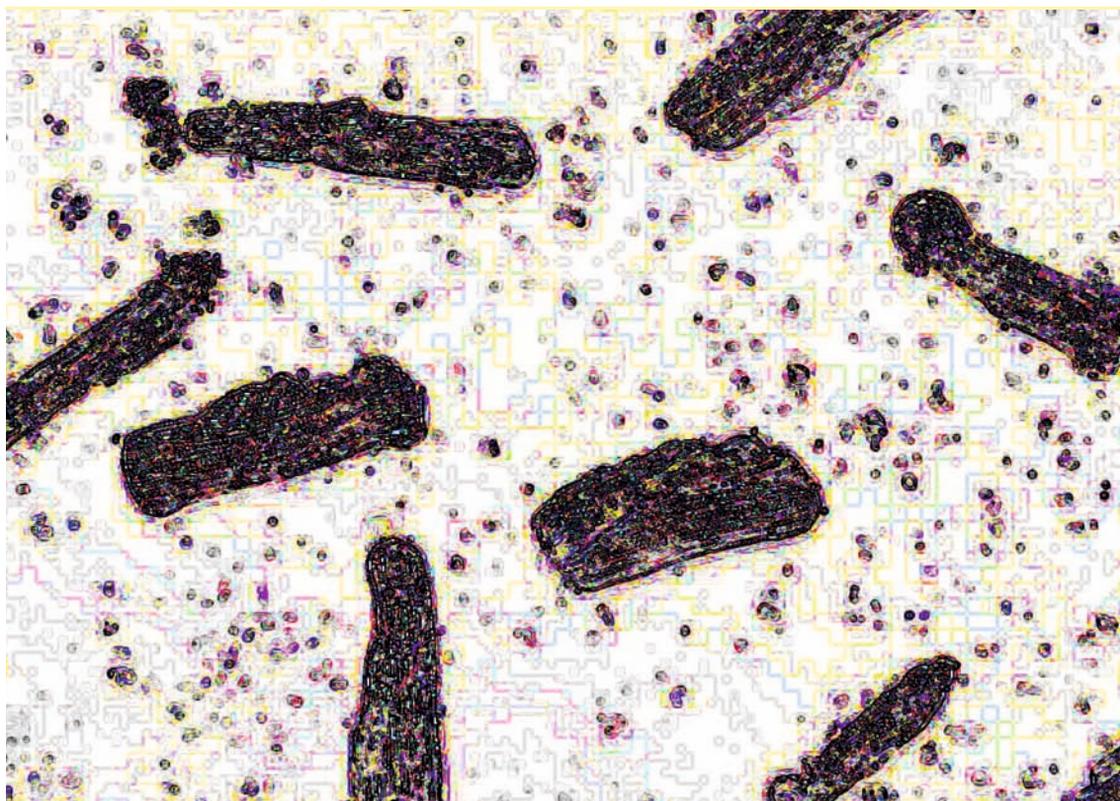


YB-1 inhibiert die durch TGF- β 1 induzierte Apoptose und die α -adrenerg induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten

CLAUDIA HARJUNG



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 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 und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und dem

Institut für Human-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. G. Euler

**YB-1 inhibiert die durch TGF- β_1 induzierte Apoptose
und die α -adrenerg induzierte Hypertrophie in
Kardiomyozyten**

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

eingereicht von

Claudia Harjung
Tierärztin aus Darmstadt

Gießen 2012

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

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

Gutachter/in: Prof. Dr. J. Roth

Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 11.06.2012

Erklärung

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

Darmstadt, den 11.06.2012

C. Harjung

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis:	4
2. Einleitung	10
2.1 Herzinsuffizienz	10
2.2 Apoptose	11
2.2.1 Apoptose-Mechanismen	12
2.2.2 Apoptose im Herzen	13
2.2.3 TGF- β	14
2.2.4 TGF- β_1 / SMAD-Signalkaskade im Herzen	14
2.3 Hypertrophie	17
2.3.1 Hypertrophie-Mechanismen im Herzen	17
2.3.2 Phenylephrin induzierte Hypertrophie im Herzen	18
2.3.3 GDF-15 induzierte Hypertrophie im Herzen	21
2.4 Y-Box-Bindendes-Protein-1	22
2.4.1 YB-1: Struktur	22
2.4.2 YB-1: Biologische Funktionen	23
2.4.3 YB-1: Wirkungen auf die Transkription	24
2.4.4 YB-1: Wirkungen auf die Translation	25
2.4.5 YB-1: Wechselwirkungen mit SMAD-Proteinen	25
2.4.6 YB-1: Wechselwirkungen mit AP-1	26
2.5 Fragestellung	27
3. Material	29
3.1 Versuchstiere und Zelllinien	29
3.1.1 Versuchstiere	29
3.1.2 HEK293-Zelllinie	29
3.1.3 H9c2-Zelllinie	29
3.2 Chemikalien	29
3.3 Substanzen und Antikörper	33
3.4 Primer für Real-Time-PCR	34
3.5 Puffer, Lösungen und Medien	35
3.6 Geräte und Laborbedarf	46
3.6.1 Real-Time-PCR	46
3.6.2 Immunoblot	47
3.6.3 Immunopräzipitation	47
3.6.4 Immunfluoreszenz	47
3.6.5 Querschnittsflächen-Messung	47
3.6.6 Proteinsynthese-Rate-Messung	48
3.6.7 Sonstige Geräte	48
3.7 Verbrauchsmaterialien	49
3.8 Software	49
4. Methoden	51
4.1 Ventrikuläre Kardiomyozyten in der Zellkultur	51
4.1.1 Versuchstiere	51
4.1.2 Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten	51
4.1.3 Vorinkubation der Zellkulturschalen	52
4.1.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten	52
4.1.5 Kultivierung der Kardiomyozyten	53

4.2 H9c2- und HEK293-Zellen in der Zellkultur	53
4.2.1 Ausplattieren der H9c2- und HEK293-Zellen	53
4.2.2 Kultivierung der H9c2- und HEK293-Zellen	53
4.3 Adenoviren in der Zellkultur	55
4.3.1 Amplifikation der Adenoviren	55
4.3.2 Gewinnung der Adenoviren	55
4.3.3 Titer-Bestimmung der Adenovirus-Stammlösung	56
4.3.4 Infektion von Kardiomyozyten, H9c2- und HEK293-Zellen	58
4.4 Bestimmung der Apoptose- und Nekrose-Rate	58
4.4.1 Annexin V-FITC / Propidiumiodid / HOECHST 33258-Färbung	58
4.4.2 Kaspase-Assay	59
4.4.3 HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung	60
4.5 Bestimmung von Hypertrophie-Parametern	61
4.5.1 Querschnittsflächen-Messung	61
4.5.2 Proteinbiosynthese-Rate-Messung	61
4.6 Immunfluoreszenz	63
4.7 Quantitative Real-Time-PCR	64
4.7.1 RNA-Isolierung aus ventrikulären Kardiomyozyten und H9c2-Zellen	64
4.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	64
4.7.3 Gel-Elektrophorese der RNA-Proben	65
4.7.4 DNase-Behandlung und Erstellung von cDNA	65
4.7.5 Aktin-PCR und Gel-Elektrophorese	66
4.7.6 Real-Time-PCR	67
4.7.6.1 PCR-Ansatz für Real-Time-PCR	68
4.7.6.2 Real-Time-PCR-Laufprogramme	69
4.7.6.3 Auswertung der Real-Time-PCR	69
4.8 Immunopräzipitation	70
4.9 Immunoblot	72
4.9.1 Isolierung von Gesamtprotein mittels RIPA-Puffer	72
4.9.2 Protein-Mengen-Bestimmung nach LOWRY	73
4.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	74
4.9.4 Blot-Verfahren	75
4.9.5 ChemiDoc-System	76
4.9.6 Strippen von Membranen	77
4.10 Statistik	78
5. Ergebnisse	79
<hr/>	
5.1 Funktionalität der H9c2-Zellen	79
5.1.1 AdYB-1 erhöht die relative YB-1-mRNA-Expression in H9c2-Zellen	79
5.1.2 AdYB-1 erhöht die relative YB-1-Protein-Expression in H9c2-Zellen	81
5.1.3 TGF- β_1 induziert Apoptose in Kardiomyozyten und H9c2-Zellen	84
5.1.4 TGF- β_1 induziert eine SMAD2-Phosphorylierung in H9c2-Zellen	88
5.1.5 TGF- β_1 erhöht die relative SMAD7-Protein-Expression in H9c2-Zellen	89
5.1.6 TGF- β_1 induziert eine Bindung von P-SMAD2 an P-SMAD3 in H9c2-Zellen	90
5.1.7 TGF- β_1 verhindert die YB-1-Translokation in den Nukleus in H9c2-Zellen	92
5.1.8 PE hat keinen Einfluss auf die YB-1-Translokation in den Nukleus in H9c2-Zellen	94
5.2 Der Einfluss von YB-1 auf eine TGF-β_1 induzierte Apoptose	96
5.2.1 Kardiomyozyten	96
5.2.1.1 YB-1 beeinflusst die relative SMAD4-, SMAD7-, JunB- und JunD-mRNA-Expression in Kardiomyozyten	96
5.2.1.2 YB-1 erhöht die relative SMAD7-Protein-Expression in Kardiomyozyten	101
5.3 Der Einfluss von YB-1 auf eine durch PE induzierte Hypertrophie	103
5.3.1 Kardiomyozyten	103
5.3.1.1 YB-1 hemmt eine durch PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten	103

