittels Realtime PCR die Expression von SMAD3 untersucht. Es ergab sich eine Erhöhung auf $405,2 \pm 87\%$ ($n=22$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle mittels t-Test und Mann-Whitney-U Test).

4.2.3 Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die SMAD4-mRNA-Expression in Endothelzellen

Der nächste Schritt in der TGF β -Signalkaskade ist die Verbindung der beiden Rezeptorabhängigen SMAD-Proteine SMAD2 und SMAD3 (R-SMADs) mit einem weiteren Signalmolekül, SMAD4 (Co-SMAD) zu einem Komplex. Im folgenden Versuchsaufbau wurde die Expression von SMAD4 auf RNA-Ebene mittels Realtime-PCR überprüft. Der Versuchsaufbau gleicht den Vorherigen. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zur normoxen Kontrolle ($117,3 \pm 9\%$, $n=18$) (Abb.17).

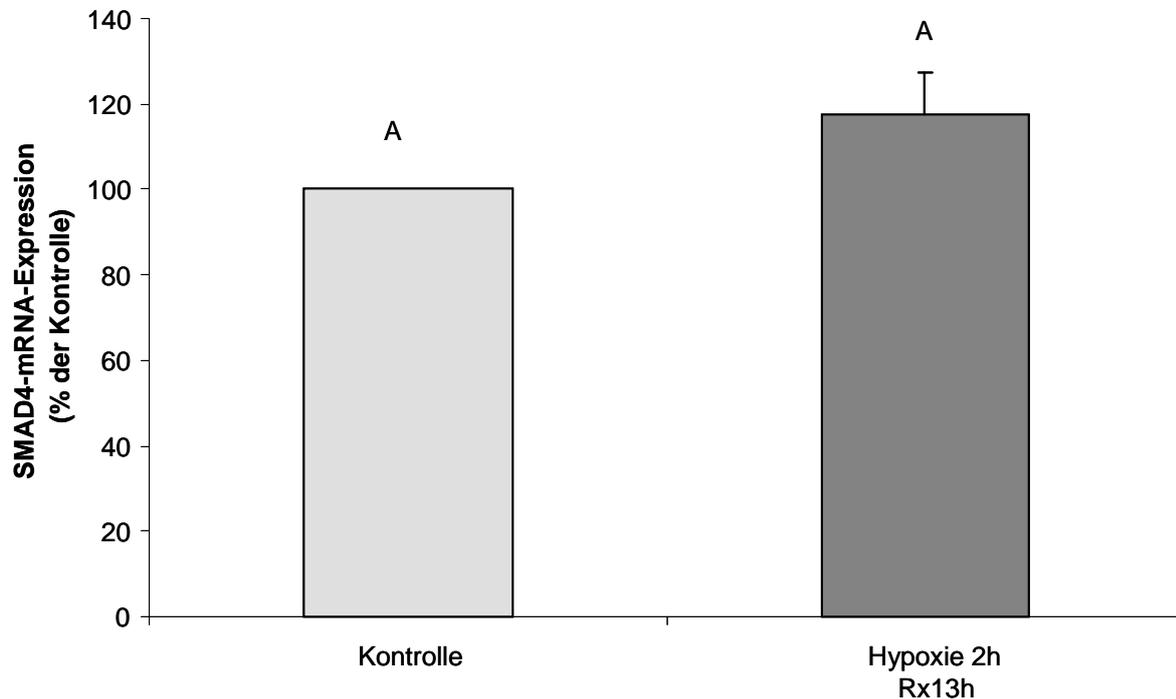


Abbildung 17:

Nach 2stündiger Hypoxie/Normoxie und anschließender Reoxygenierung wurden die Endothelzellen im Brutschrank reoxygeniert. Nach 13 Stunden der Reoxygenierung wurde mittels Realtime-PCR die Expression von SMAD4 untersucht. Es zeigte sich kein Effekt im Vergleich zur normoxen Kontrolle ($117,3 \pm 9\%$, $n=18$).

4.2.4 Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die SMAD7-mRNA-Expression in Endothelzellen

Eine Erhöhung der SMAD2/3 mRNA unter Hypoxie und Reoxygenierung konnte nachgewiesen werden. Um die Signalkaskade weiter aufzuschlüsseln, stellte sich die Frage, ob das inhibitorische Signalmolekül SMAD7 (I-SMAD) als Responsegen von TGF β ebenfalls erhöht exprimiert wird. Wie unter 4.2.1. beschrieben, wurden die Zellen einer Hypoxie und Reoxygenierung unterzogen. Mittels Realtime PCR wurde die mRNA-Expression von SMAD7 überprüft. Nach 13 Stunden Reoxygenierung zeigte sich eine gesteigerte mRNA Expression von SMAD7 auf $132,5 \pm 8\%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.18).

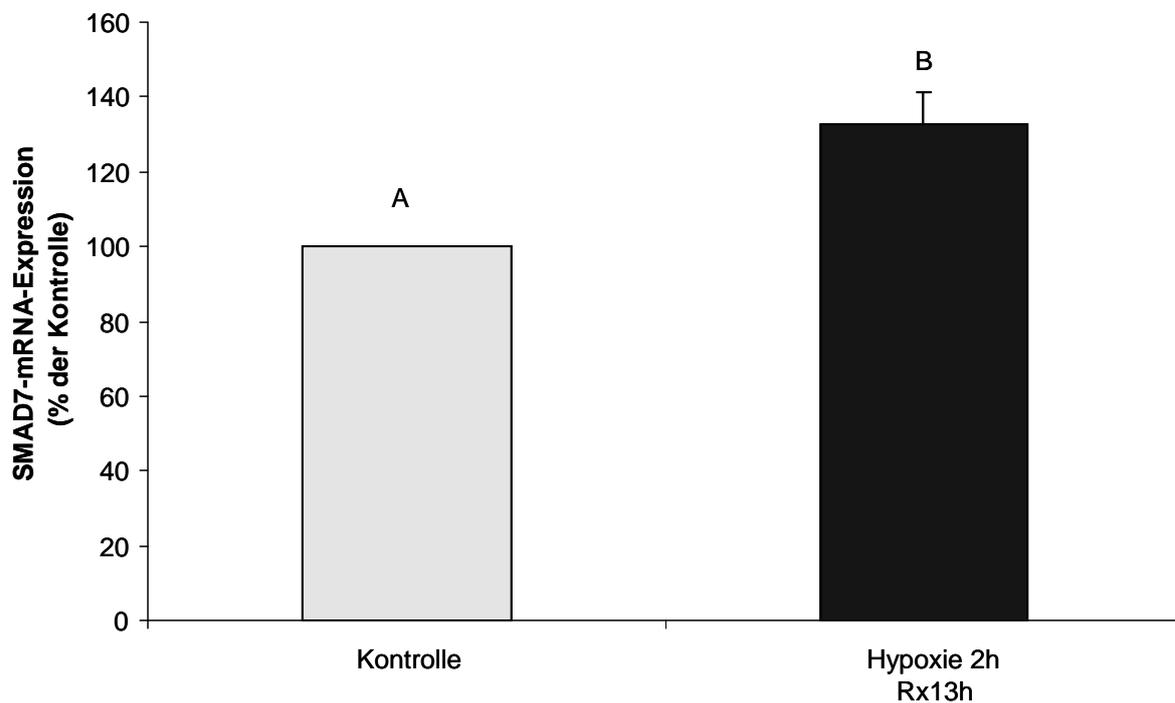


Abbildung 18:

Nach 2stündiger Hypoxie/Normoxie wurden die Endothelzellen im Brutschrank reoxygeniert. Nach 13 Stunden der Reoxygenierung wurde mittels Realtime PCR die Expression von SMAD7 untersucht. Es ergab sich eine Erhöhung nach 13 Stunden Reoxygenierung auf $132,5 \pm 8\%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle mittels t-Test und Mann-Whitney-U Test).

4.2.5 Es findet eine Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt

In Punkt 4.2.1 konnte eine vermehrte mRNA-Expression von SMAD2 gezeigt werden. Da $TGF\beta$ die Signalmoleküle SMAD2 und SMAD3 über eine Phosphorylierung aktiviert, sollte der Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf eine eventuelle Phosphorylierung auf Proteinebene untersucht werden. Nach 2stündiger Hypoxie/Normoxie und anschließender Reoxygenierung wurde die Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen mittels Western Blot detektiert. Es ergab sich eine Hochregulation nach 2 Stunden Reoxygenierung auf $135,1 \pm 9\%$ ($n=20$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.19).

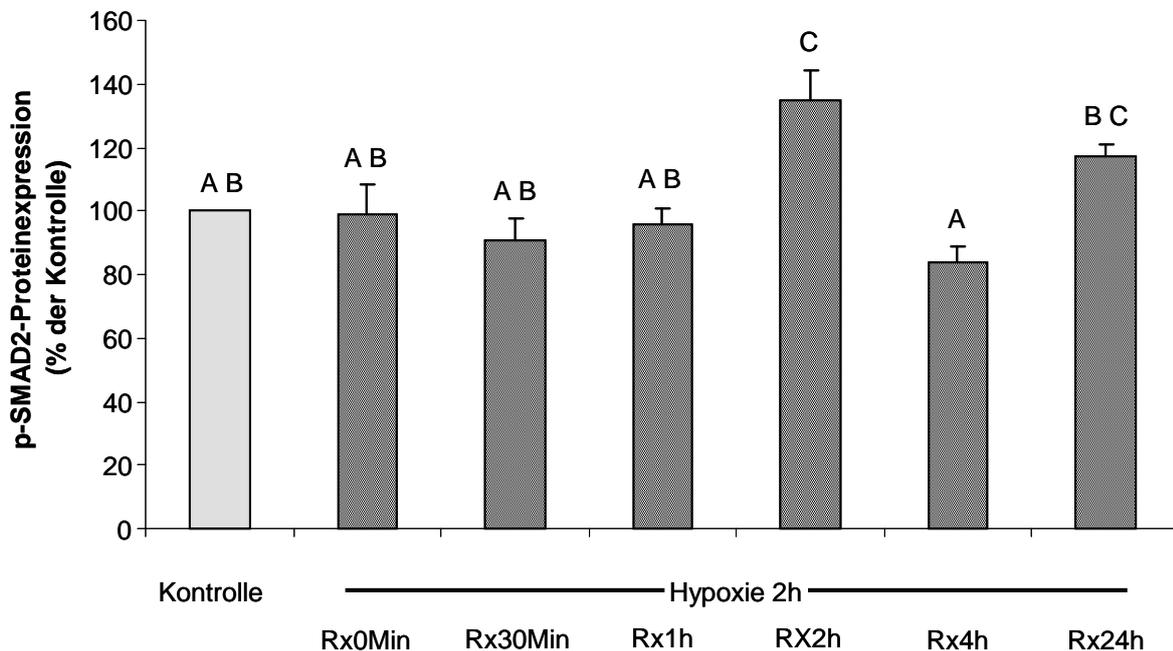


Abbildung 19:

Nach zweistündiger Hypoxie/Normoxie und anschließender Reoxygenierung wurde die Phosphorylierung des Signalmoleküls SMAD2 mittels Western Blot detektiert. Es konnte eine hochregulierte Phosphorylierung von SMAD2 nach 2 Stunden Reoxygenierung beobachtet werden ($135,1 \pm 9\%$, $n=20$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

4.2.6 TGF β -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen wieder auf

Um zu prüfen, ob die Phosphorylierung von SMAD2 ein durch TGF β vermittelter Effekt ist, wurde erneut eine Hypoxie/Reoxygenierung durchgeführt. 30 Minuten vor dem Start der Hypoxie, wurden die Endothelzellen mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor SB 431542 ($1\mu\text{M}$) inkubiert. Dieser bindet an den TGF β -Rezeptor I und blockiert somit den TGF β -Signalweg. Die Detektion der Phosphorylierung von SMAD2 wurde mittels Western Blot durchgeführt. Untersucht wurden die Zeitpunkte der Reoxygenierung, zu denen im vorangegangenen Versuch eine Induktion von p-SMAD2 unter Hypoxie beobachtet werden konnte (2h und 24h). Nach Hypoxie und 2stündiger Reoxygenierung ergab sich eine Hochregulierung von p-SMAD2 auf $175,9 \pm 39\%$ ($n=3$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle). Bei den mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor inkubierten Endothelzellen ergab sich ein Abfallen der Phosphorylierung auf $45,0 \pm 18\%$ ($n=3$). Nach 24 Stunden Reoxygenierung ergab sich eine Hochregulierung auf $170,5 \pm 17\%$ ($n=3$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle); auch dieser Effekt wurde durch Hemmung des TGF β -Rezeptors annähernd auf Kontrollniveau herabreguliert ($87,0 \pm 11\%$, $n=3$). Es handelt sich bei der Phosphorylierung von SMAD2 also um einen autokrinen, durch TGF β vermittelten Effekt (Abb.20).