5.3.1.2	YB-1 erhöht die relative RGS2-mRNA-Expression in Kardiomyozten	106
5.3.1.3	YB-1 erhöht die relative SMAD4-Protein-Expression in Kardiomyozyten	108
5.3.2	H9c2-Zellen	109
5.3.2.1	YB-1 erhöht die relative RGS2-Protein-Expression in H9c2-Zellen	109
5.3.2.2	YB-1 erhöht die relative SMAD4-Protein-Expression in H9c2-Zellen	110
5.4	Der Einfluss von YB-1 auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie	112
5.4.1	Kardiomyozyten	112
5.4.1.1	YB-1 hat keinen Einfluss auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten	112
6.	Diskussion	119
6.1	H9c2-Zelllinie ergänzt Kardiomyozyten-Modell zur Untersuchung von YB-1 und TGF-β_1	119
6.1.1	H9c2-Zellmodell	119
6.1.2	TGF- β_1 -Ansprechbarkeit von H9c2-Zellen	120
6.1.3	Funktionalität von AdYB-1 in H9c2-Zellen	122
6.2	YB-1 als anti-apoptotisches Molekül unter TGF-β_1: Mögliche Signalwege	125
6.2.1	Beeinflussung von SMAD4 durch YB-1	125
6.2.2	Beeinflussung von AP-1-Untereinheiten durch YB-1	126
6.2.3	Beeinflussung von SMAD7 durch YB-1	127
6.2.4	Weitere anti-apoptotische YB-1-Funktionen	128
6.3	YB-1 als anti-hypertrophes Molekül unter Phenylephrin: Mögliche Signalwege und Abgrenzung zu GDF-15	128
6.3.1	Beeinflussung von RGS2 und SMAD-Proteinen durch YB-1	128
6.3.2	Beeinflussung von AP-1-Untereinheiten durch YB-1	130
6.3.3	Subzelluläre Lokalisation von YB-1 unter Phenylephrin	131
6.4	YB-1: Therapeutischer Nutzen	132
6.5	Schlussfolgerung und Ausblick	134
7.	Zusammenfassung	136
7.1	Summary	138
8.	Literaturverzeichnis	140

1. Abkürzungsverzeichnis:

AdEGFP, AdGFP	Adenovirus: Grün fluoreszierendes Protein-
AdHCMV-TK	Adenovirus: Humanes Zytomegalie-Virus-Thymidin-Kinase
AdYB-1	Adenovirus: Y-Box-bindendes Protein-1
ALK	<i>Activin Receptor-Like Kinase</i> , Aktivin-Rezeptor ähnliche Kinase
AKT	Gen der Proteinkinase B
ANX	Annexin V
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	<i>Activating Protein-1</i> , Aktivierendes Protein-1
AP-2	<i>Activating Protein-2</i> , Aktivierendes Protein-2
Aqua bidest.	Zweifach demineralisiertes Wasser
A549	Humane Adenokarzinom-Zellen des alveolären Basalepithels
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> , Knochenwachstumsfaktor
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bZip	Leukin-Zipper, Protein-Domäne
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
C	Celsius
CCL5	Chemokin-Ligand 5
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
COL1A2	Collagen1 alpha-2
CPM	<i>Counts Per Minute</i> , Zahl pro Minute
Cre	Typ I-Topoisomerase von P1-Bakteriophagen

CSD	<i>Cold-Shock Domain</i> , Kälteschock-Domäne
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Schwellenwert der Zyklen
Cy2	<i>Cyanine Dye 2</i>
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
Daudi	Burkitt Lymphom Zelllinie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonukleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i> , Europäische Sammlung der Zellkulturen
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4G	<i>Eucariotic translation Initiation Factor 4 Gamma</i> , Eukariotischer Translationsinitiations-Faktor 4 Gamma
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i> , Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
Fas	Zelloberflächenprotein-Rezeptor
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fw-Primer	<i>Forward-Primer</i>
g	Gramm

GDF-15	<i>Growth Differentiation Factor-15</i> , Wachstums- und Differenzierungsfaktor-15
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Proteinfamilie mit alternierender GDP- und GTP-Bindung
G-Protein	GTP-bindendes Protein
h	<i>hour</i> , Stunde
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i> , Humane embryonale Nierenzelllinie 293
HeLa	<i>Helen Lane</i> , humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	<i>Hepatocellular carcinoma</i> , Hepatozelluläres Karzinom
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSc025	TGF- β_1 / SMAD-Inhibitor, hemmt Translokation von YB-1 in den Nukleus
H9c2	Zelllinie embryonaler BDIX-Rattenherzen
IgG	Immunglobulin G
IgRE	<i>Interferon-γ-Response Element</i>
IFN- γ	Interferon- γ
ifu	<i>Infectious units</i> , Infektiöse Einheiten
kb	<i>kilo-base pair</i> , Kilobasenpaar
kDa	kiloDalton
l	Liter

loxP	Gen-Erkennungssequenz für Rekombinasen
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> , Madin Darby Niere des Hundes
MDR-1	<i>Multi-Drug-Resistance-Gen-1</i>
mg	Milligramm
MH	<i>Major Histocompatibility</i> , Haupthistokompatibilität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitäts-Komplex
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> , Anzahl eingesetzter Viren pro Zelle
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
nm	Nanometer
NO	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PABP	Poly(A) bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymeraseketten-Reaktion
PE	Phenylephrin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , negative dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Aktivität
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p300	Protein 300

p53	Protein 53
rAd	regulatorisches rekombinantes Adenovirus
RaIA	kleine GTPase der Ras-Familie
rev-Primer	<i>Reverse-Primer</i>
RGS2	<i>Regulator of G-Protein Signalling 2</i> , Regulator des G-Protein-Signalwegs 2
RIPA	Radioimmunoprecipitationsassay
RNA	<i>Ribodesoxyribonucleinacid</i> , Ribodesoxyribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	<i>Real-Time</i> , Echtzeit
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SMAD	Small Mother Against Decapentaplegic
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
S2	Sicherheitsstufe 2
TAE	TRIS / Acetate / EDTA
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TBE	TRIS / Borate / EDTA
TCA	Trichloessigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> , Transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
t-RNA	Tansfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Y-Box	Genabschnitt, an den YB-1 bindet
YB-1	Y-Box-bindendes Protein-1
ZONAB	Zonula occludens-1 assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein
µm	Mikrometer

2. Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen die häufigste Todesursache in Industrieländern dar. Laut Statistischem Bundesamt starben in Deutschland im Jahre 2010 von insgesamt 858.768 Personen 41,07 % an einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems. Die Gesamtzahl der aufgrund einer Herzinsuffizienz verstorbenen Menschen betrug insgesamt 5,63 %.

Eine Herzinsuffizienz ist eine durch verschiedene Ursachen induzierte myokardiale Dysfunktion, durch die das Herz unfähig ist, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen (Pschyrembel, 261. Auflage, 2012). Beim Menschen kommen als häufige Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz die koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie, myokardiale Ischämie sowie Kardiomyopathien in Frage. Auch in der Veterinärmedizin spielt das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle. Beim Hund fallen bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz vor allem die degenerative Atrioventrikular-Klappenerkrankung sowie die dilatative Kardiomyopathie ins Gewicht. Eine hypertrophe Kardiomyopathie ist bei Katzen als Hauptursache der Erkrankung zu nennen (Nelson und Couto, 2006).

Die Einteilung der Erkrankung erfolgt nach der Lokalisation (a) in eine Linksherz-, Rechtsherz- oder eine Globalinsuffizienz. Klinisch (b) lässt sich eine Einteilung nach dem Auftreten von Symptomen in eine kompensierte (asymptomatische) oder dekompenzierte (symptomatische) Insuffizienz, nach zeitlichem Verlauf in eine akute oder chronische Erkrankung sowie nach dem Schweregrad in eine Belastungs- oder Ruheinsuffizienz vornehmen. Pathophysiologisch (c) wird zwischen einer systolischen Dysfunktion (verminderte Ejektionsfraktion) und einer diastolischen Dysfunktion (Unfähigkeit zur Aufnahme eines adäquaten Blutvolumens) unterschieden. Pathophysiologisch werden im Zuge einer Herzinsuffizienz neuroendokrine Regulationsmechanismen aktiviert. Es erfolgt eine Sympathikus-Aktivierung sowie eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und es werden Vasokonstriktoren, wie Endothelin, ausgeschüttet. Im Herzmuskel finden morphologische Umbauprozesse (kardiales Remodelling, Myokardhypertrophie,

Apoptose und Fibrose) und molekulare Veränderungen statt (Pschyrembel, 261. Auflage, 2012)

2.2 Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ stammt aus der griechischen Sprache. Er beschreibt das Abfallen welcher Blätter von einem Baum. Diese Metapher wurde im Jahre 1972 von Wyllie et al. als eine Beschreibung des programmierten Zelltods eingeführt. Apoptose ist der Vorgang des genetisch festgelegten Zelltods. Apoptose findet physiologisch während der Entwicklung und des Alterns eines Organismus, aber auch bei der Elimination geschädigter Zellen statt (Norbury et al., 2001). Die wissenschaftliche Untersuchung von Apoptose-Vorgängen geht auf die Erforschung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* zurück (Horvitz et al., 1999). Während des energieabhängigen Apoptose-Vorgangs kommt es zu einer Zellschrumpfung (Kerr et al., 1972) und zu einer Chromatinkondensation (Elmore, 2007). Zellfragmente werden in apoptotische, von intakter Zellmembran umgebene Körperchen (apoptotic bodies), eingeschlossen. Die Zellkörperchen werden von Makrophagen phagozytiert und in Phagolysosomen degradiert. Während des Apoptose-Vorgangs findet keine Entzündungsreaktion statt, da apoptotische Zellen keine zellulären Komponenten in das interstitielle Gewebe entlassen. Die phagozytierenden Makrophagen produzieren keine Zytokine (Kurosaka et al., 2003).

Im Gegensatz zur Apoptose wird bei dem alternativen Weg des Zelltods, der Nekrose, keine Energie benötigt. Während des Vorgangs der Nekrose kommt es zu Karyolyse und Zellschwellung. Es finden Entzündungsreaktionen statt, da die Zellmembran der nekrotischen Zelle zerstört wird. Zellbruchstücke, die in den interstitiellen Raum gelangen können, locken Entzündungszellen an (Kerr et al., 1972).

2.2.1 Apoptose-Mechanismen

An der Induktion und Signaltransduktion von Apoptose sind komplexe, energieabhängige Kaskaden beteiligt (Elmore, 2007). Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, werden zwei Signalwege der Apoptose-Induktion unterschieden. Der extrinsische (Death-Receptor-Pathway) und der intrinsische (Mitochondrial-Pathway) Signalweg.

Der extrinsische Signalweg wird über transmembrane Rezeptor-Interaktionen vermittelt. Zu den in Kardiomyozyten am besten erforschten Liganden dieser Rezeptoren gehören FasL und TNF- α (Ashkenazi et al., 1998). Die Bindung der Liganden an den Rezeptor initiiert die Bildung des Death-Inducing-Signaling-Komplex. Dieser Komplex vermittelt die autokatalytische Aktivierung der Prokaspase 8 (Kischkel et al., 1995).

Der intrinsische Signalweg wird durch äußere Einflüsse, wie Strahlung, Toxine oder Hypoxie, gestartet. Es öffnet sich die Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore in den Mitochondrien. Die Öffnung der Pore hat einen Ausfluss des pro-apoptotischen Cytochrom C in das Zytoplasma zur Folge (Saelens et al., 2004). Cytochrom C aktiviert im Zytoplasma die Prokaspase 9.

Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg resultieren in der Aktivierung der sogenannten Kaspasen-Kaskade. Kaspasen können sich durch ihre Eigenschaft als Proteasen selbst aktivieren. Die Aktivierung der Kaspasen 3, 6 und 7 führt zum Übergang in die Effektorphase (siehe Abbildung 1), in der die für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen der Zelle ablaufen. Kaspasen sind hier für die Spaltung intrazellulärer Proteine und die damit einhergehende Degradation der Zelle verantwortlich. Der intrinsische und extrinsische Signalweg laufen nicht völlig isoliert voneinander ab, sondern können sich durch die beteiligten Moleküle gegenseitig beeinflussen (Igney et al., 2002).

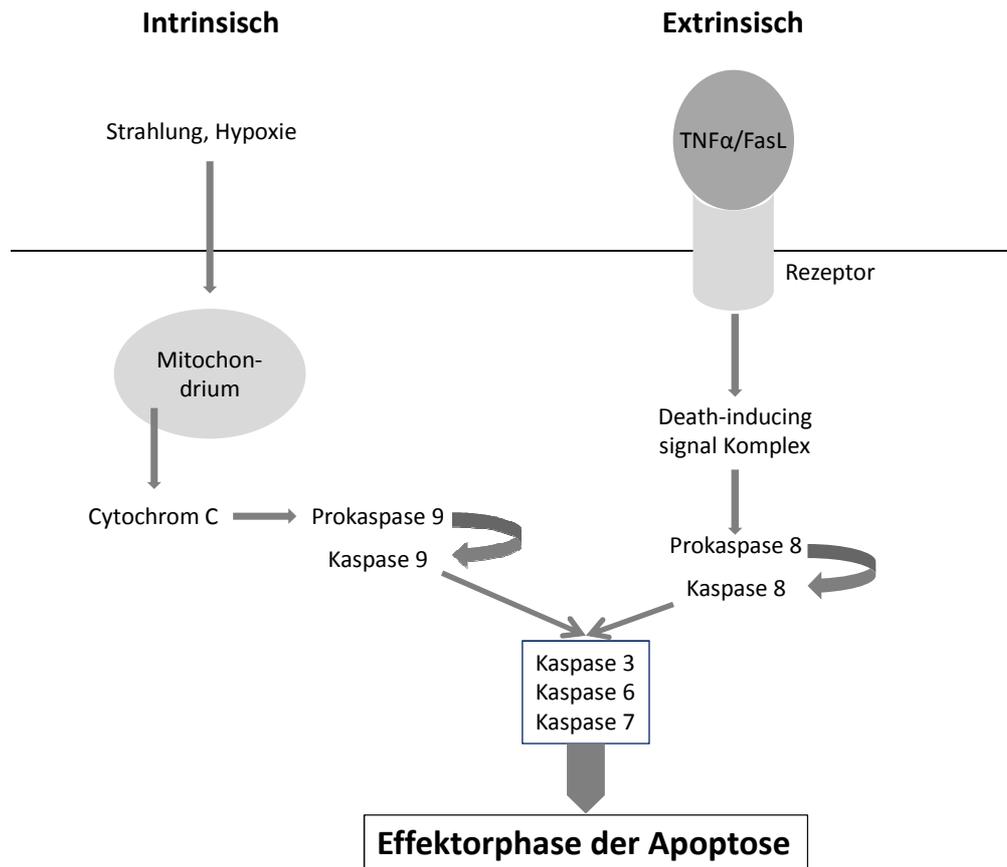


Abbildung 1: Signalwege der Apoptose

2.2.2 Apoptose im Herzen

In Kardiomyozyten wurden bisher als Liganden transmembraner Rezeptoren FasL und TNF- α am besten erforscht (Ashkenazi et al., 1998). Im Herzen spielen außerdem sowohl NO (Schneiders et al., 2005) als auch das Zytokin TGF- β_1 (Transforming-Growth-Factor- β_1) (Euler-Taimor & Heger, 2006) als Apoptose-Induktoren eine wichtige Rolle.

TGF- β_1 wird im Herzen nach einer myokardialen Infarzierung (Deten et al., 2001) sowie im Verlauf von Kardiomyopathien (Hao et al., 1999) vermehrt gebildet. Schneiders et al. beschrieben im Jahre 2005, dass eine Aktivierung des TGF- β_1 / SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic)-Signalweges in Herzmuskelzellen zu Apoptose-Induktion führt. Eine TGF- β_1 -Induktion führt zu einer Translokation des heterotrimeren Komplexes aus SMAD2 / SMAD3 und SMAD4 in den Nukleus. Der heterotrimer SMAD-Komplex kann im Nukleus mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Activator Protein-1) interagieren (Euler-Taimor & Heger, 2006).

AP-1 besteht in seinem Aufbau als Dimer aus Mitgliedern der bZIP Protein-Superfamilie. Jun-Proteine (c-Jun, JunB, JunD) können Homodimere bilden oder mit Fos-Familienmitgliedern Heterodimere formen (Kaminska et al., 2000). Unter Gabe des NO-Donors SNAP konnte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Schneiders et al., 2005). In seiner apoptotischen Funktion ist AP-1 aus JunB- und FosB-Untereinheiten zusammengesetzt. Unter NO-Freisetzung wurde in Kardiomyozyten eine erhöhte Bindung von SMAD2, SMAD3 und SMAD4 gezeigt. SMAD-Proteine können mit Jun-Proteinen direkt interagieren (Liberati et al., 1999), und somit die transkriptionale Aktivität von AP-1 steigern. Der Einsatz von AP-1-Decoy-Oligonukleotiden inhibierte die durch NO induzierte Apoptose (Taimor et al., 2001). AP-1 vermittelt die Transkription von TGF- β_1 -Zielgenen, wie zum Beispiel Kollagen (Zhang et al., 1998). Eine gleichzeitige Aktivierung von AP-1 und SMAD-Proteinen nach einer myokardialen Infarzierung könnte der Auslöser von Apoptose-Induktion im Herzen sein.