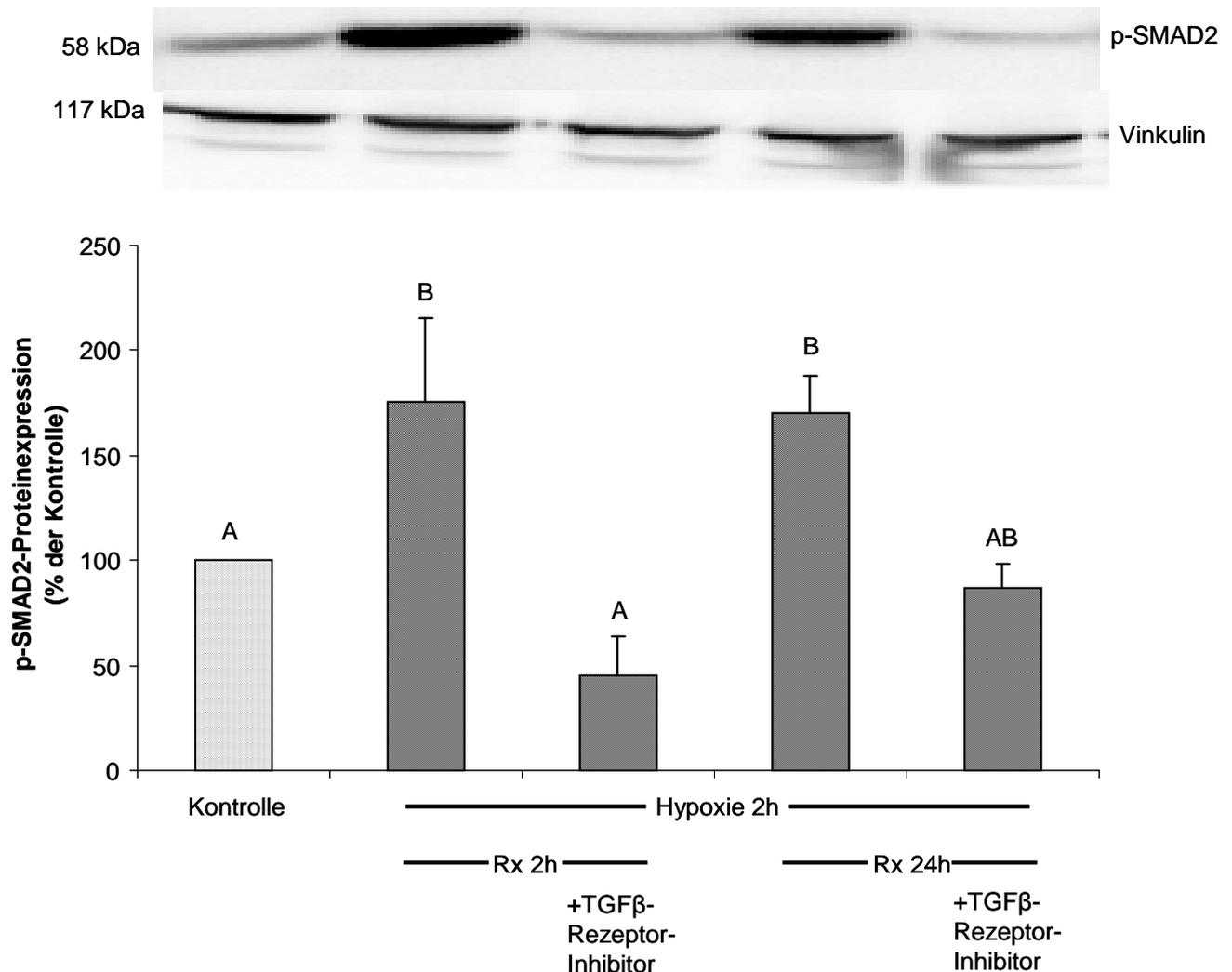


Abbildung 20:

30 Minuten vor Hypoxie wurde ein Teil der Endothelzellen mit dem TGFβ-Rezeptor-Blocker SB 431542 vorinkubiert. Nach 2stündiger Hypoxie und anschließender Reoxygenierung (2 Stunden und 24 Stunden) wurde die Phosphorylierung von SMAD2 mittels Western Blot detektiert. Eine Induktion von p-SMAD2 konnte nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung nach 2 Stunden ($175,9 \pm 39\%$, $n=3$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) und nach 24 Stunden ($170,5 \pm 17\%$, $n=3$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) beobachtet werden. Beide Effekte konnten durch den TGFβ-Rezeptor-Inhibitor SB 431542 ($1\mu\text{M}$) aufgehoben werden (nach 2 Stunden Rx auf $45,0 \pm 18\%$, nach 24 Stunden Rx auf $87,0 \pm 11\%$).

Oben: repräsentativer Blot

Unten: quantitative Auswertung

4.2.7 Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt

Bei SMAD3 handelt es sich genau wie bei SMAD2 um ein Rezeptorabhängiges Signalmolekül (R-SMAD). Eine durch TGFβ vermittelte Aktivierung von SMAD2 konnte bereits nachgewiesen werden. Nun galt es, das Signalmolekül SMAD3 genauer zu untersuchen. Nach erneuter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung wurde die Phosphorylierung von SMAD3 mittels Western Blot detektiert. Hier ergaben sich keine signifikanten Effekte (Abb.21).

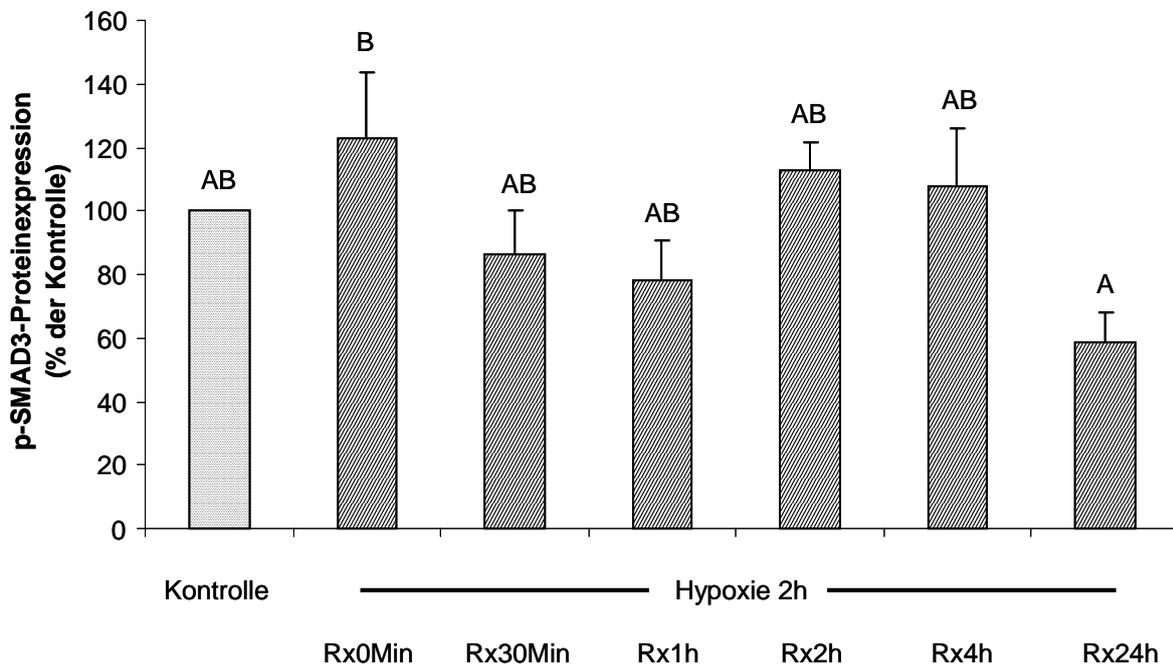


Abbildung 21:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2h hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Reoxygenierung wurde die Phosphorylierung von SMAD3 mittels Western Blot analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Effekte (n=7).

4.3 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf GATA-Transkriptionsfaktoren in mikrovaskulären Endothelzellen

GATA-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der Genexpression, welche in verschiedensten Endothelzellen stark angereichert vorkommen. Es existieren 6 verschiedene GATA-Faktoren (1-6); in mikrovaskulären Endothelzellen konnte die Expression von GATA 2,4, und 6 gezeigt werden (Froese et al., 2010). Vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe (Schröder et al., 2006) zeigten bereits ein Zusammenspiel zwischen GATA-Transkriptionsfaktoren und der TGF β ₁-Expression in Kardiomyozyten.

4.3.1 Hypoxie/Reoxygenierung steigert die GATA2-Proteinexpression in Endothelzellen

Uns interessierte zunächst, ob vermittelt durch Hypoxie und Reoxygenierung eine Induktion von GATA2 in mikrovaskulären Endothelzellen stattfindet. Nach 2stündiger Hypoxie und anschließender Reoxygenierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Reoxygenierung die Proteinexpression von GATA2 mittels Western Blot gemessen. Die GATA2-Expression zeigte einen kontinuierlichen Anstieg bis zu einem Maximum nach 4 Stunden der Reoxygenierung auf $158,7 \pm 20\%$ (n=10, p<0.05 vs. normoxer Kontrolle). Zu späteren Zeitpunkten der Reoxygenierung fiel die Expression wieder ab (Abb.22).

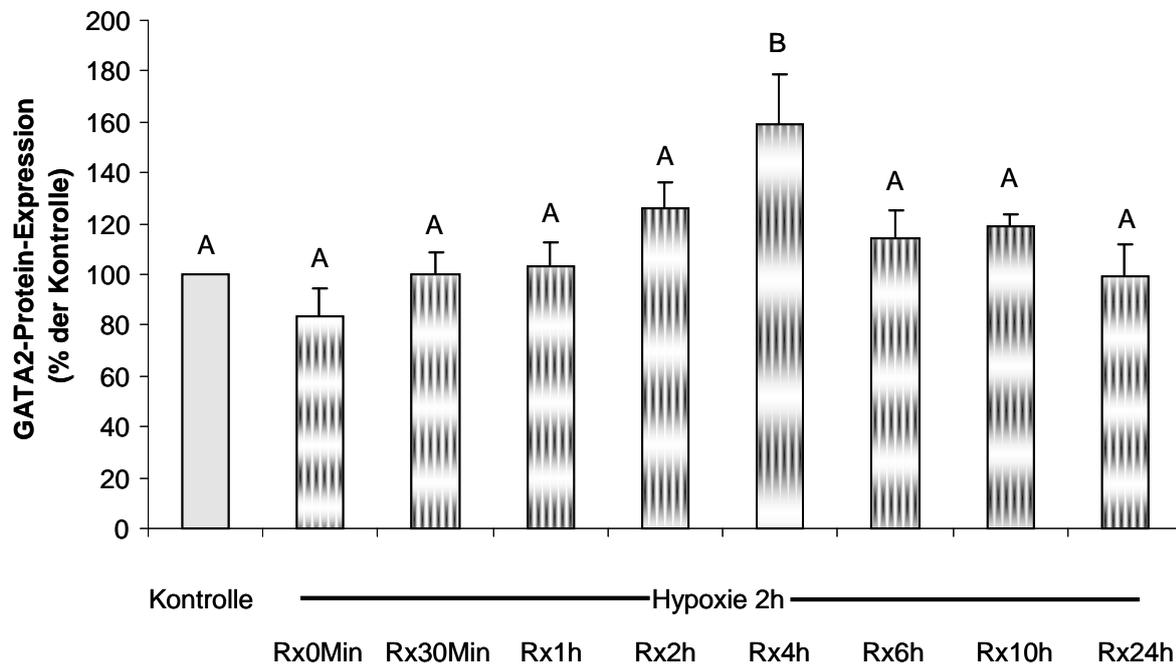


Abbildung 22:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden hypoxisch begast. Anschließend wurden sie reoxygeniert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Reoxygenierung geerntet und mittels Western Blot die Proteinexpression von GATA2 gemessen. Nach 4 Stunden ergab sich eine maximale Induktion von GATA2 auf $158,7 \pm 20\%$ ($n=10$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle).

4.3.2 Es findet keine Expression von GATA4 und 6 in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte statt

Nach gleicher Versuchsdurchführung wie in Punkt 4.3.1 wurde die Proteinexpression von GATA4 und GATA6 mittels Western Blot überprüft; jedoch konnte keine Expression von GATA 4 und 6 in mikrovaskulären Endothelzellen detektiert werden, weder in normoxen noch hypoxen/reoxygenierten Endothelzellen.

4.4 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf mikroRNAs in Endothelzellen

MikroRNAs sind kurze, nicht kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation spielen. Durch Anheftung von mikroRNAs an mRNA Moleküle wird die Translation von Genen reguliert. Da ein Zusammenhang von mikroRNAs mit angiogenetischen und fibrotischen Prozessen im Herzen, sowie eine Interaktion zwischen mikroRNAs und SMAD Molekülen diskutiert wird, sollte eine eventuelle Induktion von mikroRNAs näher untersucht werden.

4.4.1 MikroRNA1 wird nicht in mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert

Yin et al. (2008) zeigten unter anderem eine Beteiligung von mikroRNA1 an kardialen Umbauprozessen. Daher galt es, diese mikroRNA genauer zu untersuchen. Eine Überprüfung der mikroRNA1 Expression mittels Realtime-PCR in mikrovaskulären Endothelzellen zeigte weder nach 2stündiger Hypoxie/Reoxygenierung noch in normoxen Endothelzellen eine Expression. MikroRNA1 wird demnach nicht von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert und scheint nicht an der TGF β Signalkaskade beteiligt zu sein.

4.4.2 Hypoxie und Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA21

Yin et al. (2008) zeigten weiterhin, dass mikroRNA21 im Herzen exprimiert wird und an myokardialen Umbauprozessen beteiligt ist. Desweiteren zeigten Davis et al. (2008) eine SMAD abhängige Induktion von mikroRNA21. Daher sollte nun überprüft werden, ob mikroRNA21 von mikrovaskulären Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen induziert wird.

Dafür wurden erneut mikrovaskuläre Endothelzellen einer Hypoxie und einer anschließenden Reoxygenierung unterzogen. Nach 24 Stunden der Reoxygenierung wurde die Expression von mikroRNA21 in einer Realtime-PCR gemessen. Um gleichzeitig eine eventuelle Beteiligung an der TGF β -Signalkaskade zu überprüfen, wurde für jede Bedingung jeweils eine Zellkulturschale vor Beginn der Reoxygenierung mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor SB 431542 (1 μ M) inkubiert. Nach 24 Stunden der Reoxygenierung ergab sich ein Anstieg der mikroRNA21 Expression auf $499,2 \pm 129\%$ (n=11, p<0,05 vs. normoxer Kontrolle). Dieser Effekt wurde durch den TGF β -Rezeptor-Inhibitor auf $76,5 \pm 21\%$ (n=8) gesenkt. MikroRNA21 wird also durch Hypoxie/Reoxygenierung TGF β -vermittelt induziert (Abb.23).