2.2.3 TGF- β

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus über 30 Zytokinen. Zu ihren Mitgliedern zählen TGF- β und BMP (Massague et al., 1998). BMP spielt eine Rolle in der Herz-Entwicklung (Euler-Taimor et al., 2006). Seine anti-apoptotische Funktion im Herzen wird über SMAD1 vermittelt (Izumi et al., 2001). TGF- β ist ein multifunktionales Protein: Es dient als Regulator der embryonalen Differenzierung, Homöostase, Proliferation und induziert Apoptose (Massague et al., 2000). TGF- β wird von aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Herzmuskelzellen gebildet. Gleichzeitig sind die genannten Zelltypen empfänglich für dessen Wirkungen (Dennler et al., 2002).

2.2.4 TGF- β_1 / SMAD-Signalkaskade im Herzen

TGF- β_1 vermittelt seine Wirkung über transmembrane Rezeptoren, die aus heterotetrameren Komplexen von Typ I- und Typ II-Rezeptoren bestehen (Massague et al., 1998). Typ I- und II-Rezeptoren bestehen jeweils aus einer extrazellulären Cystein-reichen Domäne, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne (Serin / Threonin Kinase-Domäne). Die Typ II Rezeptor-Kinase ist konstitutiv aktiv

und phosphoryliert nach TGF- β_1 -Bindung die Typ I-Kinase. Diese aktiviert für TGF- β_1 spezifische Signalmoleküle, die SMAD-Proteine (Dennler et al., 2002). SMAD-Proteine werden in drei Klassen eingeteilt: A] R-SMADs: Rezeptoraktivierte SMAD-Proteine (SMAD1-3, SMAD5 und SMAD8); B] Co-SMADs: (SMAD 4); C] I-SMADs: Inhibitorische SMAD-Proteine (SMAD6 und SMAD7). SMAD-Proteine sind aus MH1- und MH2-Domänen aufgebaut, die unterschiedliche Funktionen vermitteln. Die MH1-Domäne interagiert mit DNA und Transkriptionsfaktoren, während die MH2-Domäne an SMAD- sowie Rezeptor-Interaktionen beteiligt ist (Euler-Taimor & Heger, 2005). Alle SMAD-Klassen konnten im Herzen nachgewiesen werden (Euler-Taimor & Heger, 2006).

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, bindet TGF- β_1 im Herzen spezifisch an einen Rezeptorkomplex aus Typ II und ALK 5 (Typ I-Rezeptor) und vermittelt so die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3, die über ihre MH2-Domäne einen heterotrimeren Komplex mit Co-SMAD4 bilden (Dennler et al., 2002). Dieser Komplex wird in den Nukleus transloziert und beeinflusst dort die Transkription (Euler-Taimor & Heger, 2006). Eine gleichzeitige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt die Induktion pro-apoptotischer Faktoren. Das inhibitorische SMAD7 wirkt am Herzen anti-apoptotisch. Es hemmt die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 (Nakao et al., 1997).

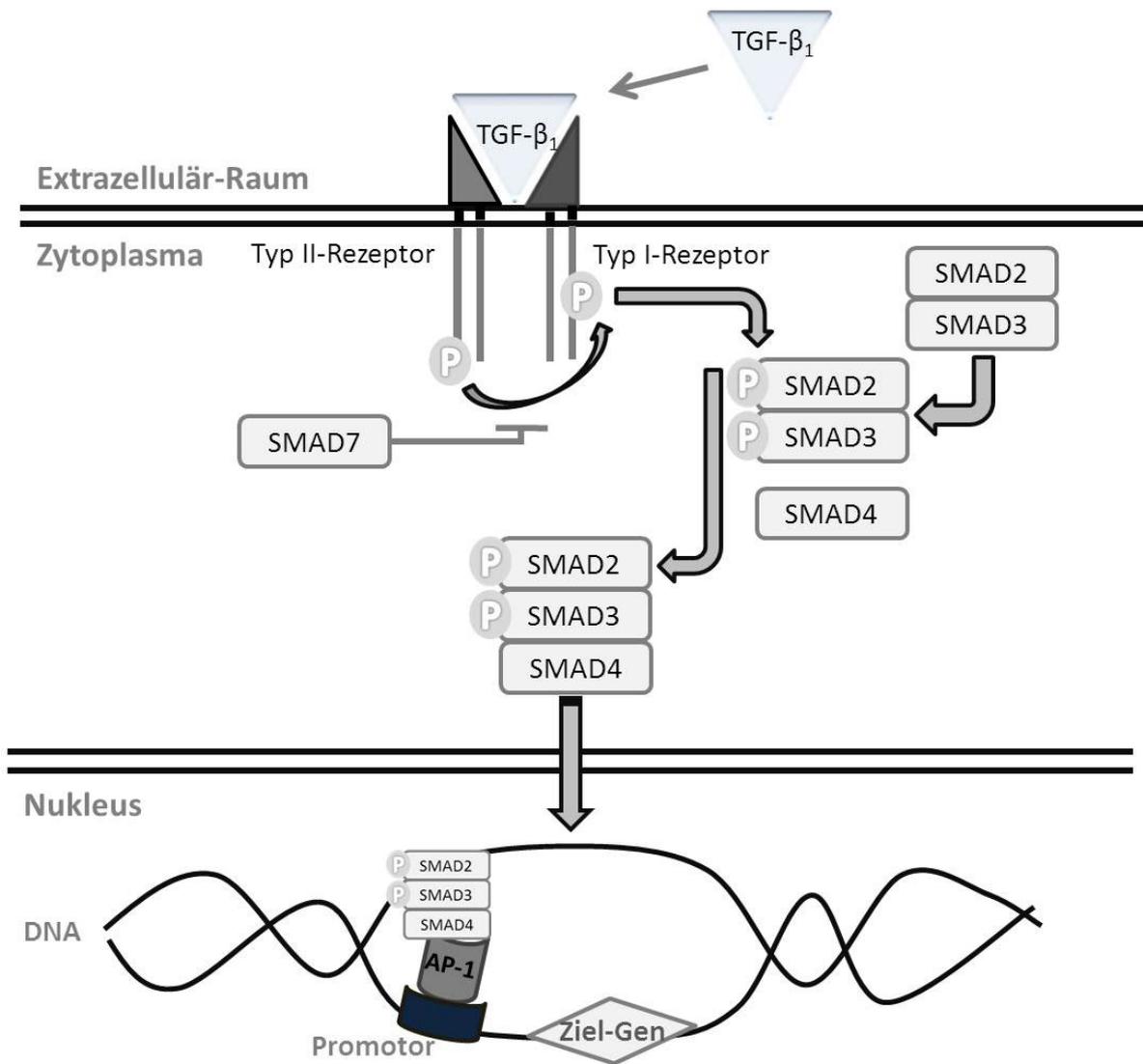


Abbildung 2: TGF-β₁-Signalweg im Herzen

2.3 Hypertrophie

Als Hypertrophie wird die Größenzunahme eines Organs oder eines Gewebes durch Zellvergrößerung bezeichnet. Sie ist abzugrenzen von dem Vorgang der Hyperplasie, bei der eine Größenzunahme durch Zellteilung stattfindet. Im Herzen ist die Hypertrophie als eine Verdickung der Herzwand infolge einer Dickenzunahme der Herzmuskelfasern eines oder aller Herzabschnitte definiert (Pschyrembel, 261. Auflage, 2012). Hypertrophie ist die ausschließliche Vergrößerungsart des Herzmuskels, da sich Kardiomyozyten physiologisch nicht teilen können. Die Hypertrophie des Herzens lässt sich pathologisch-anatomisch einteilen in eine konzentrische (verkleinertes ventrikuläres Lumen) und eine exzentrische (dilatative) Hypertrophie. Pathophysiologisch lässt sich eine Unterscheidung in Linksherz-, Rechtsherz- oder biventrikuläre Herzhypertrophie vornehmen. Eine Herzhypertrophie tritt entweder (a) idiopathisch (primäre Kardiomyopathie) oder (b) chronisch in Folge einer Belastung des Herzens durch Erkrankungen wie Hypertonie, Klappeninsuffizienzen oder nach ischämischen Prozessen auf.