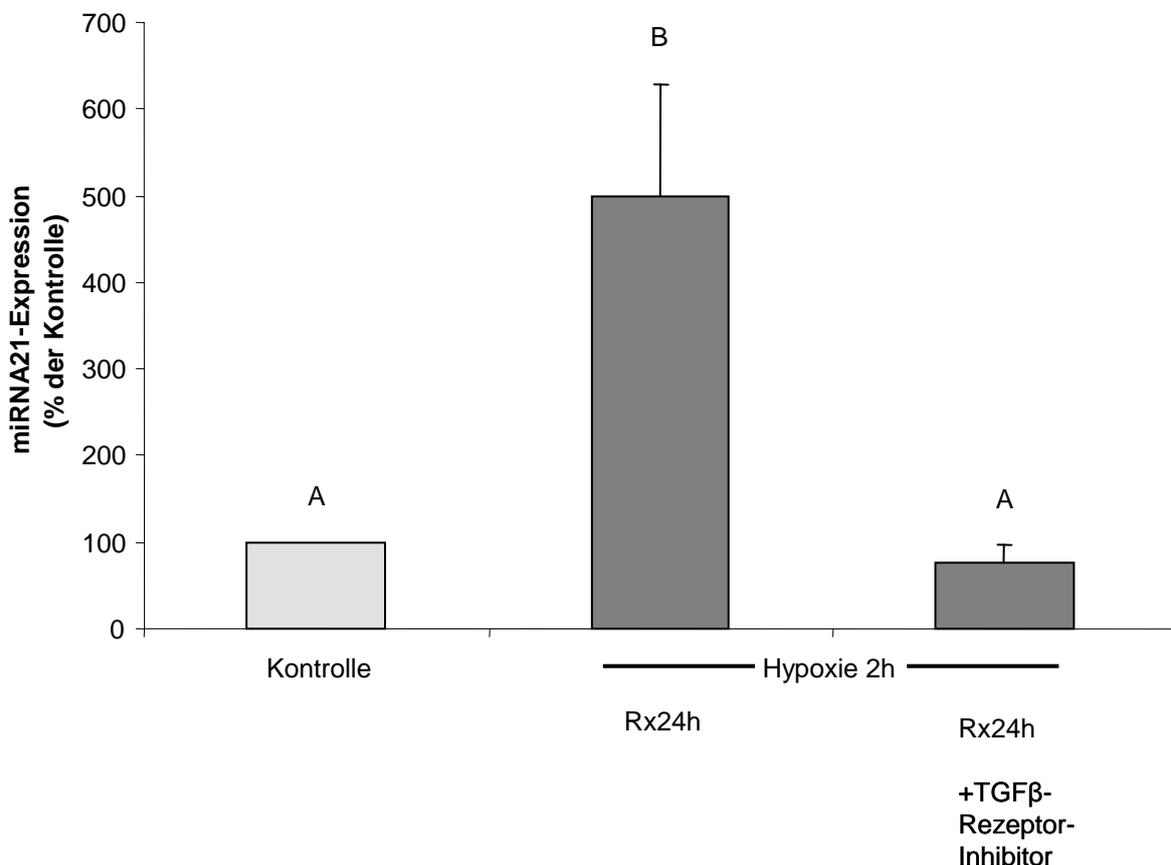


Abbildung 23:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden hypoxisch begast. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit dem TGFβ-Rezeptor-Inhibitor SB 431542 (1μM) inkubiert. Alle Zellen wurden dann für 24 Stunden reoxygeniert. Die Synthese der mikroRNA wurde mit einem speziellen mikroRNA Kit in einer Realtime-PCR gemessen. Es ergab sich eine Induktion bei den hypoxen Endothelzellen auf $499,2 \pm 129\%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) und eine Aufhebung des Effektes durch Einsetzen des Inhibitors auf $76,5 \pm 21\%$ ($n=8$).

4.4.3 Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA24

Fiedler et al. (2011) zeigten eine Anreicherung von mikroRNA24 in kardialen Endothelzellen und eine Hochregulierung nach kardialer Ischämie. Weiterhin zeigten sie eine Beteiligung an apoptotischen und angiogenetischen Prozessen, sowie eine Vermittlung dieser Effekte durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor GATA2. Da eine vermehrte Expression von GATA2 bereits gezeigt werden konnte, war es von besonderem Interesse, eine Interaktion zwischen den bereits gezeigten Signalwegen und mikroRNA24 zu untersuchen. Nachdem Endothelzellen einer 2stündigen Hypoxie und einer anschließenden Reoxygenierung unterzogen wurden, wurde die Expression von mikroRNA24 in einer Realtime-PCR gemessen. Nach 24 Stunden Reoxygenierung ergab sich eine Induktion auf $221,9 \pm 37\%$ ($n=10$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle). Durch Einsatz des TGFβ-Rezeptor-Inhibitors reduzierte sich der Effekt auf $132,5 \pm 45\%$ ($n=7$), womit also eine Beteiligung von TGFβ an der Hypoxie/Reoxygenierung induzierten Steigerung der mikroRNA24 gezeigt werden konnte (Abb.24).

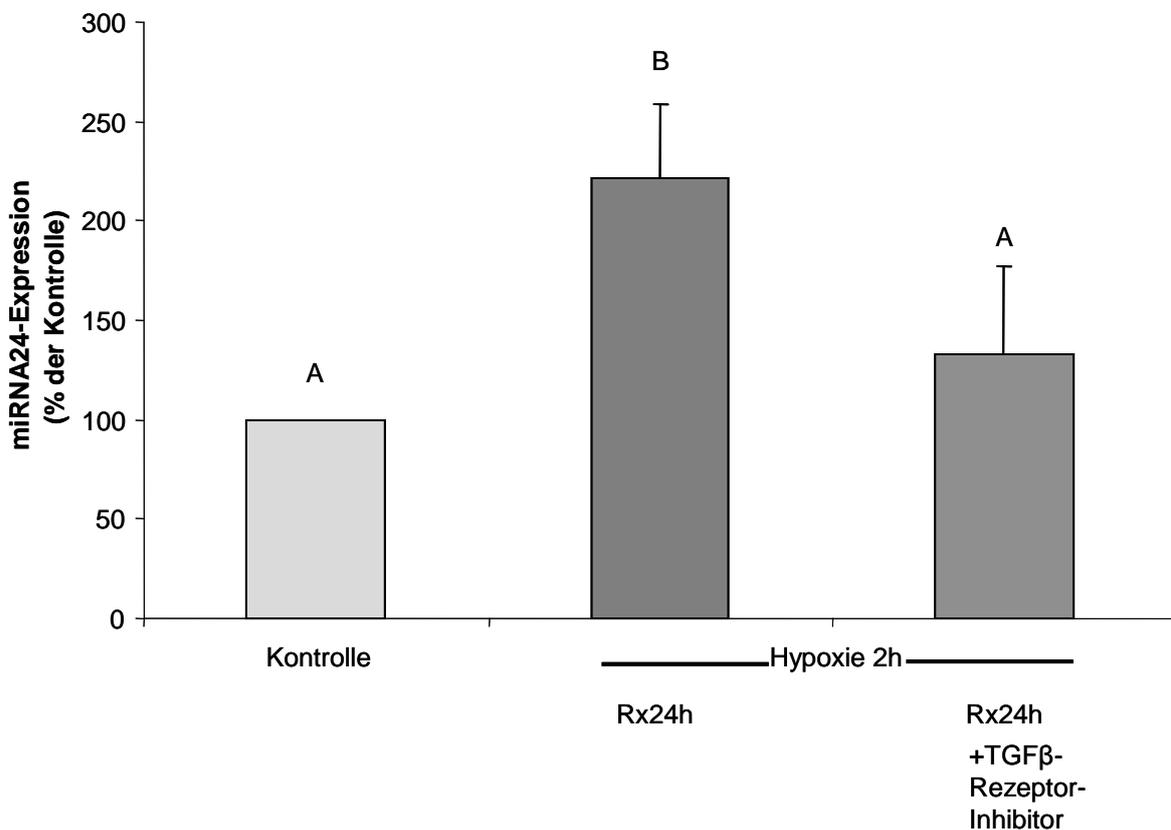


Abbildung 24:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden hypoxisch begast. Ein Teil der Zellen wurde mit dem TGFβ-Rezeptor-Inhibitor SB 431542 (1μM) vorinkubiert. Alle Zellen wurden für 24 Stunden reoxygeniert. Die Synthese der mikroRNA wurde mittels speziellem mikroRNA Kit in einer Realtime-PCR gemessen. Es ergab sich eine Induktion bei den hypoxen Endothelzellen auf $221,9 \pm 37\%$ ($n=10$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) und eine Aufhebung des Effektes durch Einsetzen des Inhibitors auf $132,5 \pm 45\%$ ($n=7$).

4.5 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle in Kardiomyozyten

4.5.1 Durch Hypoxie und Reoxygenierung freigesetztes TGFβ phosphoryliert SMAD2 parakrin in Kardiomyozyten

Mikrovaskuläre Endothelzellen setzen TGFβ unter hypoxen und reoxygenierten Bedingungen frei, welches autokrin auf die Endothelzellen wirkt, um dort TGFβ-spezifische Signalwege wie die Phosphorylierung von SMAD2 in Gang zu setzen. Im folgenden Versuchsaufbau sollte nun eine parakrine Wirkung von TGFβ auf Kardiomyozyten analysiert werden. Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden einer Hypoxie/Normoxie unterzogen und anschließend reoxygeniert. Nach 2 Stunden Reoxygenierung wurden die Mediumüberstände aufgefangen und Kardiomyozyten wurden mit diesen normoxen/hypoxen Mediumüberständen für 1,5h inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Phosphorylierung von SMAD 2 in Kardiomyozyten detektiert. Es konnte eine Induktion von p-SMAD2 in Kardiomyozyten nach Inkubation mit den Überständen der hypoxen Endothelzellen

beobachtet werden ($114,3 \pm 3\%$, $n=9$, $p<0,05$ vs. Kontrolle im t-Test und Mann-Whitney-U Test) (Abb.25). Somit zeigt sich, dass Endothelzellen unter Hypoxie/Reoxygenierung Substanzen ins Medium abgeben, welche parakrin eine Aktivierung von SMAD2 in Kardiomyozyten bewirken.

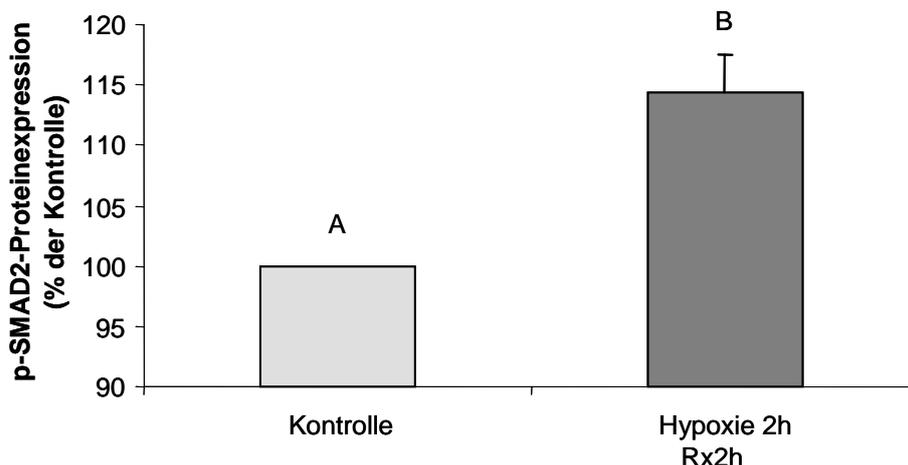
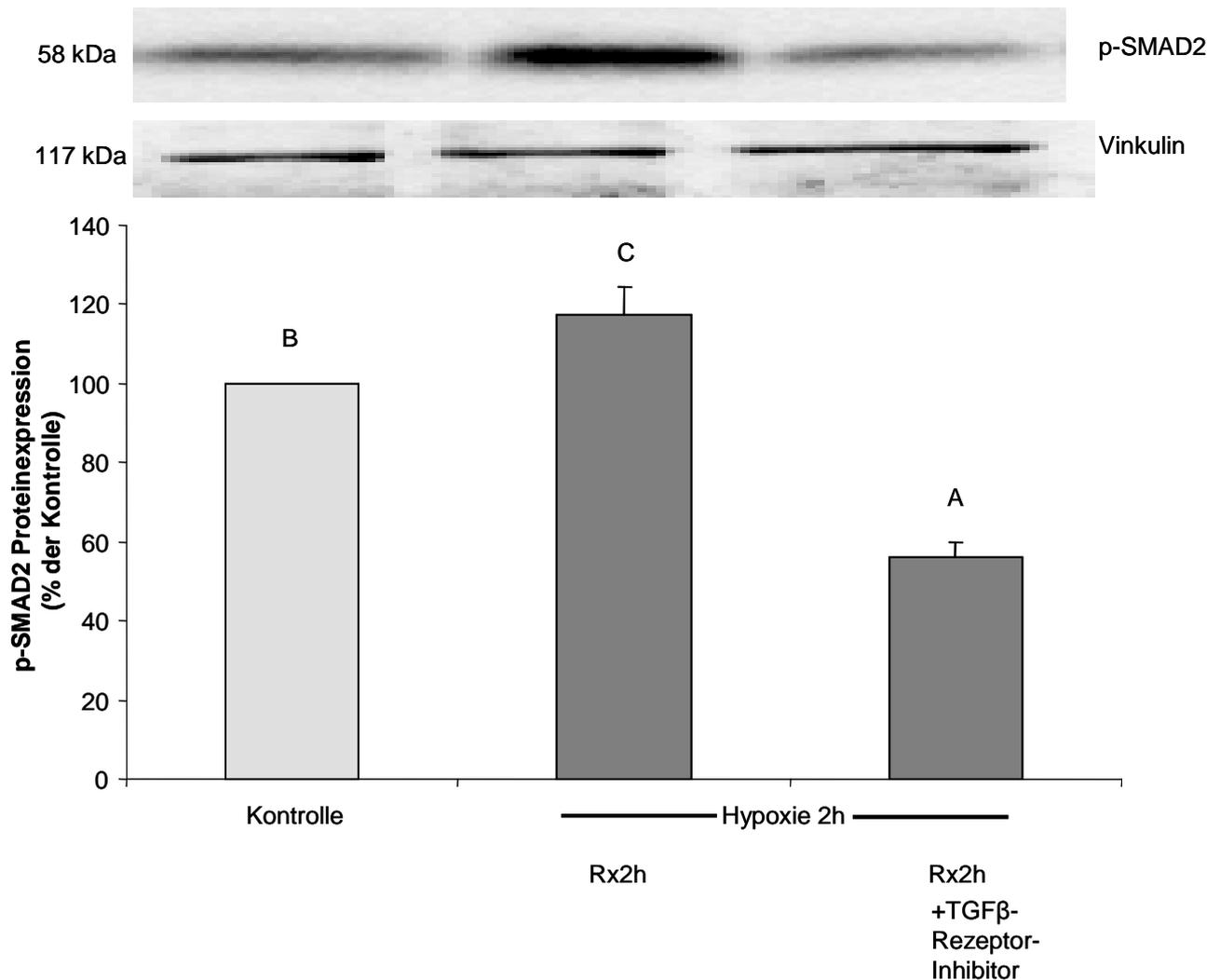


Abbildung 25:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden mit Stickstoff/Luft begast und anschließend reoxygeniert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden reoxygeniert. Die Mediumüberstände wurden aufgefangen und Kardiomyozyten mit diesen inkubiert. Nach 1,5 Stunden Inkubation wurde mittels Western Blot eine Phosphorylierung von SMAD2 in Kardiomyozyten detektiert ($114,3 \pm 3\%$, $n=9$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle mittels Mann-Whitney-U-Test und t-Test).