2.3.1 Hypertrophie-Mechanismen im Herzen

Im Zuge einer erhöhten Nachlast kommt es zu einer Dehnung der ventrikulären Herzwand. Dies führt in Kardiomyozyten zu einer erhöhten Proteinbiosynthese (Baker et al., 1992). Unter mechanischem Stress werden fetale Gene reaktiviert (Komuro et al., 1991) und sowohl Kardiomyozyten als auch Nicht-Kardiomyozyten, wie Fibroblasten und Endothelzellen, produzieren pro-hypertrophe Faktoren. Eine kardiale Vergrößerung wird durch eine Induktion von autokrinen und parakrinen Mechanismen hervorgerufen (Hammond et al., 1979). Eine wichtige Rolle in der Hypertrophie-Induktion im Herzen spielt das lokale Renin-Angiotensin-System (Baker et al., 1992), Endothelin-1 (Ito et al., 1993) und Phenylephrin (Schlüter et al., 1992). Diese Faktoren induzieren intrazelluläre Signaltransduktions-Kaskaden, die zu einer veränderten Gen-Expression führen und eine gesteigerten Proteinbiosynthese auslösen. Eine Sympathikus-Aktivierung führt zu einer Freisetzung von endogenen Katecholaminen wie Adrenalin und Noradrenalin. Hält die erhöhte Nachlast dauerhaft an, geht die kompensierte Hypertrophie in eine progressive Vergrößerung des

Herzmuskels über. Dieser Vorgang hat eine erniedrigte myokardiale Durchblutung und Fibrose zur Folge (Diwan et al., 2007).

2.3.2 Phenylephrin induzierte Hypertrophie im Herzen

Phenylephrin ist ein Katecholamin und α_1 -Adrenozeptoragonist. Es führt in Kardiomyozyten zur Hypertrophie-Entwicklung: Eine Stimulation mit Phenylephrin in isolierten Kardiomyozyten der adulten Ratte führt zu einer erhöhten Proteinbiosynthese-Rate (Schlüter et al., 1992). Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wirkt Phenylephrin an der Zellmembran über adrenerge G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Brodde et al., 2006). An Kardiomyozyten sind verschiedene Subtypen des Adrenozeptors identifiziert worden: α_{1A} -, α_{1B} -, β_1 - und β_2 - Adrenozeptoren (Schlüter et al., 2007). Die pro-hypertrophe Wirkung von PE wird in Kardiomyozyten über α_1 -Rezeptoren vermittelt. Eine Aktivierung von α_1 -Rezeptoren führt zu einer Konformationsänderung des an den Rezeptor gekoppelten $G_{\alpha_{11}}$ -Proteins (Tsang et al., 2010).

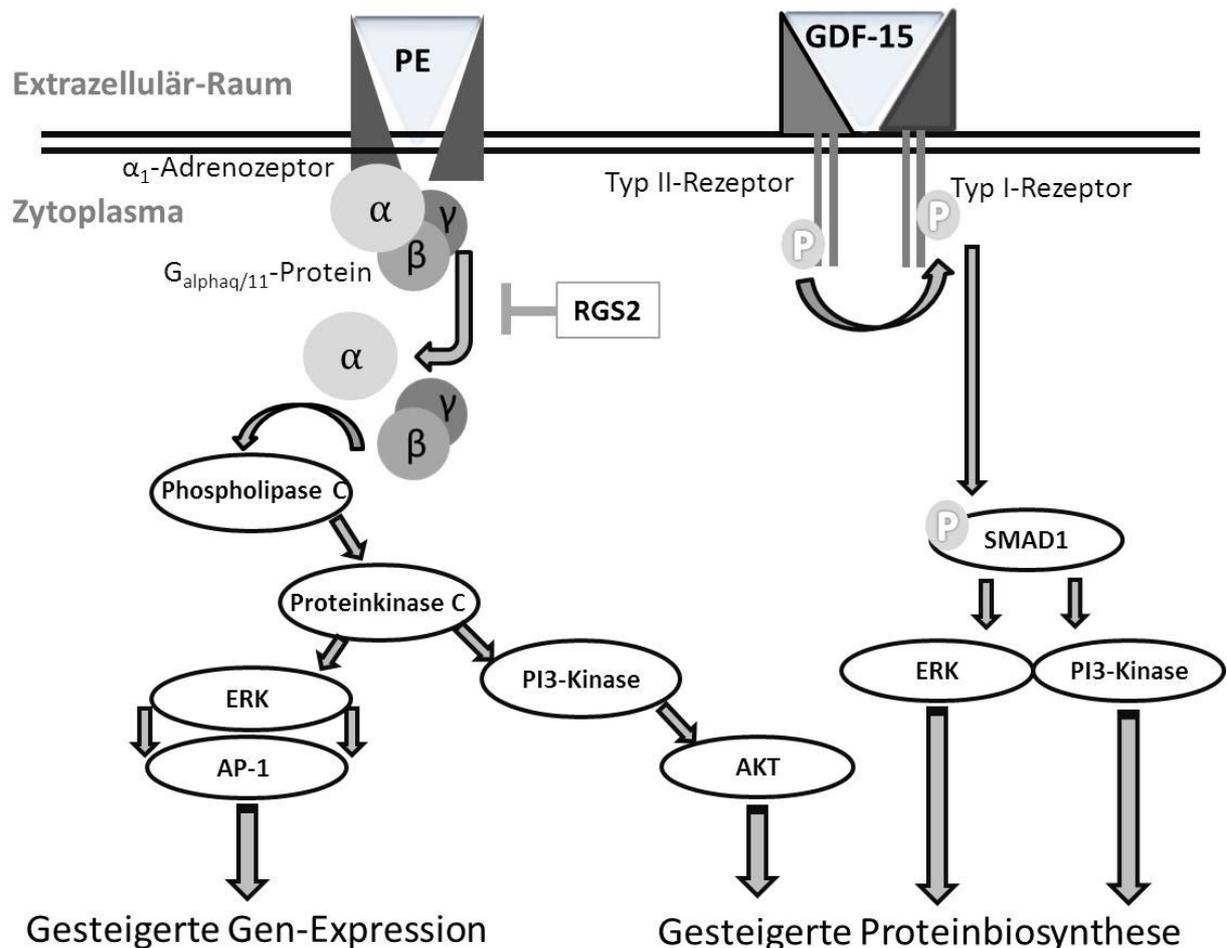


Abbildung 3: Signalwege unter PE- und GDF-15-Stimulation im Herzen

G-Proteine sind aus drei Untereinheiten aufgebaut: Der α -, β - und der γ -Untereinheit. In der inaktiven Form sind die drei Untereinheiten der G-Proteine aneinander gebunden und die α -Untereinheit enthält Guanosindiphosphat (GDP). Nach einer Aktivierung des G-Proteins wird GDP in der G_{α} -Untereinheit gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht. Es findet eine Konformationsänderung des G-Proteins statt, wobei die α -Untereinheit vom Heterodimer der β - und γ -Untereinheit dissoziiert. Dieser in Abbildung 3 dargestellte Vorgang bewirkt eine Aktivierung von untergeordneten Effektor-Molekülen. Die Hydrolyse von GTP zu GDP, die das G-Protein in seine ursprüngliche Form überführt, wird durch intrinsische GTPasen katalysiert (Hendriks-Balk et al., 2008).

Die beschriebene Änderung der Konformation im Zuge der Aktivierung des G-Proteins kann durch das RGS2-Protein, einem Regulator des G-Protein Signalweges, in Kardiomyozyten gehemmt werden. RGS-Proteine verringern die

Signaltransduktion durch G-Proteine, indem sie als GTPase aktivierende Proteine wirken und G-Proteine in ihre ursprüngliche heterotrimere GDP-gebundene Form überführen (Tsang et al., 2010). PE induziert eine 20-fache Erhöhung von RGS2 im Myokard (Hao et al., 2006). Zhang et al. zeigten im Jahre 2006, dass eine Überexpression von RGS2 in Kardiomyozyten eine $G_{\alpha_{\text{phaq}/11}}$ vermittelte Hypertrophie hemmt. Eine Blockade der RGS2-Expression durch eine Hemmung der RGS2-Translation mittels RNAi führte nach PE-Stimulation zu einer vermehrten Hypertrophie in Kardiomyozyten (Zou et al., 2006). Eine selektiver Knock-down von RGS2 in Mäusen hatte eine Hypertrophie, kardiale Dysfunktion und verfrühten Tod durch Bluthochdruck zur Folge (Takimoto et al., 2009).

Nach der Aktivierung des G-Proteins findet in adulten Kardiomyozyten eine Aktivierung der PKC und des PI3-Kinase / Akt-Signaltransduktionsweges statt und führt zur gesteigerten Hypertrophie (Pönicke et al., 2001). Durch eine Hemmung der PI3-Kinase kommt es zu einer Verminderung der Myokardhypertrophie (Schlüter et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass eine α -adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten der Ratte eine erhöhte AP-1-Bindungsaktivität nach sich zieht (Best et al., 2006). AP-1-kommt bei der α -adrenerg induzierten Hypertrophie in Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle zu (Taimor et al., 2004). Die Aktivierung von AP-1 wird über MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinasen)-Kaskaden gesteuert (Li et al., 2000). Unter hypertrophen Stimuli ist AP-1 aus den Untereinheiten c-Jun, JunB, c-Fos und FosB zusammengesetzt (Taimor et al., 2004). Nach seiner Aktivierung fungiert AP-1 als Transkriptionsfaktor, der die Expression von an Hypertrophie beteiligten Genen steuert.

Das Co-SMAD4-Protein hat im Herzen zusätzlich zu seiner pro-apoptotischen Funktion (siehe 2.2.3) Einfluss auf die Hypertrophie-Entwicklung. In Mäusen, deren SMAD4-Proteine herzspezifisch deletiert sind, kommt es zu einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Wang et al., 2005). Eine Überexpression von SMAD4 hemmt in adulten Kardiomyozyten eine durch PE induzierte Hypertrophie (Heger et al., 2009).

2.3.3 GDF-15 induzierte Hypertrophie im Herzen

GDF-15 (Growth-Differentiation-Factor-15) ist ein Zytokin, das zur TGF- β -Superfamilie gehört. Es spielt in der Zellproliferation und in der Differenzierung eine Rolle (Foley et al., 2009). GDF-15 wird als 40 kDa-Propeptid synthetisiert und als dimeres aktives 30 kDa-Protein sezerniert (Bootcov et al., 1997).

GDF-15 wird physiologisch in hohen Konzentrationen von Prostata und Plazenta produziert (Bootcov et al., 1997; Tan et al., 2000), ist jedoch im adulten, intakten Herzen nicht zu finden (Xu et al., 2006). Unter pathologischen Bedingungen, wie nach einer myokardialen Infarzierung, wird GDF-15 vermehrt von Kardiomyozyten gebildet (Kempf et al., 2006). Während einer hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie ist GDF-15 vermehrt im Herzen nachweisbar (Xu et al., 2006). In verschiedenen Studien wurde ein möglicher Einsatz von GDF-15 als Biomarker zur Risikoeinschätzung der Mortalität im Verlauf einer Herzinsuffizienz beschrieben (Kempf et al., 2007; Wollert et al., 2007). Erkrankte Patienten zeigen deutlich höhere GDF-15-Plasmaspiegel als nichterkrankte Vergleichsgruppen. Kempf et al. zeigten im Jahre 2006 einen durch GDF-15 vermittelten protektiven Effekt im Herzen, der das kardiale Remodelling positiv beeinflusst. In dieser Studie wurde in GDF-15-Knock-out-Mäusen ein vergrößerter Infarkt und vermehrte Apoptose nachgewiesen.

In Kardiomyozyten der adulten Ratte wurde GDF-15 als ein pro-hypertropher Faktor beschrieben, der zudem die TGF- β induzierte Apoptose hemmt (Heger et al., 2010). In Kardiomyozyten der adulten Ratte konnte mittels GDF-15 Hypertrophie induziert werden. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wurde eine Aktivierung der PI3-Kinase und der ERK unter GDF-15 nachgewiesen (Heger et al., 2010). Nach GDF-15-Induktion sind SMAD-Proteine in Kardiomyozyten der adulten Ratte erstmals als pro-hypertrophe Faktoren beschrieben. In diesen Zellen spielt im Besonderen die Aktivierung von SMAD1 eine wichtige Rolle (Heger et al., 2010). Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur α -adrenerg induzierten Hypertrophie durch Phenylephrin, bei der SMAD-Proteine keine Rolle spielen (Schneiders et al., 2005).

2.4 Y-Box-Bindendes-Protein-1

Das YB-1-Protein gehört einer Familie von DNA- und RNA bindenden Faktoren an, die als Cold-Shock-Proteinfamilie bezeichnet wird (Dooley et al., 2005). Der Name des Proteins wurde erstmals von Didier et al. (1988) eingeführt, um einen Transkriptionsfaktor zu benennen, dem eine Affinität zur Y-Box von MHC-Klasse-II-Promotoren eigen ist. Die Y-Box ist eine während der Evolution hoch konservierte Gen-Sequenz, die eine inverse CCAAT-Box enthält. Wie Abbildung 4 zu entnehmen, ist YB-1 ein multifunktionelles Protein, das an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt ist (Kohno et al., 2003). YB-1 fungiert als Regulator von Transkription und Translation (Dooley et al., 2005). YB-1 kann sowohl an doppel- als auch an einzelsträngige Nucleinsäuren binden (Homer et al., 2005).

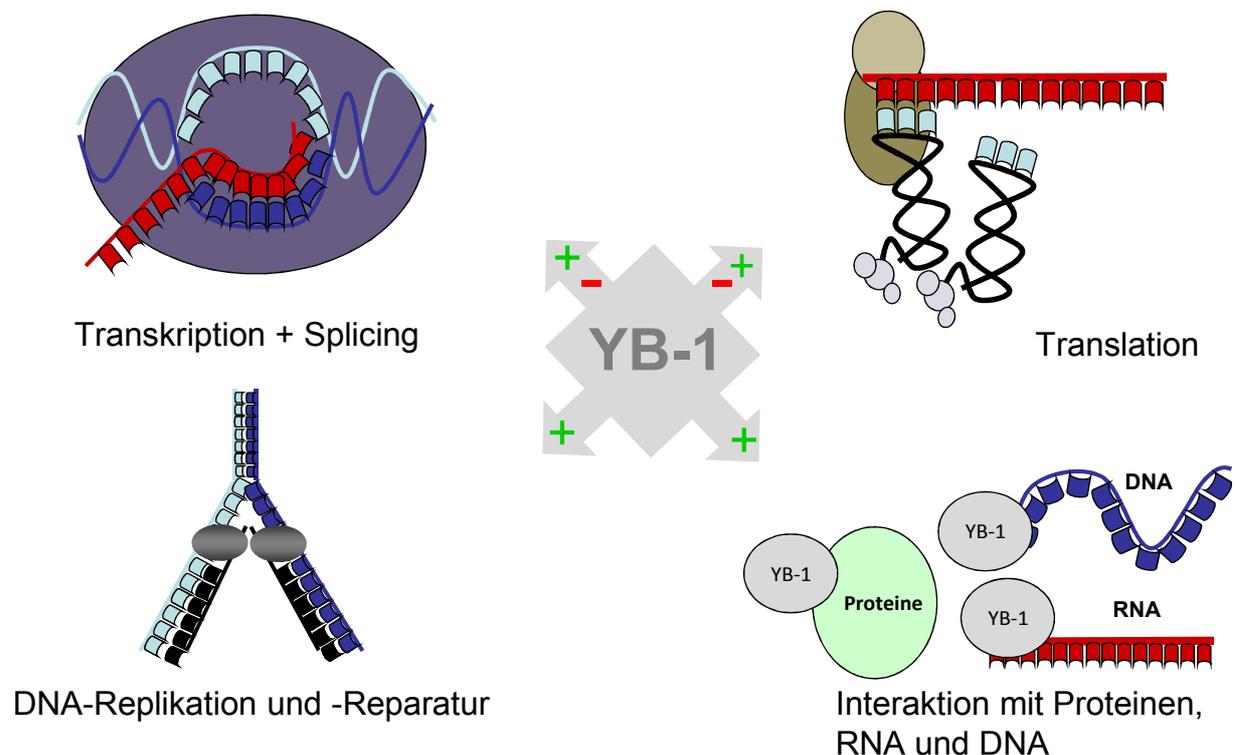


Abbildung 4: YB-1-Wirkungen mit steigernden (+) und hemmenden (-) Funktionen

2.4.1 YB-1: Struktur

Das YB-1-Gen besteht aus acht Exons, die sich über 19 kb genomische DNA erstrecken; diese liegen auf Chromosom 1 p 34. Die YB-1-mRNA ist 1.5 kb lang und kodiert das 43 kDa große YB-1-Protein, das aus 324 Aminosäuren besteht. Das YB-

1-Protein ist aus drei Domänen aufgebaut (siehe Abbildung 5): Die N-terminale Domäne, die zentrale Cold-Shock-Domäne und die C-terminale Domäne. Die N-terminale Domäne ist reich an Alanin und Prolin und dient der Transaktivierung (Kohno et al., 2003). Die zentrale Cold-Shock-Domäne ist eine fünfblättrige β -Faltblatt-Struktur (Graumann et al., 1996) und dient der Bindung von Nukleinsäuren. Die C-terminale Domäne besteht aus alternierenden basischen und sauren Aminosäureabschnitten, die jeweils 30 Aminosäuren umfassen. Sie hat die Aufgabe der Protein-Protein-Interaktion (Wolffe et al., 1992) und wird deshalb auch als Charged-Zipper-Domäne bezeichnet. Die Charged-Zipper-Domäne bindet einzelsträngige DNA und RNA (Izumi et al., 2001).