4.5.2 TGF β -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Kardiomyozyten wieder auf

Es sollte untersucht werden, ob es sich bei der Induktion von p-SMAD2 in Kardiomyozyten nach Inkubation mit hypoxen Mediumüberständen der Endothelzellen tatsächlich um einen durch TGF β vermittelten Effekt handelt. Hierzu wurden erneut Endothelzellen hypoxisch begast und anschließend 2 Stunden reoxygeniert. Die Mediumüberstände der hypoxen/normoxen Endothelzellen wurden auf Kardiomyozyten gegeben, welche teilweise mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor SB 431542 ($1\mu\text{M}$) vorinkubiert worden sind. Die Kardiomyozyten, die nicht mit dem Inhibitor inkubiert wurden, zeigten eine Induktion von p-SMAD2 auf $117,3 \pm 7\%$ ($n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle). Diese Induktion konnte durch das Einsetzen des TGF β -Rezeptor-Inhibitors aufgehoben werden ($55,9 \pm 4\%$, $n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle) (Abb.26). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der p-SMAD 2 Induktion um einen TGF β vermittelten Effekt handelt. TGF β wird also durch Hypoxie und Reoxygenierung von Endothelzellen nach außen abgegeben und hat nicht nur autokrine Wirkung auf Endothelzellen, sondern auch parakrine Wirkung auf Kardiomyozyten.

**Abbildung 26:**

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden hypoxisch begast und anschließend reoxygeniert. Nach 2 Stunden Reoxygenierung wurden die Mediumüberstände der Endothelzellen aufgefangen und Kardiomyozyten mit diesen inkubiert. Ein Teil der Kardiomyozyten wurde zuvor mit dem TGFβ-Rezeptor-Inhibitor SB 431542 inkubiert. Mittels Western Blot wurde eine Induktion von p-SMAD2 überprüft. Die Kardiomyozyten, zeigten zunächst eine Induktion auf $117,3 \pm 7\%$ ($n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle). Durch Einsetzen des TGFβ-Rezeptor-Inhibitors wurde der Effekt wieder aufgehoben ($55,9 \pm 4\%$, $n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle).

Oben:repräsentativer Blot

Unten: Quantitative Auswertung

4.5.3 Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Kardiomyozyten statt

Wie oben beschrieben konnte eine autokrine Aktivierung von SMAD3 in Endothelzellen zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden. Im folgenden Versuchsaufbau sollte eine parakrine Aktivierung von TGFβ auf SMAD3 in Kardiomyozyten untersucht werden. Wiederum wurde der Versuch mit 2stündiger hypoxischer Begasung der Endothelzellen durchgeführt und diese anschließend reoxygeniert. Nach 2 Stunden der Reoxygenierung wurden die Mediumüberstände aufgefangen und auf Kardiomyozyten gegeben (Verhältnis Endothelzellmedium zu Kardiomyozytenmedium betrug 1:2). Nach 1,5 Stunden Inkubation wurde die

Phosphorylierung von SMAD3 mittels Western Blot gemessen. Hier konnte im Vergleich zur normoxen Kontrolle keine Aktivierung von SMAD 3 detektiert werden. Es konnte eine Herabregulation auf $74,1 \pm 5 \%$ ($n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle mittels t-Test und Mann-Whitnes-U Test) gezeigt werden (Abb.27).

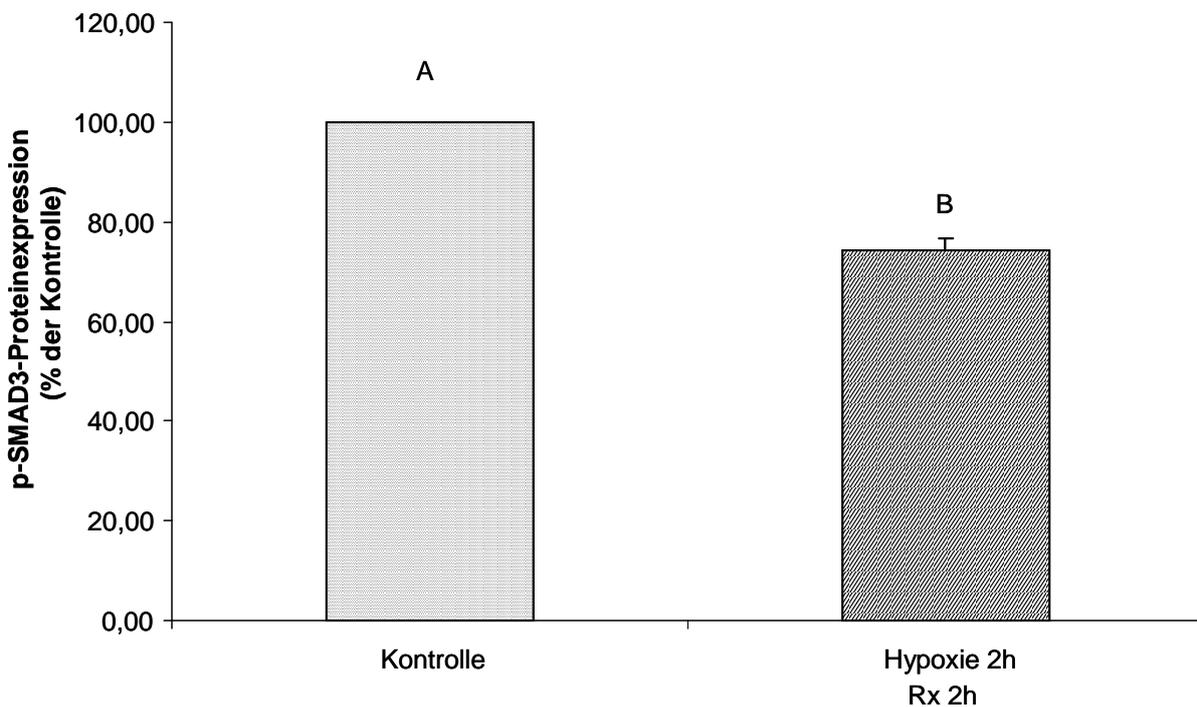


Abbildung 27:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden 2 Stunden einer Hypoxie/Normoxie unterzogen und anschließend reoxygeniert. Nach 2 Stunden Reoxygenierung wurden die Mediumüberstände aufgefangen und Kardiomyozyten wurden mit diesen Endothelzellüberständen für 1,5 Stunden inkubiert. Die Phosphorylierung von SMAD 3 wurde mittels Western Blot analysiert. Es ist eine Herabregulation auf $74,1 \pm 5 \%$ zu beobachten ($n=4$, $p<0,05$ vs. normoxer Kontrolle mittels Mann-Whitney-U-Test und t-Test).

4.6 Einfluss von freigesetztem TGF β auf Apoptose von Kardiomyozyten

4.6.1 Durch Hypoxie/Reoxygenierung freigesetztes TGF β induziert parakrin Apoptose in Kardiomyozyten

In den vorangegangenen Versuchen konnte eine Erhöhung des TGF β sowie eine autokrine Wirkung auf Endothelzellen und parakrine Wirkung auf Kardiomyozyten gezeigt werden. Da TGF β über eine Aktivierung der SMAD-Proteine Apoptose in Kardiomyozyten induzieren, kann überprüft werden, ob von mikrovaskulären Endothelzellen durch Hypoxie/Reoxygenierung freigesetztes TGF β parakrin Apoptose induziert.

Hierzu wurde folgender Versuch durchgeführt: Nach 2stündiger hypoxischer Begasung, wurden mikrovaskuläre Endothelzellen für 2 Stunden reoxygeniert. Die

Zeit der Reoxygenierung wurde nach dem Zeitpunkt der stärksten SMAD2-Phosphorylierung (siehe Punkt 4.2.5) gewählt. Nun wurden die Mediumüberstände der hypoxen/normoxen Endothelzellen abgenommen und isolierte Kardiomyozyten über 24 Stunden mit diesen Überständen inkubiert (Verhältnis Medium Kardiomyozyten zu Endothelzellmedium 2:1). Ein Teil der Kardiomyozyten wurde mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor SB 431542 vorinkubiert (1 μ M). Die Apoptoserate wurde mittels HOE-Assay bestimmt. Bei den nicht behandelten Kontrollzellen ergab sich eine Apoptoserate von $13,1 \pm 1\%$ (n=4), bei den mit reinem Endothelzellmedium (dieses Medium wurde nicht begast) behandelten Zellen eine Rate von $20,1 \pm 2\%$ (n=4), bei den normoxen Kontrollzellen ein Anstieg der Apoptose auf $26,4 \pm 1,7\%$ (n=8) und bei den mit hypoxem Medium begasten Zellen eine Apoptoserate von $36,3 \pm 2\%$ (n=8, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Wir sehen also eine Induktion der Apoptose durch Inkubation mit hypoxen Mediumüberständen. Nach Einsetzen des TGF β -Rezeptor-Inhibitors reduziert sich dieser Effekt auf $26,8 \pm 1\%$ (n=8, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (Abb.28). Folglich induziert TGF β , welches unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen von Endothelzellen freigesetzt wurde, parakrin eine Apoptose in Kardiomyozyten.

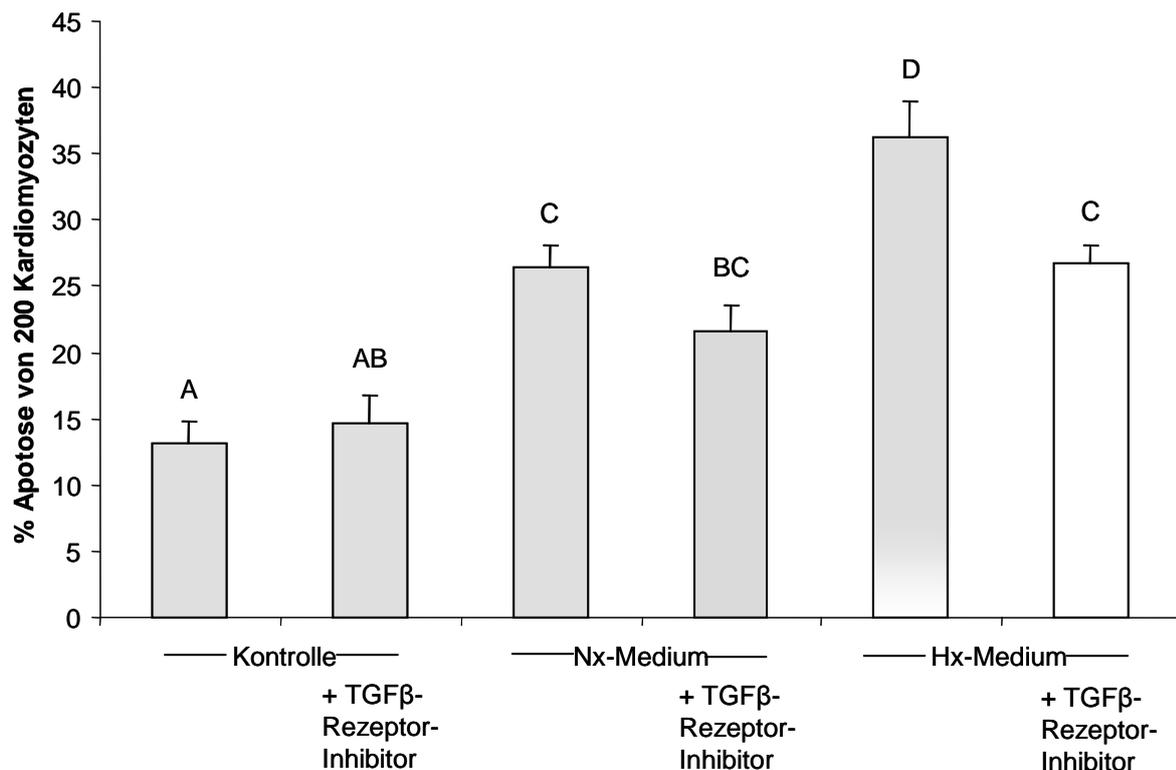


Abbildung 28:

Nach 2stündiger Hypoxie und Reoxygenierung wurden die Mediumüberstände aufgefangen und auf Kardiomyozyten gegeben. Diese wurden nun 24 Stunden mit den Endothelzellüberständen inkubiert und anschließend wurde die Apoptoserate mittels HOE-Assay bestimmt. Bei den nicht behandelten Kontrollzellen ergab sich eine Apoptoserate von $13,1 \pm 1\%$ (n=4), bei den mit hypoxen Mediumüberständen behandelten Zellen ergab sich eine Induktion der Apoptoserate auf $36,3 \pm 2\%$ (n=8, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Nach Einsetzen des TGF β -Rezeptor-Inhibitors SB431542 (1 μ M) reduzierte sich der hypoxe Effekt auf $26,8 \pm 1\%$ (n=8, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (alle Werte bei 200 zufällig ausgezählten Kardiomyozyten).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mikrovaskuläre Endothelzellen als Quelle einer Hypoxie/Reoxygenierung-induzierten TGF β -Erhöhung und –Freisetzung identifiziert. Es konnte autokrin in Endothelzellen und parakrin in Kardiomyozyten die Aktivierung verschiedener TGF β -abhängiger Signalwege unter diesen Bedingungen gezeigt werden (Abb.29), welche schon zu früheren Zeitpunkten als bisher bekannt, am kardialen Remodelling beteiligt sein könnten.

5.1 Endothelzellen als Quelle der TGF β -Expression

Um mikrovaskuläre Endothelzellen in einen hypoxen Zustand zu versetzen, wurden diese 2 Stunden mit Stickstoff begast. Es sollten besonders frühe Hypoxie-Effekte untersucht werden, weshalb eine Begasungsdauer von 2 Stunden gewählt wurde.

Um zu beweisen, dass es sich bei den von mir untersuchten Parametern tatsächlich um Hypoxie-induzierte Effekte handelt, wurden mehrere Kontrollbedingungen gewählt. Neben der Begasung mit N₂ wurden parallel Versuche durchgeführt, in denen mikrovaskuläre Endothelzellen mit Luft begast wurden. So konnte man mögliche Effekte durch z.B. reinen Gasfluss ausschließen. Neben der O₂-Verarmung unterlagen die Zellen auch einem 2-fachen Mediumwechsel. Um auszuschließen, dass dieser Wechsel alleine Einfluss auf die Untersuchungsparameter hat, wurden auch die Kontrollzellen den jeweiligen Mediumwechseln unterzogen, jedoch nicht begast. Desweiteren dienten völlig unbehandelte Endothelzellen als weitere Kontrollbedingung. Nachdem mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte 2 Stunden hypoxisch begast wurden, konnte eine erhöhte Proteinexpression des TGF β -Vorläuferproteins schon nach 15 Minuten Reoxygenierung gezeigt werden. Eine Analyse der Proteinexpression nach 2 Stunden Hypoxie ohne Reoxygenierung zeigte keinen Effekt. 15 Minuten Reoxygenierung können für eine neu gestartete Proteinbiosynthese von TGF β nicht ausreichen. Da TGF β als Teil eines latenten Komplexes zunächst intrazellulär vorliegt, ist es denkbar, dass die Reoxygenierung Mechanismen aktiviert, welche zu einer Abspaltung des Vorläuferproteins aus diesem Komplex zu diesem frühen Zeitpunkt führen.

Einen zweiten Anstieg des TGF β -Vorläuferproteins findet man erst wieder nach 2 Stunden Hypoxie und 24-stündiger Reoxygenierung. Dies ist ein Zeitrahmen, der sich mit einer Neusynthese erklären lässt. Tatsächlich findet man nach 4 Stunden Reoxygenierung eine erhöhte TGF β ₁-mRNA-Expression, die Voraussetzung für eine erhöhte Proteinexpression ist.

5.2 Autokrine Aktivierung der SMADs

Um zu überprüfen, ob die erhöhte TGF β -Expression unter Hypoxie/Reoxygenierung direkte Auswirkungen auf Endothelzellen hat, wurde zunächst nach Hypoxie/Reoxygenierung eine Aktivierung der typischen Signalmoleküle von TGF β , der SMAD-Proteine, intrazellulär überprüft.

Eine Aktivierung der SMAD-Proteine erfolgt zunächst nach Ligandenbindung an den transmembranen TGF β -Rezeptor durch eine Phosphorylierung der Rezeptor-abhängigen SMADs (SMAD2, 3, 1, 5 und 8). Eine Phosphorylierung der SMADs kann schon zu frühen Zeitpunkten stattfinden, weshalb hier eine Zeitkinetik von 0 Minuten bis 24 Stunden Reoxygenierung gewählt wurde. Eine maximale Phosphorylierung von SMAD2 konnte nach 2 Stunden Hypoxie und 2-stündiger Reoxygenierung gezeigt werden (Abb.29). Für diese Aktivierung könnte die TGF β -Erhöhung nach 15 Minuten Reoxygenierung verantwortlich sein, denn einen ähnlichen Zeitgang der SMAD2-Phosphorylierung findet man auch in Kardiomyozyten: Mit TGF β stimulierte Kardiomyozyten zeigen nach ca. 2 Stunden die höchste P-SMAD2-Bindungsaktivität (Heger et al., 2009). Außerdem konnte durch Einsetzen eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors 30 Minuten vor Beginn der Hypoxie die Phosphorylierung von SMAD2 nach 2 Stunden Hypoxie und 2 Stunden Reoxygenierung in Endothelzellen aufgehoben werden. Dies beweist, dass es sich um einen Rezeptor-vermittelten Effekt handelt. Die Phosphorylierung von SMAD2 scheint somit ein wesentlicher Schritt in der Signalweitergabe von der frühen TGF β -Erhöhung (nach 15 Minuten Reoxygenierung) zu sein, denn auf mRNA-Ebene konnte keine erhöhte SMAD-mRNA-Expression nach 4 Stunden Reoxygenierung detektiert werden. Auf mRNA-Ebene findet man ausschließlich eine späte Induktion von SMADs, nämlich erst nach 13 Stunden Reoxygenierung (SMAD2, 3 und 7).

SMAD7 ist ein TGF β -Zielgen und gilt als natürlicher Repressor des TGF β -Signalweges. Es wirkt hemmend auf der Stufe der Phosphorylierung von SMAD2 und 3 auf die TGF β /SMAD Signalkaskade ein (Nakao et al., 1997). Der Anstieg von SMAD7 könnte das Abfallen der SMAD2-Phosphorylierung zwischen 2 und 24 Stunden Reoxygenierung erklären.

Tendenziell kann eine erhöhte Phosphorylierung von SMAD2 auch nach 24 Stunden Reoxygenierung beobachtet werden. Dieser Wert korrespondiert mit der erhöhten Proteinexpression des Vorläuferproteins von TGF β nach 24 Stunden Reoxygenierung und könnte durch die erhöhte TGF β -Expression vermittelt sein.

Eine Phosphorylierung von SMAD3 konnte nicht gezeigt werden, so dass in Endothelzellen diese Isoform keine Rolle für ein TGF β vermitteltes Signal spielt. Nicht auszuschließen ist, dass es zu einer Aktivierung von SMAD1, 5 und 8 kommt, da in Endothelzellen zusätzlich der TGF β -Typ1-Rezeptor ALK1 existiert, welcher diese Isoformen aktivieren kann.

5.3 Induktion von GATA2 im Zusammenhang mit TGF β

In weiteren Schritten wurde die Expression von GATA-Transkriptionsfaktoren in mikrovaskulären Endothelzellen nach Hypoxie/Reoxygenierung überprüft. Sie galten von besonderem Interesse, da Studien eine Beteiligung von GATA an der TGF β -Signalkaskade in Kardiomyozyten zeigen konnten (Schröder et al., 2006) und eine Beteiligung von GATA an myokardialen Umbauprozessen, ausgelöst durch kardialen Stress, beschrieben wird (Molkentin et al., 1998). Von den 6 Isoformen werden nur GATA2, 4 und 6 in mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert (Froese et al., 2010); GATA 2 und 6 jedoch mit Abstand am höchsten, weshalb in der vorliegenden Arbeit nur GATA 2 und 6 untersucht wurden.

Eine Expression von GATA6 in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Froese et al. (2010) zeigten eine

GATA6-Expression in verschiedenen menschlichen Endothelzellen, sowie in vaskulären Endothelzellen der Maus. Auch Molkenkin et al. (1998) zeigten eine GATA6-Expression am Mausmodell. Bei der Ratte konnte eine Expression von GATA6 in Hepatozyten nachgewiesen werden (Divine et al., 2004). Wie nun in dieser Arbeit gezeigt wird, wird in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte GATA6 nicht exprimiert.

Eine Analyse der GATA2-Bindungsaktivität in Endothelzellen ergab eine maximale Aktivierung 4 Stunden nach Hypoxie (Abb.29). 6 Stunden nach Hypoxie nahm die Aktivierung bereits wieder ab und minimierte sich nach 24 Stunden nochmals. Schröder et al. (2006) zeigten ähnliche Ergebnisse in Kardiomyozyten: Sie untersuchten die GATA-Bindungsaktivität in Kardiomyozyten unter dem TGF β ₁ – Stimulus Angiotensin II. Sie zeigten eine maximale Aktivierung von GATA4 nach 2-stündiger Stimulation mit Ang II; diese ließ sich 8 Stunden nach Stimulation kaum noch nachweisen und nahm nach 24 Stunden nochmals weiter ab. Das heißt, dass der Zeitgang der Induktion von GATA in Kardiomyozyten unter AngII Stimulation und in Endothelzellen durch Reoxygenierung ähnlich ist. Allerdings sind die Isoformen nicht identisch; in Endothelzellen findet man GATA2 und in Kardiomyozyten GATA4. Unklar bleibt noch, ob die GATA-Induktion eine Folge der frühen TGF β -Expression nach 15 Minuten Reoxygenierung ist, oder ob es unabhängig von TGF β durch Hypoxie/Reoxygenierung aktiviert wird, um dann zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich nach 24 Stunden Reoxygenierung, die TGF β -Synthese zu erhöhen. Beide Vorgänge wurden bereits in anderen Zellen beschrieben. So zeigten Schröder et al., dass GATA unter AngII erhöht wird und dann für eine erhöhte TGF β -Produktion verantwortlich ist. Fiedler et al. (2011) zeigten dagegen eine Erhöhung von GATA als Folge einer TGF β -Induktion.

Eine Klärung der GATA-TGF β -Reihenfolge wäre mittels Einsatz eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors oder Einsatz eines GATA-Decoy-Oligonukleotides möglich.

5.4 Induktion von mikroRNA21 und 24

Sowohl Hypoxie/Reoxygenierung (Fiedler et al., 2011), als auch TGF β /SMAD (Davis et al., 2008) und GATA (Fiedler et al., 2011) können mikroRNAs induzieren. Da all diese Faktoren in unserem System hochreguliert wurden, stellte sich die Frage, ob induziert durch Hypoxie/Reoxygenierung eine vermehrte mikroRNA-Expression stattfindet. Solche mikroRNAs werden vermehrt in der Pathologie und Physiologie im kardiovaskulären System beschrieben (Ikeda et al., 2007), besonders häufig wurden in diesem Zusammenhang mikroRNA 1, 21 und 24 beschrieben.

Nach Hypoxie und Reoxygenierung wurde zu einem frühen Zeitpunkt (nach 4 Stunden Reoxygenierung) sowie einem späteren Zeitpunkt (nach 24 Stunden der Reoxygenierung) die Expression der einzelnen mikroRNAs mittels Realtime-PCR gemessen.

In dieser Arbeit konnte keine Expression von mikroRNA 1 in mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden. MikroRNA 1 ist besonders bei Patienten mit Erkrankungen der Koronararterien hochreguliert (Dangwal et al., 2011). Yin et al. (2008) zeigen einen massiven Hitze-Schock induzierten Anstieg dieser mikroRNA im Herzen. MikroRNA1 reguliert den Calciumstoffwechsel in Muskelzellen und Apoptose. Durch Einwirkung auf den Calciumstoffwechsel spielt es eine Rolle bei der

Entstehung von Arrhythmien unter pathologischen Bedingungen, die zu einer Herzinsuffizienz führen können (Tijssen et al., 2011; Dangwal et al., 2011). MikroRNA1 wurde bisher nur in Muskelzellen beschrieben, was die fehlende Induktion in Endothelzellen erklärt (Lim et al., 2005; Davis et al., 2008).

Es konnte eine Induktion von mikroRNA21 und mikroRNA24 nach 2 Stunden Hypoxie und 24 Stunden Reoxygenierung in Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb.29). Durch Einsatz eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors konnte die Induktion beider mikroRNAs wieder auf Kontrollniveau gesenkt werden, was beweist, dass die Induktion der mikroRNAs über den TGF β -Rezeptor vermittelt wird. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein: wie bereits in der Einleitung beschrieben, ändern eine große Anzahl von mikroRNAs ihre Expression als Folge einer Stimulation durch Mitglieder der TGF β -Familie (Kong et al., 2008; Chung et al., 2010; Qin et al., 2011; Divakaran et al., 2009). Die Art der Modulation kann dabei auf transkriptioneller Ebene, direkt durch TGF β /SMADs oder indirekt durch weitere Interaktionspartner, sowie auf posttranskriptioneller Ebene erfolgen. Als indirekte Faktoren bei der transkriptionellen Regulation konnten z.B. Myokardin und MRTFs identifiziert werden (Blahna et Hata, 2012). Bei der posttranskriptionellen Regulation konnten p68 und p72 als Interaktionspartner identifiziert werden (Fukuda et al., 2007), es sind jedoch noch weitere Interaktionspartner denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Gehalt an reifer mikroRNA untersucht. Um zu klären, ob es sich bei der gezeigten Induktion um eine transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulation handelt, könnte spezifisch der Gehalt von pri-mikroRNAs untersucht werden. Auch eine eventuelle Induktion der bekannten Interaktionspartner (z.B. Myokardin, MRTFs, p68 oder p72) könnte Aufschluss über den genauen Aktivierungsmechanismus der mikroRNAs geben.

MikroRNA21 wird im gesunden Herzen nur schwach exprimiert, gehört jedoch zu einer der am stärksten regulierten mikroRNAs als Reaktion auf kardialen Stress (Thum et al., 2008; van Rooij et al., 2006). Dies können wir durch die Expression nach Hypoxie/Reoxygenierung auf 499 % bestätigen. Während manche mikroRNAs sehr zellspezifische Funktionen haben, sind die Funktionen der mikroRNA21 jedoch sehr vielfältig und regulieren die Genexpression in verschiedensten Zelltypen. Im Herzen konnten protektive Funktionen von mikroRNA21 nachgewiesen werden. Eine Überexpression von mikroRNA21 in der Ratte führte zu einer verminderten Infarktgröße, sowie einer verminderten Dilatation des linken Ventrikels 24 Stunden nach dem Myokard-Infarkt. Dies hängt mit einer reduzierten Apoptose der Kardiomyozyten, vermittelt durch die Zielgene PDCD4, FasL sowie PTEN zusammen (Dong et al., 2009). Neben der anti-apoptotischen Funktion in Kardiomyozyten hat mikroRNA21 anti-angiogenetische Funktionen in Endothelzellen. Sabatel et al. (2007) konnten mikroRNA21 als negativen Regulator der Angiogenese durch reduzierte Endothelzellproliferation, Migration und eine reduzierte Fähigkeit Zellverbände zu formen, in HUVECs identifizieren. Als verantwortliches Zielgen für diese anti-angiogenetischen Effekte wurde die Rho-GTPase RhoB identifiziert. Ein weiteres bekanntes Zielgen von mikroRNA21 in Endothelzellen ist Sprouty1, welches auch als negativer Regulator der Angiogenese bekannt ist (Sabatel et al., 2011), sowie PTEN ein negativer Regulator der PI3Kinase und somit ebenfalls ein negativer Regulator der Angiogenese.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von mikroRNAs auf Endothelzellen nicht überprüft. Es wäre denkbar, dass es auch hier Einfluss auf die Angiogenese

hat. Aber auch apoptotische Einflüsse sind nicht auszuschließen. Weitere funktionelle Assays zur Apoptose und Angiogenese unter Hypoxie/Reoxygenierung durch Überexpression/Inhibition von mikroRNA21 erscheinen deshalb sinnvoll.

Die Rolle von mikroRNA24 im Herzen ist noch ungenügend erforscht. Sie wird in einer Vielzahl von Organen exprimiert, mit Abstand am höchsten jedoch in Endothelzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Induktion von mikroRNA24 nach Hypoxie und 24 Stunden Reoxygenierung in Endothelzellen gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten Fiedler et al. (2011). Sie beobachteten eine endothelzellspezifische Hochregulierung von mikroRNA24 im infarzierten Herzen. Eine Überexpression von mikroRNA24 induzierte Apoptose in Endothelzellen (Fiedler et al., 2011); eine Inhibition dieser mikroRNA verminderte Apoptose wiederum. Desweiteren konnten Fiedler et al. (2011) eine durch Hypoxie induzierte Apoptose durch den Einsatz eines mikroRNA24-Precursors steigern. Sie identifizierten außerdem anti-angiogenetische Einflüsse auf Endothelzellen. Die unterschiedlichen (anti-angiogenetischen und pro-apoptotischen) Funktionen lassen auf eine Beteiligung verschiedener Zielgene schließen.