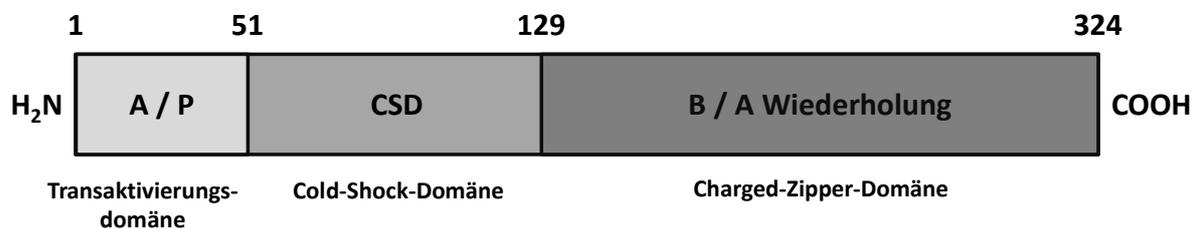


Abbildung 5: Proteinstruktur des humanen YB-1

2.4.2 YB-1: Biologische Funktionen

YB-1 ist ubiquitär in allen Geweben vorhanden und an vielfältigen zellulären Funktionen, wie Translation und Transkription (Kohno et al., 2003), Splicing (Stickeler et al., 2001) und Interaktion mit Reparatur-Proteinen (Marenstein et al., 2001) beteiligt (siehe Abbildung 4). YB-1 vermittelt während des Wachstums im Herzen die Expression der leichten Myosin-Kette (Zou et al., 1995). Im gesunden Gewebe des adulten Herzens ist YB-1 kaum nachweisbar (Kamalov et al., 2005). Im Rattenmodell kommt es drei bis zehn Tage nach einer myokardialen Infarktzierung zu einer Hochregulierung des Proteins im Infarktgebiet. YB-1 ist in diesem Zeitraum hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, während es nach dem zehnten Tag im Zytoplasma zu finden ist (Kamalov et al., 2005).

YB-1 findet eine große Beachtung in der Krebsforschung, da es Apoptose in proliferierenden Zellen hemmt. Eine vermehrte YB-1-Expression korreliert mit einer schlechten Prognose (Jurchott et al., 2003). YB-1 wird in entartetem Gewebe von Brustkrebspatienten vermehrt exprimiert (Xie et al., 2011) und fördert dort die Expression des Multi-Drug-Resistance-1-Proteins (Bargou et al., 1997). YB-1 ist

überexprimiert im humanem Osteosarkom (Oda et al., 1998), im malignem Melanom (Hipfel et al., 2000) und im Nicht-Kleinzelligem Lungentumor (Shibahara et al., 2001). Eine Suppression von YB-1 führt in Melanomzellen zu einer erhöhten Apoptose-Rate (Schittek et al., 2007). Dies macht eine Beteiligung von YB-1 an der Hemmung des programmierten Zelltods wahrscheinlich.

YB-1 wirkt sich auch im gesunden Gewebe auf Apoptose-Vorgänge aus: Es bindet das Protein p53 und führt so zu einer vermehrten Expression von dessen Target-Genen, die anti-apoptotisch wirken (Okamoto et al., 2000). YB-1 reguliert in B-Lymphozyten das pro-apoptotische Gen Fas herunter (Lasham et al., 2000) und wirkt somit anti-apoptotisch.

2.4.3 YB-1: Wirkungen auf die Transkription

In nicht entarteten Zellen ist YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Die nukleäre Translokation des Proteins kann durch UV-Strahlung (Koike et al., 1997), Hyperthermie (Stein et al., 2001) sowie durch INF- γ (Interferon- γ) oder TGF- β (Higashi et al., 2003 a und b) hervorgerufen werden. In Tumorzellen weist die nukleäre Translokation von YB-1 auf eine schlechte Prognose hin (Bargou et al., 1997; Oda et al., 1998; Shibahara et al., 2001). YB-1 kann im Nukleus als Transkriptionsfaktor wirken und die Expression verschiedener Gene steigern oder hemmen. YB-1 bindet zum einen direkt an die Y-Box, eine inverse CCAAT-Box, die in der Promotorregion von vielen Wachstums-assoziierten Genen vorhanden ist (Kohno et al., 2003). Ein solches Wachstums-assoziiertes Gen, an dessen Y-Box YB-1 bindet, ist das MDR-1-Gen (Kohno et al., 1992). YB-1 kann zudem die Transkription beeinflussen, indem es mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Die gebundenen Transkriptionsfaktoren werden von YB-1 gehemmt oder aktiviert. Der Transkriptionsfaktor AP-2 wird von YB-1 in Hepatom HepG2 Zellen (Mertens et al., 1998) aktiviert. YB-1 hemmt den Transkriptionsfaktor SMAD3 in humanen Hautfibroblasten und verhindert so die folgende Expression des COL1A2-Gens (Higashi et al., 2003). YB-1 beeinflusst die Transkription auf einem weiteren Weg: Es bindet einzelsträngige DNA in Regionen von Promotoren (Kohno et al., 2003) und fördert, bzw. hemmt deren Aktivierung (Wilusz et al., 2001).

2.4.4 YB-1: Wirkungen auf die Translation

YB-1 ist der Hauptbestandteil von zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexen (mRNPs) (Evdokimova et al., 1995). In mRNPs wird die mRNA bis zur Translation im Zytoplasma gespeichert. Die Speicherung von mRNA ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Translation. YB-1 destabilisiert in niedriger Konzentration die Sekundärstruktur der mRNA, wodurch diese für Ribosomen leichter zugänglich wird (Matsumoto et al., 1998), so dass YB-1 in niedriger Konzentration die mRNA Translation steigert (Evdokimova et al., 1998). Bei einer hohen zytoplasmatischen Konzentration von YB-1 wird die Translation durch eine Maskierung der mRNA inhibiert (Evdokimova et al., 1998), indem YB-1 den Translationsfaktor eIF4G verdrängt (Nekrasov et al., 2003). Die Bindung von mRNA geschieht sowohl sequenzabhängig als auch sequenzunabhängig (Kohno et al., 2003). Beispielsweise bindet YB-1 die TGF- β -mRNA in proximalen Tubuluszellen an zwei unterschiedliche Stellen und kann je nach Bindungsstelle die basale Translation von TGF- β steigern oder hemmen (Fraser et al., 2007).

2.4.5 YB-1: Wechselwirkungen mit SMAD-Proteinen

SMAD-Proteine spielen sowohl in der TGF- β_1 induzierten Apoptose (siehe 2.2.4) als auch in der durch GDF-15 induzierten Hypertrophie (siehe 2.3.3) eine große Rolle. Interaktionen von YB-1 mit SMAD-Proteinen sind in verschiedenen Geweben beschrieben worden. Higashi et al. zeigten im Jahre 2003, dass YB-1 in humanen Hautfibroblasten und embryonalen Nierenzellen eine TGF- β_1 induzierte Expression von Kollagen hemmt. YB-1 bindet an das Interferon- γ -response Element (IgRE) und verursacht eine durch Interferon- γ vermittelte Hemmung der Transkription des Kollagen-Gens COL1A2. Im Jahre 2006 beschrieben Higashi et al., dass YB-1 in humanen Hautfibroblasten durch eine Interaktion mit SMAD3 sowie durch eine Hemmung der Interaktion von SMAD3 mit p300 die Kollagen-Expression hemmt. Im Mausmodell hemmt YB-1 in vivo die TGF- β_1 vermittelte Expression des COL1A2-Gens (Inagaki et al., 2005). In hepatischen Kupfer'schen Sternzellen wurde nachgewiesen, dass YB-1 synergistisch mit IFN- γ eine Expression des inhibitorischen SMAD7-Moleküls auf mRNA- und Protein-Ebene steigert. In HEK293-Zellen wirkt YB-1 bereits alleine steigernd auf eine SMAD7-Expression (Dooley et al.,

2005). YB-1 wirkt also außerhalb des Herzens inhibitorisch auf die TGF- β_1 / SMAD-Signalkaskade.

Im adulten Kardiomyozyten der Ratte wirkt YB-1 inhibitorisch auf eine TGF- β_1 induzierte Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von YB-1 in Kardiomyozyten der adulten Ratte eine TGF- β_1 induzierte Apoptose hemmt (Parsch, 2009). YB-1 hemmt sowohl frühe Apoptose-Vorgänge, wie die Translokation des Phosphatidylserins, als auch späte Apoptose-Vorgänge wie die Chromatinkondensation unter TGF- β_1 -Stimulation. Eine Inhibierung der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 durch YB-1 wurde von Parsch im Jahre 2009 ausgeschlossen.

Die Wirkung von YB-1 auf die GDF-15-Signalkaskade ist bislang unerforscht.

2.4.6 YB-1: Wechselwirkungen mit AP-1

In HeLa-Zellen ist gezeigt worden, dass YB-1 mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 interagiert und diesen hemmt. Dies führt in HeLa-Zellen zu einer verminderten Expression des AP-1-Ziel-Gens MMP-12 (Samuel et al., 2005). AP-1 spielt eine wichtige Rolle in der Signal-Transduktion der durch PE induzierten Hypertrophie (siehe 2.3.2).