Fiedler et al. (2011) konnten GATA2 als direktes Zielgen von mikroRNA24 detektieren. Eine Überexpression von mikroRNA24 resultierte in einer geminderten GATA2 Expression. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Nach einer maximalen Erhöhung von GATA2 nach 4 Stunden Reoxygenierung, flacht nach 24 Stunden Reoxygenierung die GATA-Expression wieder ab. Es könnte sich hierbei um einen mikroRNA24 vermittelten Effekt handeln, was jedoch in weiteren Versuchen zu beweisen wäre.

MikroRNA24 wird auch in anderen Zelltypen exprimiert. Andere Studien beschreiben eine Hypertrophie in Kardiomyozyten vermittelt durch eine Überexpression von mikroRNA24. Nach einem Myokard-Infarkt konnte jedoch keine Expression in Kardiomyozyten, dagegen aber eine sehr starke Expression in Endothelzellen gezeigt werden. Weitere Studien sind daher von Bedeutung, um die genauen Mechanismen besser zu verstehen. Dies würde vielleicht den therapeutischen Einsatz von mikroRNAs als Schutz vor Herzerkrankungen ermöglichen.

5.5 Parakrine Wirkung in Kardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob das von mikrovaskulären Endothelzellen vermehrt induzierte TGF β auch parakrine Wirkung auf Kardiomyozyten hat, wurden diese mit Mediumüberständen von hypoxen Endothelzellen für 1,5 Stunden inkubiert. Um Effekte des reinen Endothelzellmediums auf die Kardiomyozyten auszuschließen, wurden parallel Kardiomyozyten mit reinem Endothelzellmedium inkubiert. Ebenso wurden zur Kontrolle normoxe Endothelzellmedienüberstände verwendet. Bei diesen Kontrollschalen konnten keine Effekte gezeigt werden, weshalb es sich bei den Folgenden also um Endothelzell-spezifische Effekte unter Hypoxie/Reoxygenierung handeln muss.

Die Kardiomyozyten, welche mit Endothelzellmedium der 2stündig reoxygenierten Endothelzellen inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte SMAD2-Phosphorylierung (Abb.29). Es konnte also eine Aktivierung der SMAD-Signalkaskade in Kardiomyozyten gezeigt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der P-SMAD2-Aktivierung in Endothelzellen. Hier konnte die höchste Bindungsaktivität

nach 2 Stunden Reoxygenierung festgestellt werden. Um nachzuweisen, dass es sich um einen TGF β -vermittelten Effekt handelt, wurde der Versuch unter Verwendung eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors erneut durchgeführt. Die P-SMAD2-Aktivierung wurde unter Stimulation mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor deutlich gesenkt. Somit kann das von Endothelzellen unter Hypoxie/Reoxygenierung freigesetzte TGF β eine SMAD2-Phosphorylierung in Kardiomyozyten auslösen.

Eine erhöhte Expression von TGF β und SMADs ist ein Zeichen für eine negative Entwicklung in Richtung eines Herzversagens (Euler-Taimor & Heger, 2006). Nach einem Myokard-Infarkt finden sich erhöhte Mengen an TGF β_1 , sowie eine Aktivierung von SMAD2, 3 und 4 (Hao et al., 1999). Dieser Signalweg kann neben fibrotischen Veränderungen im Myokard auch Apoptose in Kardiomyozyten induzieren. Es stellte sich deshalb die Frage, ob von Endothelzellen freigesetztes TGF β parakrin Apoptose in Kardiomyozyten induziert. Kardiomyozyten wurden nach Inkubation mit Endothelzellmedien von normoxen und hypoxen Endothelzellen mittels HOE Assay auf die Apoptoserate untersucht. In den mit hypoxen Mediumüberständen inkubierten Kardiomyozyten konnte eine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden (Abb.29). Durch Einsetzen des TGF β -Rezeptor-Inhibitors konnte die Apoptoserate deutlich gesenkt werden, was auf einen TGF β -vermittelten Effekt schließen lässt. Es konnten also nicht nur autokrine Auswirkungen auf Endothelzellen, sondern auch parakrine Wirkungen auf Kardiomyozyten gezeigt werden.

Neben der Apoptose zählt die Hypertrophie und Fibrose in Kardiomyozyten zu den Hauptgründen einer progredienten Herzinsuffizienz. Auswirkungen von endotheliale TGF β auf Hypertrophie und Fibrose in Kardiomyozyten könnten somit zusätzlich negative Einflüsse auf das kardiale Remodelling haben.

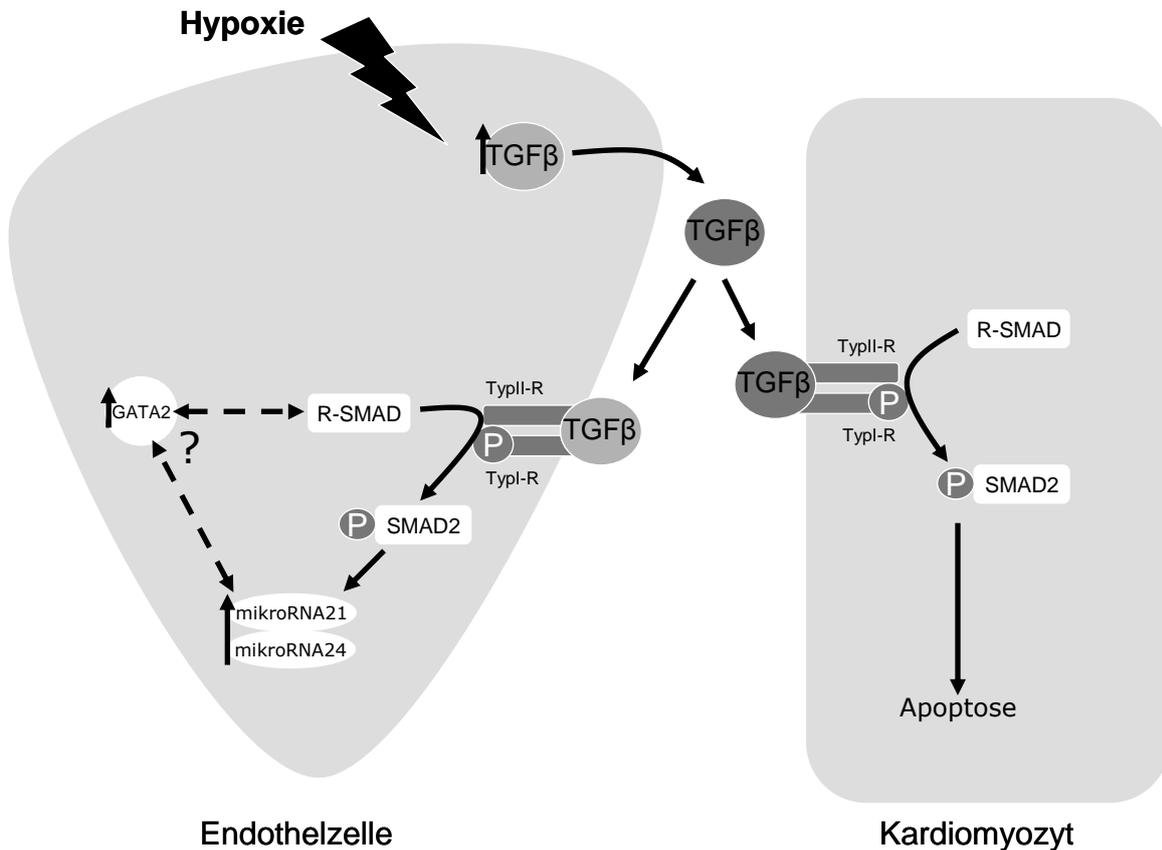


Abbildung 29:

Schema der TGFβ-Freisetzung und der -Aktivierung der SMAD-Signalkaskade nach Rezeptorbindung autokrin in Endothelzellen und parakrin in Kardiomyozyten. Eine Aktivierung von SMADs, GATA2, mikroRNA21 und mikroRNA24 in Endothelzellen findet statt. In Kardiomyozyten führt die Aktivierung der SMAD Signalkaskade durch TGFβ zu Apoptose.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte als Quelle einer Hypoxie/Reoxygenierung induzierten TGFβ-Expression identifiziert. Im Detail wurde eine erhöhte Proteinexpression des TGFβ-Vorläuferproteins, eine erhöhte mRNA-Expression von TGFβ₁, sowie eine erhöhte Freisetzung von TGFβ ins Zelläußere nachgewiesen. Die TGFβ-Induktion findet bereits wenige Minuten nach Hypoxie statt, im Gegensatz zur Infarkt-induzierten TGFβ-Expression in Kardiomyozyten, welche erst 24 Stunden nach einem Infarkt auftritt.

Desweiteren konnten eine Erhöhung von SMAD2-, SMAD3- und SMAD7-mRNA, sowie eine Aktivierung von SMAD2 durch Phosphorylierung als weitere Signalkaskade gezeigt werden. Die Phosphorylierung von SMAD2 konnte sowohl autokrin in Endothelzellen, als auch parakrin in Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen werden. Durch Einsatz eines TGFβ-Rezeptor-Inhibitors konnte diese Aktivierung der SMAD-Signalkaskade in Endothelzellen und in Kardiomyozyten wieder aufgehoben werden.

Weiter konnte in dieser Arbeit eine Hypoxie/Reoxygenierung induzierte erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA2 in Endothelzellen nachgewiesen

werden. Neben der Erhöhung von TGF β , SMADs und GATA2 konnte ca. 24 Stunden nach Hypoxie eine vermehrte Induktion von mikroRNA21 und 24 in Endothelzellen gezeigt werden. Durch Einsatz eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors konnte die mikroRNA Expression wieder auf Kontrollniveau gesenkt werden, was eine TGF β abhängige Induktion unter Hypoxie/Reoxygenierung beweist.

Es wurde gezeigt, dass das von Endothelzellen durch kardialen Stress induzierte TGF β parakrin Apoptose in Kardiomyozyten aktiviert. Da neben der Apoptose auch die Hypertrophie und Fibrose maßgeblich am kardialen Remodelling beteiligt sind, wäre eine Untersuchung der Wirkung von endotheliale TGF β auf diese 2 Faktoren sicherlich sinnvoll. Auch eine induzierte Apoptose autokrin in Endothelzellen wäre denkbar und bedarf weiterer Studien.

Neben der autokrinen Aktivierung/Erhöhung verschiedener Signalmoleküle, könnten in nachfolgenden Studien eine eventuelle Induktion von Apoptose in Endothelzellen nach Hypoxie/Reoxygenierung untersucht werden.

Da bereits eine TGF β vermittelte Induktion von mikroRNA21 und 24 in Endothelzellen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch eine Induktion dieser mikroRNAs parakrin in Kardiomyozyten induziert werden kann. Unter Stimulation von Kardiomyozyten mit normoxen/hypoxen Endothelzellmedien und unter Einsatz eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors könnte dieser Punkt geklärt werden.

Zusammenfassend konnte eine Induktion von TGF β in mikrovaskulären Endothelzellen unter Hypoxie/Reoxygenierung gezeigt werden, was zu einer Aktivierung TGF β -abhängiger Signalwege in Endothelzellen und Herzmuskelzellen führt, was letztendlich das kardiale Remodelling nach Infarkt beeinflussen kann. Ein detailliertes Wissen über die einzelnen Mechanismen könnte langfristig gesehen vielleicht einmal therapeutisch genutzt werden, um die Entstehung einer Herzschwäche zu verhindern.

6 Zusammenfassung

Der Transforming Growth Factor beta (TGF β) spielt als Wachstumsfaktor bei pathophysiologischen Umbauprozessen, dem kardialen Remodelling, eine entscheidende Rolle. Das kardiale Remodelling beschreibt Veränderungen des Herzens in Bezug auf Form, Größe und Funktionalität und ist ein entscheidender Schritt bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Die Beteiligung von TGF β an Komponenten des Remodellings, z.B. der Apoptose in Kardiomyozyten, ist in vorangegangenen Studien bereits gut erforscht.

In dieser Arbeit konnten Endothelzellen als Quelle einer TGF β -Freisetzung und -Erhöhung, induziert durch Hypoxie und Reoxygenierung, identifiziert werden. Nach Simulation eines Myokard-Infarkts durch Hypoxie und anschließender Reoxygenierung konnte eine vermehrte TGF β -Expression auf Proteinebene, sowie mRNA-Ebene in mikrovaskulären Endothelzellen des Herzens gezeigt werden. Zu bekannten intrazellulären Signalmolekülen von TGF β gehören die SMAD-Moleküle (Small mothers against decapentaplegic). In der vorliegenden Arbeit konnte induziert durch Hypoxie und Reoxygenierung eine vermehrte Expression von SMAD2, SMAD3, und SMAD7 sowie eine Aktivierung des Rezeptor-abhängigen SMAD2 durch Phosphorylierung in Endothelzellen gezeigt werden. Da R-SMADs durch eine Liganden-Rezeptorbindung an der äußeren Zellmembran phosphoryliert werden, lässt dies auf eine Hypoxie/Reoxygenierung induzierte TGF β -Freisetzung schließen. Durch Einsetzen eines TGF β -Rezeptor-Inhibitors Typl konnte die Aktivierung der SMADs vermindert werden.

Zu bekannten Interaktionspartnern von SMADs zählen Mitglieder der GATA Familie. Es existieren 6 Isoformen, von denen jedoch nur GATA2, 4 und 6 in Endothelzellen exprimiert werden. GATA4 wird nur minimal in Endothelzellen exprimiert, weshalb in vorliegender Arbeit lediglich eine Hypoxie/Reoxygenierung induzierte Expression von GATA2 und 6 untersucht wurde. Es konnte eine vermehrte GATA2 Bindungsaktivität nach 4 Stunden Reoxygenierung gezeigt werden.

Ein bekanntes Zielgen von GATA2 stellt die mikroRNA24 dar. MikroRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs, welche in annähernd jedem Zelltyp gebildet werden und eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Pathophysiologie einnehmen. Bei der Analyse verschiedener MikroRNA-Isoformen konnte eine vermehrte Expression von mikroRNA21 und mikroRNA24 24 Stunden nach Reoxygenierung gezeigt werden. Durch Einsetzen des TGF β -Rezeptor-Inhibitors konnte der Effekt deutlich gemindert werden, was zeigt, dass es sich um einen TGF β vermittelten Vorgang handeln muss. Die Wirkungen von mikroRNA21 und 24 werden im Zusammenhang mit pro-apoptischen und anti-angiogenetischen Prozessen am Herzen diskutiert und könnten somit Vorgänge des kardialen Remodelling beeinflussen.

Neben autokrinen Effekten konnten parakrine Auswirkungen auf Kardiomyozyten beobachtet werden. Das während Hypoxie/Reoxygenierung aus Endothelzellen freigesetzte TGF β aktiviert parakrin in Kardiomyozyten SMADs und löst Apoptose aus. Somit ist es gelungen, TGF β -induzierte Signalwege in hypoxen und reoxygenierten Endothelzellen und deren parakrine Wirkung auf Kardiomyozyten darzustellen.

Dies kann zum besseren Verständnis von Vorgängen des kardialen Remodellings nach einem Infarkt beitragen und neue Perspektiven für therapeutische Ansätze bieten.

.

7 Summary

Transforming growth factor beta (TGF β) plays a critical role in cardiac remodelling. Cardiac Remodelling includes alterations of shape, dimension and functionality of heart and describes a critical step in the development of heart failure. Recent studies showed the involvement of TGF β in cardiomyocytes in cardiac remodeling, especially in apoptosis induction.

In this study, we identified endothelial cells as source of hypoxia/reoxygenation-induced TGF β expression. Simulation of myocardial infarction by hypoxia and reoxygenation increased TGF β protein and mRNA expression in cardiac microvascular endothelial cells.

Intracellular signal transduction by TGF β is mediated by SMAD molecules (small mothers against decapentaplegic). In this study we showed a hypoxia/reoxygenation-induced increase of SMAD2, SMAD3 and SMAD7 as well as activation of receptor-dependent SMAD2 (R-SMAD2) by phosphorylation in endothelial cells. Phosphorylation of R-SMAD2 was mediated by TGF β binding to transmembrane receptors, because the effect of SMAD activation could be abolished by inhibition of the TGF β receptor.

Since well known interaction partners of SMADs are members of GATA family, induction of GATA members was analysed. 6 isoforms of GATA are known, but only GATA 2, 4 and 6 are expressed in endothelial cells. We could show an increase of GATA2 binding activity after 4 hours of reoxygenation.

MicroRNA24 is an established target of GATA2. MicroRNAs are small, non coding RNAs. They are expressed in nearly every cell type and play a key role in cardiovascular pathophysiology. Examination of different microRNAs showed an increase of microRNA21 as well as microRNA24 after 24 hours of reoxygenation. Using TGF β receptor inhibitors resulted in distinct abolishment of the effect which demonstrates a TGF β -mediated microRNA increase. The effects of microRNA21 and 24 are discussed in the context with pro-apoptotic and anti-angiogenic processes in the heart and may thus be involved in cardiac remodelling after myocardial infarction. Beside the autocrine TGF β effects in endothelial cells, we identified a paracrine effect of TGF β , when cardiomyocytes were incubated with conditioned medium of hypoxia and reoxygenated endothelial cells. Thus, TGF β signaling cascades and target genes could be identified under hypoxia and reoxygenated conditions in endothelial cells, as well as paracrine action on cardiomyocytes, which both may contribute to cardiac remodeling.

8 Literaturverzeichnis

- Akman H.O., Zhang H., Siddiqui M.A.Q., Solomon W., Smith E.L.P., Batuman O.A .
Response to hypoxia involves transforming growth factor- β 2 and Smad proteins
Blood.2001; 98:3324:3331
- Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B.
Making sense of latent TGF β activation
Journal of Cell Science 116, 217-224, 2003, the company of biologists Ltd
doi: 10.1242/jcs.00229
- Baek, D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P. and Bartel D.P.
The impact of microRNAs on protein output
Nature 455,64-71,2009
- Bauersachs J.
Regulation of myocardial fibrosis by microRNAs
J. Cardiovasc. Pharmacol. 2010; 56:454-459
- Berezikov E., Guryev V., van de Belt J., Wienholds E., Plasterk R.H., Cuppen E.
Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes
Cell. 2005; 120:21-24
- Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J.
Dicer is essential for mouse development
Nat. Genet. 2003; 35:215-217
- Birdsall H.H., Green D.M., Trial J., Youker K.A., Burns A.R., MacKay C.R., LaRosa G.J., Hawkins H.K., Smith C.W., Michael L.H., Entman ML., Rossen R.D.
Complement C5a, TGF-beta1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion
Circulation 1997; 95:684-692
- Bisphoric N.H., Andreka P., Slepak T., Webster K.A:
Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte
Curr. Opin. Pharmacol. 1, 141-150
- Blahna M.T., Hata A.
Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis
FEBS Lett. (2012), doi:10.1016/j.febslet.2012.01.041

- Bonauer A., Carmona G., Iwasaki M., Mione M., Koyanagi M., Fischer A., Burchfield J., Fox H., Doebele C., Ohtani K., Chavakis E., Potente M., Tjwa M., Urbich C., Zeiher A.M., Dimmeler S.
MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice
Science 2009; 324:1470-1713
- Bujak M., Frangogiannis N.G.
The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling
Cardiovasc. Res. 74 (2007) 184-195
- Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y., Tang R.H., Tatsuguchi M., Huang Z.P. et al.
MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice
J. Clin. Invest. 2009; 119:2772-2786
- Care A., Catalucci D., Felicetti F., Bonci D., Addario A., Gallo P., Bang M.L., Segnalini P., Gu Y.S., Dal ton N.D., Elia L., Latronico M.V.G., Hoydal M., Autore C., Russo M.A., Dorn G.W., Ellingsen O., Ruiz-Lozano P., Peterson K.L., Croce C.M., Peschle C., Condorelli G.
MicroRNA 133 controls cardiac hypertrophy
Nat.Med. 1 (5), 613-618, 2007
- Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S.
MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells
Cancer Res. 65 (14), 6029-6033, 2005
- Chen J.F., Murchison E.P., Tang R., Callis T.E., Tatsuguchi M., Deng Z., Rojas M., Hammond S.M., Schneider M.D., Selzman C.H., Meissner G., Patterson C., Hannon G.J., Wang D.Z.
Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105:2111-2116
- Chen J.F., Mandel E.M., Thomsom J.M., Wu Q.L., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L., Wang D.Z.
The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation
Nat. Genet. 40 (1), 43-50, 2008
- Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R.
TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing
Nature 2005; 436:740-744

- Cheng Y.H., Ji R.R., Yue J.M., Yang J., Liu X.J., Chen H., Dean D.B., Zhang C.X.
MicroRNA are aberrantly expressed in hypertrophic heart-do they play a
role in cardiac hypertrophy ?
Am.J.Pathol. 170 (6), 1831-1840, 2007
- Cheng Y., Zhu P., Yang J., Liu X., Dong S., Ang X. et al.
Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against
ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4
Cardiovasc. Res. 2010;87:431-439
- Chung A.C.K., Huang X.R., Meng X., Lan H.Y.
MiR-192 mediates TGF β /Smad3-driven renal fibrosis
J.Am.Soc.Nephrol. 21, 1317-1325, 2010
- Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E.,
Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G.,
Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M.
miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 102 (39), 13944-13949, 2005
- Cordes K.R., Srivastava D.
MicroRNA regulation of cardiovascular development
Circ. Res. 2009; 104:724-732
- Currie R.W., Tanguay R.M., Kingma J.G.
Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion
reperfusion in rabbit hearts
Circulation 87 (3), 963-971, 1993
- da Costa Martins P.A., Bourajjaj M., Gladka M., Kortland M., van Oort R.J., Pinto Y.M.
Molkentin J.D., De Windt L.J.
Conditional Dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes
spontaneous cardiac remodeling
Circulation 2008, 118:1567-1576
- Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H., Lagna G., Hata A.
SMAD proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA
maturation by DROSHA
Mol. Cell. 2010;39:373-384
- Davis B.N., Hilyard A.C., Lagna G., Hata A.
SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation
Nature 2008;454:56-61
- Dean R.G., Balding L.C., Candido R., Burns W.C., Cao Z., Twigg S.M., Burrell L.M.
Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial
infarction
J. Histochem. Catochem. 2005; 53: 1245-1256

- Dennler S., Goumans M.J., Ten D.P.
Transforming growth factor beta signal transduction
J. Leukoc. Biol. 71, 731-740, 2002
- Deten A., Holzl A., Leicht M., Barth W., Zimmer H.G.
Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats
J.Mol.Cell Cardiol. 33, 1191-1207, 2001
- Derynck R., Zhag Y.E.
Smad-dependant and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling
Nature 2003;425:577-584
- Divakaran V., Androge J., Ishiyama M., Entman M.L., Haudek S., Sivasubramanian N., Mann D.I.
Adaptive and maladaptive effects of SMAD3 signalling in the adult heart after hemodynamic pressure overloading
Circulation Heart Fail. 2, 633-642, 2009
- Divine J.K., Staloch L.J., Haveri H., Jacobsen C.M., Wilson D.B., Heikinheimo M., Simon T.C.
GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2004, 287 (5):G1086-99
- Dong S., Cheng Y., Yang J., Li J., Liu X., Wang X., Wang D., Krall T.J., Delphin E.S., Zhang C.
MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction
Chem. 2009;284:29514-29525
- Dubois C.M., Laprise M.H., Blanchette F., Gentry L.E., Leduc R.
Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase
J. Biol. Chem.. 270, 10618-10624, 1995
- Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R.
Mechanisms and functions of cell death
Annu. Rev. Cell Biol. 7, 663-698, 1991
- Euler-Taimor G., Heger J.
The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system
Cardiovasc. Res. 69 (2006) 15-25

- Fiedler J., Jazbutyte V., Kirchmaier B.C., Gupta S.K., Lorenzen J., Hartmann D., Galuppo P., Kneitz S., Pena J.T.G., Sohn-Lee C., Loyer X., Soutschek J., Brand T., Tuschl T., Heineke J., Martin U., Schulte-Merker S., Ertl G., Engelhardt S., Bauersachs J., Thum T.
MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction
Circulation 2011; 124:720-730
- Fuentealba L.C., Eivers E., Ikeda A., Hurtado C., Kuroda H., Pera E.M., De Robertis E.M.
Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal
Cell 131, 980-993
- Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Liebich, 4.Auflage, Schattauer Verlag, 2003
- Freude B., Masters T.N., Robicsek F., Fokin A., Kostin S., Zimmermann R., Ullmann C., Lorenz-Meyer S., Schaper J.
Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executes during reperfusion
J.Mol.Cell Cardiol. 32, 197-208, 2000
- Friedman R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. and Bartel, D.P.
Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs
Genome Res. 19, 92-105, 2009
- Froese N., Kattih B., Breitbart A., Grund A., Geffers R., Molkenstin J.D., Kispert A., Wollert K.C., Drexler H., Heineke J.
GATA6 promotes angiogenic function and survival in endothelial cells by suppression of autocrine transforming growth factor beta/activin receptor-like kinase 5 signaling
J. Biol. Chem. Vol. 286, No.7, pp.5680-5690, 2010
- Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., Matsumoto T., Koshida I., Yoshimura K., Mihara M., Naitou M., Endoh H., Nakamura T., Akimoto C., Yamamoto Y., Katagiri T., Foulds C., Takezawa S., Kitagawa H., Takeyama K., O'Malley B.W., Kato S.
DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs
Nat.Cell Biol. 9, 604-611, 2007
- Gentry L.E., Nash B.W.
The pro-domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor
Biochem. 29, 6851-6857, 1990

- Gleizes P.E., Beavis R.C., Mazzieri R., Shen B., Rifkin D.B.
Identification and characterization of an eight-cystein repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates binding to the latent transforming growth factor-beta1
J. Biol. Chem. 271, 29891-29896, 1996
- Goumans M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., ten Dijke P.
Balancing the activation state of of the endothelium via two distinct TGF β type I receptors
EMBO J 2002; 21:1743-1753
- Guerra S., Leri A., Wang X., Finato N., Di L.C., Feltrami C.A., Kajstura J., Anversa P.
Myocyte death in the failing human heart is gender dependant
Circ. Res. 85, 856-866, 1999
- Gregory R.I., Yan K.-P., Amuthan G., Chendrimada T., Diratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R.
The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs
RNA 10, 1957-1966, 2004
- Guo H., Ingolia N.T., Weissmann J.S., Bartel D.P.
Mammalian microRNAs predimonly act to decrease target mRNA levels
Nature 2010; 466:835-840
- Handbuch Pferdepraxis (2006), Enke Verlag, 3.Auflage
- Hao J., Ju H., Zhao S., Junaid A., Scammell-La F.T., Dixon I.M.
Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing
J.Mol. Cell Cardiol. 31, 667-678, 1999
- Hata A., Davis B.N.
Control of microRNA biogenesis by TGF β signaling pathway-A novel role of Smads in the nucleus
Cytok. And Growth factor Rev. 20 (5-6):517-21, 2009
- Heger J., Warga B., Meyering B., Abdallah Y., Schlüter K.D., Piper H.M., Euler G.
TGF β receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release
J.Cell Physiol. 226 (10):2683-90, 2009
- Heldin C.H., Miyazano K., Ten D.P.
TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins
Nature 390, 465-471, 1997

- Hutter M.M., Sievers R.E., Barbosa V., Wolfe C.L.
Heat-shock protein induction in rat hearts – a direct correlation between the amount of heat-shock protein-induced and the degree of myocardial protection
Circulation 89 (1):355-60, 1994
- Ikeda S., Kong S.W., Lu J., Bisping E., Zhang H., Allen P.D., Golub T.R., Pieske B., Pu W.T.
Altered microRNA expression in human heart disease
Physiol. Genomics 2007; 31:367-373
- Ji R.R., Cheng Y.H., Yue J.M., Yang J., Liu X., Chen H., Dean D.B., Zhang C.X.
MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation
Circ. Res. 100 (11), 1579-1588, 2007
- Kawabata M., Imamura T., Miyazano K.
Signal transduction by bone morphogenetic proteins
Cytok. and Growth Factor Rev., 49-61, 1998
- Kong W., Yang H., He L., Zhao J.-J., Coppola D., Dalton W.S., Cheng J.Q.
MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor β /Smad Pathway and contributes to Epithelial Cell Plasticity by targetin RhoA
Mol. Cell. Biol. 28, 6773-6784, 2008
- Kretzschmar M., Doody J., Massague J.
Opposing BMP and EGF signalling pathway converge on the TGF β family mediator SMAD1
Nature 389, 618-622, 1997
- Kurzlehrbuch Physiologie, Huppelsberg und Walter, Thieme Verlag , 2003
- Kwon C., Han Z., Olson E.N., Srivasta D.
MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates notch signaling
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (52), 18986-18991, 2005
- Kim V.N., Han J., Siomi M.C.
Biogenesis of small RNAs in animals
Nat.Rev.Mol. Cell Biol. 10, 126-139, 2009
- Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S
Role of Dicer and Drosha for endothelial micriRNA expression and angiogenesis
Circ Res 2007;101:59-68

- Lagna G., Hata A., Hemmati-Brivanlou A., Massague J.,
Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF β signalling
pathways
Nature 383, 832-836, 1996
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice
A., Kamphorst A.O., Landthaler M., Lin C., Socci N.D., Hermida L., Fulci
V., Chiaretti S., Foa R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Muller R.U.,
Schermer B., Bissels U., Imman J., Phan Q., Chien M., Weir D.B., Choksi
R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H.I., Hornung V., Teng G.,
Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler
C.E., Nagle J.W., Ju J., Papavasiliou F.N., Benzing T., Lichter P., Tam W.,
Brownstein M.J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J.J., Sander C., Zavolan
M., Tuschl T.
A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library
sequencing
Cell. 2007; 129: 1401-1414
- Latronico M.V., Condorelli G.
MicroRNAs and cardiac pathology
Nat. Rev. Cardiol. 2009; 6:419-429
- Lawrence D.A., Pircher R., Kryceve-Martinerie C., Jullien P.
Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent
form
J. Cell Physiol. 121, 184-188, 1984
- Lexikon der Medizin, Zetkin/Schaldach, Fackelträger Verlag GmbH, 16.Auflage, 2005
- Lee Y., Kim M., Han J.J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N.
MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II
EMBO J.23, 4051-4060, 2004
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim
S., Kim V.N.
The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing
Nature 425, 415-419, 2003
- Lim L.P., Lau N.C., Garrett-ENgele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel
D.P., Linsley P.S., Johnson J.M.
Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large
numbers of target mRNAs
Nature 433 (7072), 769-773, 2005
- Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U.
Nuclear Export of MicroRNA Precursors
Science 303, 95-98, 2004

- Madri J.A., Bell L., Merwin J.R.
Modulation of vascular cell behavior by transforming growth factors beta
Mol. Reprod. Dev. 1992;32:121-126
- Mammoto A., Connor K.M., Mammoto T., Yung C.W., Huh D., Aderman C.M., Mostoslavsky G., Smith L.E.H., Ingber D.E.
A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis
Nature. 2009; 457:1103-1108
- Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M.
Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat-stress is associated with resistance to myocardial –infarction
Circulation 88 (3), 1264-1272, 1993
- Massague J.
TGF-beta signal transduction
Annu. Rev. Biochem. 67, 753-791, 1998
- Maulik N., Goswami S., Galang N., Das D.K.
Differential regulation of bcl-2, AP-1 and NFkB on cardiomyocytes apoptosis during myocardial ischemic stress adaption
FEBS Lett. 1999; 443:331-6
- Miyazono K., Olofsson A., Colosetti P., Heldin C.H.
A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF beta 1
EMBO J. 10, 1091-1101, 1991
- Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R., Olson E.N.
A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy
Cell 93: 215-228, 1998
- Narula J., Haider N., Virmani R., DiSalvo T.G., Kolodgie F.D., Hajjar R.J., Schmidt U., Semigran M.J., Dec G.W., Khaw B.A.
Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure
N. Engl. J. Med. 335, 1182-1189, 1996
- Noll T., Wissemann P., Mertens S., Krutzfeld A., Spahr R., Piper H.M.
Hypoxia tolerance of coronary endothelial cells
Adv. Exp. Med. Biol. 277: 467-476, 1999
- Ohno M., Cookie J.P., Dzau V.J., Gibbons G.H.
Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transription and production. Modulation by potassium channel blockade
J. Clin. Invest. 1995; 95:1363-1369
- Park S.H.
Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads
J. Biochem. Mol. Biol. 38, 9-16, 2005

- Pikkarainen S., Tokola H., Kerkela R., Ruskoaho H.
GATA transcription factors in the developing and adult heart
Cardiovasc. Res. 2004; 63:196-207
- Praktikum der Hundeklinik Niemand und Suttner, 9.Auflage, Parey Verlag, 2008
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, De Gruyter Verlag, 1990
- Qian L., Van Laake L.W., Huang Y., Liu S., Wendland M.F., Srivastava D.
MiR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes
J. Exp. Med. 2011; 208:549-560
- Qin W., Chung A.C.K., Huang X.R., Meng X.-M., Hui D.S.C., Yu C.-M., Sung J.J.Y.,
Lan H.Y.
TGF β /Smad3 signalling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29
J. Am. Soc. Nephrol. 22,1462-1474,2011
- Qin L., Van Laake L.W., Huang Y., Liu S., Wendland M.F., Srivastava D.
miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes
J. Exp. Med. 2011; 208:549-560
- Rao P.K., Kumar R.M., Farkhondeh M., Bakerville S., Lodish H.F.
Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (23), 8721-8726, 2006
- Raveendran M., Wnag J., Senthil D., Wang J., Utanma B., Shen Y., Dudley D.,
Zhang Y., Wang X.L.
Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking
induced apoptosis in endothelial cells
FEBS Lett. 579: 733-740, 2005
- Rhoberts A.B., Kim S.J., Noma T., Glick A.B., Lafyatis R., Lechleider R., Jakowlew
S.B., Geiser A., O`Reilly M.A., Danielpour D.
Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression
Ciba. Found. Symp. 1991;157:7-15
- Sabatel C, Cornet AM, Tabruyn SP, Malvaux L, Castermans K, Martial J.A, Struman
I.
Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively
regulates angiogenesis
Mol Cancer 2010;9:231
- Sabatel C, Malvaux L, Bovy N, Deroanne C, Lambert V, Gonzalez M.L, Colige A.,
Rakic J.M., Noël A., Martial J.A., Struman I.
MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB
expression in endothelial cells
Plos One 2011;6:e16979

- Saharinen J., Taipale J., Keski-Oja J.
Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1
EMBO J. 15, 245-253, 1996
- Sayed D., Hong C., Chen I.Y., Lypowy J., Abdellatif M.
MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy
Circ. Res. 100 (3), 416-424, 2007
- Sayed D., He M., Hong C., Gao S., Rane S., Yang Z., Abdellatif M.
MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand
J. Biol. Chem. 2010;285:20281-20290
- Schmierer B., Hills C.S.
TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8:97-982
- Schneiders D., Heger J., Best P., Piper H.-M., Taimor G.
SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes
Cardiovasc. Res. 67 (2005) 87-96
- Schröder D., Heger J., Piper H.M., Euler G.
Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF- β 1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat
J.Mol.Med (2006), 84: 975-983
- Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O`Leary JJ, Ruan Q., Johnson D.S., Chen Y., O`Neill L.A:
Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21
Nat Immunol 2010;11:141-147
- Shi Y., Massague J.
Mechanisms of TGFbeta signaling from cell membrane to the nucleus
Cell 2003; 113:685-700
- Silber J., Lim D.A., Petritsch C., Persson A.I., Maunakes A.K., Yu M., Vendenberg S.R., Ginzinger D.G., James D., Costello J.G., Bergers G., Weiss W.A., Alvarez-Buylla A., Hodgson J.G.
miR-124 and mi-R137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells
BMC Med., 6, 2008

- Sokol N.S., Ambros V.
Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by twist and is required in muscles during larval growth
Genes Dev. 19 (19), 2343-2354, 2005
- Stempien-Otero A., Karsan A., Corneo C.J., Xiang H., Eunson T., Morrison R.S., Kay M., Winn R., Harlan J.
Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death, role of p53 in apoptosis
J. Biol. Chem. (274), 1999, 8039-8045
- Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC.
Dicer dependant microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells
Circ. Res. 2007,100:1164-1173
- Suarez Y., Fernandez-Hernando C., Yu J., Gerber S.A., Harrison K.D., Pober J.S., Iruela-Arispe M.L., Merckenschlager M., Sessa W.C.
Dicer-dependant endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105:14082-14087
- Tay Y.M.S., Tam W.L., Ang Y.S., Gaughwin P.M., Yang H., Wang W.J., Liu R.B., George J., Ng H.H., Perera R.J., Lufkin T., Rigoutsos I., Thomson A.M., Lim B.
MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1
Stem Cells 26 (1), 17-29, 2008
- Thum T., Galuppo P., Wolf C., Fiedler J., Kneitz S., van Laake L.W., Doevendans P.A., Mummery C.L., Borlak J., Haverich A., Gross C., Engelhardt S., Ertl G., Bauersachs J.
MicroRNAs in the human heart- a clue to fetal gene reprogramming in heart failure
Circulation 116 (3), 258-267, 2007
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M., Galuppo P., Just S., Rottbauer W., Frantz S., Castoldi M., Soutschek J., Koteliansky V., Rosenwald A., Basson M.A., Licht J.D., Pena J.T., Rouhanifard S.H., Muckenthaler M.U., Tuschl T., Martin G.R., Bauersachs J., Engelhardt S.
MicroRNA21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts
Nature 2008;456:980-984

- Thum T., Haverich A., Borlak J.
Cellular dedifferentiation of endothelium is linked to activation and silencing of certain nuclear transcription factors: implications for endothelial dysfunction and vascular biology
FASEB J. 2000; 14:740-751
- Thum T., Catalucci D., Bauersachs J.
MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease
Cardiovasc. Res. 2008; 79:562-570
- Tian Y., Lei L., Cammarano M., Nekrasova T., Minden A.
Essential role for the Pak4 protein kinase in extraembryonic tissue development and vessel formation
Mech. Dev. 2009; 126:710-720
- Tijssen A, Pinto Y, Creemers E
Non-cardiomyocyte microRNAs in heart failure
Cardiovasc. Res. (2012) 93, 573-582
- Topper J.N., Cai J., Qiu Y., Anderson K.L., Xu Y.Y., Deeds J.D., Feeley R., Gimeno C.J., Woolf E.A., Tayber O., Mays G.G., Sampson B.A., Schoen F.J., Gimbrone F.A. Jr., Falb D.
Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium
Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:9314-9319
- Tretyakov A.V., Farber H.W.
Endothelial cell tolerance to hypoxia
J. Clin. Invest. 95, 1995, 738-744
- Urbich C., Kuehbacher A., Dimmeler S.
Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis
Cardiovasc. Res. 2008; 79:581-588
- van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J., Olson E.N.
Control of stress-dependant cardiac growth and gene expression by a microRNA
Science 2007; 316: 575-579
- van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D. et al.
A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure
Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:18255-18260
- Wienholds E., Koudijs M.J., van Eden F.J., Cuppen E., Plasterk R.H.
The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development
Nat. Genet. 2003; 35:217-218

- Wyllie A.H.
Apoptosis and carcinogenesis
Eur. J. Cell Biol. 73, 189-197, 1997
- Xu C.Q., Lu Y.J., Pan Z.W., Chu W.F., Luo X.B., Lin H.X., Xiao J.N., Shan H.L., Wang Z.G., Yang B.F.
The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes
J.Cell Sci. 120 (17), 3045-3052
- Yao G., Yin M., Lian J., Tian H., Liu L., Li X., Sun F.,
MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor- β -mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad 4
Mol. Endocrinol.24, 540-551, 2010
- Yang B.F., Lin H.X., Xiao J.N., Lu Y.J., Luo X.B., Li B.X., Zhang Y., Xu C.Q., Bai Y.L., Wang H.Z., Chen G.H., Wang Z.G.
The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2
Nat.Med. 13 (4), 486-491, 2007
- Yin C., Wang X., Kukreja R.C.
Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice
FEBS Letters 582 (2008) 4137-4142
- Zhao Y., Samal E., Srivasta D.
Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis
Nature 436 (7048), 214-220, 2005
- Zhao Y., Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T.,McManus M.T., Schwartz R.J., Srivastava D.
Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2
Cell 129 (2), 303-317, 2007
- Zhou Q., Gallagher R., Ufret-Vincenty R., Li X., Olson E.N., Wang S.
Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23-27-24 clusters
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 2011; 108:8287-8292

9 Danksagung

Ich möchte allen Menschen danken, die mich auf meinem Weg zur Promotion unterstützt und begleitet haben.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gerhild Euler vom Fachbereich Humanmedizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung meines Themas, für ein tolles Arbeitsklima sowie für eine herausragende fachliche sowie menschliche Betreuung meiner Arbeit.

Hervorheben möchte ich Ihre entgegenkommende, kompromisslose Flexibilität, die dazu verholfen hat, neben meiner Promotion als praktizierende Tierärztin zu arbeiten.

Desweiteren danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die ich die vorliegende Arbeit nicht hätte anfertigen können.

Weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Jacqueline Heger. Sie hat mir nicht nur durch fachliche Unterstützung, sondern auch zwischenmenschlich die Zeit im Institut unvergesslich gemacht. Durch Freundlichkeit, Geduld, Kreativität und Verständnis hat sie einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Diener vom Fachbereich Veterinärmedizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für die nette Betreuung, Unterstützung und Korrektur meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei meinen Doktoranden-Kollegen/Innen bedanken, insbesondere bei Dr. Yvonne Osygus, Dr. Claudia Harjung, Björn Warga, Christian Hill, Alona Würfel und Dr. Kiran Khawaja für eine unvergessliche Zeit. Wir hatten viel Spaß zusammen und aus Kollegen sind Freunde geworden.

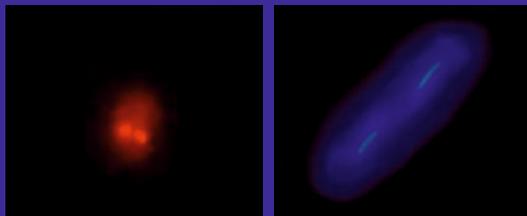
Den technischen Angestellten gilt Dank für die Einarbeitung im Labor, insbesondere Herrn Sergej Kechter, Frau Yvonne Horn, Frau Daniela Schreiber, Frau Birgit Störr und Frau Gudrun Pfeiffer.

Ich danke meinen Freunden Iris Schneider, Ulrike Büchel, Melanie Fischer, Sonja Reichwald und Anne Völpel für ihre Freundschaft. Durch gute Freundschaften waren einige Hürden leichter zu überwinden.

Ich danke Sebastian Vittur, der immer an mich geglaubt hat.

Meiner Familie Dietmar, Renate und Marcel danke ich für die Liebe und Unterstützung meines Lebenswegs. Ich danke Euch, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, diesen Weg einzuschlagen. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Simon Gläser, einem ganz besonderen Menschen in meinem Leben bedanken. Ich danke für seine Liebe und bedingungslose Unterstützung. Danke für Alles!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5941-5



9 17838351959415 1