Parsch zeigte im Jahre 2009 in Kardiomyozyten der adulten Ratte, dass eine 48-stündige Überexpression des YB-1-Proteins eine Inhibierung der PE induzierten Hypertrophie hervorruft. Dies wurde durch die Messung der Querschnittsfläche und der Proteinbiosynthese-Rate in Kardiomyozyten nach PE-Stimulation nachgewiesen. Eine Beeinflussung von AP-1 durch YB-1 wurde bisher nicht untersucht.

2.5 Fragestellung

Während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es im Herzen zum Übergang eines adaptiven, hypertrophen Wachstums zur Induktion von Apoptose-Vorgängen. Diesem Prozess liegt unter Anderem eine vermehrte TGF- β_1 -Expression im Herzen zu Grunde. Sowohl in der adaptiven Hypertrophie als auch in der Apoptose-Induktion spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 eine große Rolle. AP-1 ist sowohl an der adrenerg induzierten Hypertrophie-Entstehung als auch an der Apoptose-Induktion durch TGF- β_1 beteiligt. Während AP-1 nach adrenergen Stimuli autark zu einer Hypertrophie des Herzens führt, ist für eine Apoptose-Induktion eine Interaktion mit SMAD-Proteinen nötig. Als Transkriptionsfaktor hat YB-1 Einfluss auf die Expression von an Apoptose- und Hypertrophie-Vorgängen beteiligten Genen. In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass YB-1 einen hemmenden Effekt auf eine TGF- β_1 induzierte Apoptose und – in Langzeitüberexpression – auf eine PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten der adulten Ratte ausübt.

Ziel dieser Arbeit war es mögliche Signalwege, die der Hemmung der durch TGF- β_1 induzierten Apoptose und der durch PE induzierten Hypertrophie zu Grunde liegen, zu erforschen. Dabei sollte evaluiert werden, ob sich eine Überexpression von YB-1 auf die Expression von SMAD-Molekülen und AP-1-Untereinheiten, und somit auf eine Apoptose-Induktion, auswirkt. Weiterhin war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der kurzzeitigen Überexpression von YB-1 auf eine durch PE induzierte Hypertrophie zu untersuchen und sowohl die Transkription als auch die Translation von Signalmolekülen, die eine durch PE induzierte Hypertrophie beeinflussen, unter dem Einfluss der adenoviralen Überexpression von YB-1 zu ermitteln. Um Erkenntnisse über die Spezifität der anti-hypertrophen Wirkung von YB-1 zu erhalten, sollte der Einfluss der kurz- und langzeitigen Überexpression von YB-1 auf einen weiteren hypertrophen Stimulus, nämlich auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie, in Kardiomyozyten untersucht werden. Zielsetzend war außerdem die Etablierung von H9c2-Zellen für eine YB-1 Überexpression, um damit weitergehende Untersuchungen von Apoptose und Hypertrophie-Vorgängen zu ermöglichen.

Durch die Bearbeitung der genannten Fragestellungen sollten Kenntnisse gewonnen werden, welche Zielgene von YB-1 in ihrer Expression verändert werden, die spezifisch für seine anti-apoptotische oder anti-hypertrophe Wirkung sind. Die

Entwicklung einer Herzschwäche basiert letztendlich auf pro-apoptischen und pro-hypertrophen Veränderungen, sodass YB-1 langfristig hier einen therapeutischen Einsatz finden könnte.

3. Material

3.1 Versuchstiere und Zelllinien

3.1.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten verwendet (siehe 4.1.1).

3.1.2 HEK293-Zelllinie

Für die Virusamplifikation wurde die Zelllinie HEK293a von Invitrogen verwendet.

3.1.3 H9c2-Zelllinie

Es wurde eine H9c2-Zelllinie von ECACC (No. 88092904, rat heart myoblast) verwendet, die eine freundliche Gabe von Frau Prof. Dr. Rohrbach aus Gießen war. Es handelt sich hierbei um einen Subklon der originalen Zellklonlinie embryonalen BDIX-Herzgewebes der Ratte.

3.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Rockland, USA
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxisulfat	Roth, Karlsruhe
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Coomassie Brilliant Blue G 250	Merck, Darmstadt
DMEM with high glucose	PAA, Cölbe
DMSO	AppliChem, Darmstadt
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz	Sigma, Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	PAA, Cölbe
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
β -Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
HOECHST Farbstoff 33253	Sigma, Taufkirchen
Horse Serum	Biochrom AG, Berlin

Isoflouran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfat (CuSO_4)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Medium 199 / Earl's Salts	Biochrom, Berlin
MEM with Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natrium-Acetat	Riedel, Hannover
Natrium-Borohydrid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Hydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Carbonat (Na_2CO_3)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Hydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe

Natrium-Kalium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Phosphat monobasic	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Phosphat dibasic x 7 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Pyruvat	PAA, Cölbe
Nonidet P-40	AppliChem, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau-S-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
L-[U- ¹⁴ C]-Phenylalanin	Amersham Biosciences Europe GmbH,
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
SuperSignalRWest Pico	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
Szintillationslösung Ultima-Gold	PerkinElmer, Waltham, USA
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trizol	peQLab, Erlangen
Trypsin	PAA, Cölbe

anti SMAD4 rabbit # 9515	Cell signaling, Danvers, USA
anti Smad7 rabbit # 42-0400	Zymed, Invitrogen, Karlsruhe
anti RGS2 rabbit # sc-9103	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti Vinculin mouse # V9131	Sigma, Taufkirchen
anti Rabbit IgG, HRP-linked # 111-035-003	Dianova, Hamburg
anti Mouse IgG, HRP-linked # 7076	Cell signaling, Danvers, USA
anti Rabbit Cy2-linked	Rockland, USA
Adeno-X Rapid Titer-Kit	Clontech, Mountain View, USA
Dynabeads Protein G	Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen
RT2 SYBR® Green Flour-qPCR-Mastermix	Qiagen, Hilden
Caspase-Glo® 3/7	Promega, Mannheim
Annexin V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit	Bender MedSystems, Vienna, Österreich

3.4 Primer für Real-Time-PCR

Folgende Primer wurden in der Real-Time-PCR (Firma Invitrogen, Karlsruhe) verwendet:

HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	(fw-Primer)
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	(rev-Primer)
B2M	GCCGTCGTGCTTGCCATTC	(fw-Primer)
	CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C	(rev-Primer)
Aktin	GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG	(fw-Primer)
	TGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA	(rev-Primer)
YB-1	TTC GCA GTG TAG GAG ATG GA	(fw-Primer)
	CTA CGA CGT GGA TAG CGT CT	(rev-Primer)
JunB	CGCTCAACCTGGCAGATC	(fw-Primer)
	CTGATCCCTGACCCGAAAAG	(rev-Primer)
JunD	GCAGCATGCTGAAGAAAGACG	(fw-Primer)

	ACTGGATGATCAGCCTTTCC	(rev-Primer)
RGS2	AGC AAA TAT GGG CTT GCT GCA T	(fw-Primer)
	GCC TCT TGG ATA TTT TGG GCA ATC	(rev-Primer)
SMAD4	GTT GCA GAT AGC TTC AGG GC	(fw-Primer)
	TGC TGA AGA TGG CCG TTT TGG TG	(rev-Primer)
SMAD7	AGAGGCTGTGTTGCTGTG	(fw-Primer)
	CATCGGGTATCTGGAGTAAGG	(rev-Primer)

3.5 Puffer, Lösungen und Medien

1 x TAE

Tris-Acetat	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

4 x Lämmli-Puffer

1 M Tris pH 6,8	2,5 ml
Glycerin	2 ml
SDS 20 %	4 ml
DDT	154 mg
Bromphenolblau	1 mg
Aqua dest.	1,5 ml

10 x PBS

KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,09 mM

10 x TBS

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
pH 7,4	

Acrylamid 30 %

Acrylamid	29,2 g
Bisacrylamid	0,8 g
Aqua bidest	Ad 100 ml

Anoden-Puffer B für Immunoblot

Tris, 25 mM	3,36 g
Methanol, 20 %, pH 10,4	
Aqua bidest	Ad 1 l

Anoden-Puffer C für Immunoblot

Tris, 25 mM	30,3 g
6-Aminohexansäure, 40 mM	52,5 g
Methanol, 20 %, pH 9,4	
Aqua bidest	Ad 1 l

Ausplattier- und Waschmedium für isolierte Kardiomyozyten

CCT-Medium	x ml
Penicillin / Streptomycin	2 %
Gentamycin (für Zellkultur > 24 h)	0,1 %

Agarosegel für PCR-Gel-Elektrophorese

Agarose	2,0 g
1 x TAE	Ad 100 ml
Cybr Safe	5,0 µl

Blocklösung für Immunfluoreszenz

1 x PBS	15 ml
BSA	0,75 g

Blocklösung für Immunopräzipitation

0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer	25 ml
Magermilchpulver	1,5 g
TWEEN20	25 µl

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G250	0,1 % (wt / vol)
Methanol 96 %	5, % (vol / vol)
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	10 % (vol / vol)
Aqua bidest	Ad 1 l

CCT-Kulturmedium

M199 / HEPES-Stammlösung	x ml
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM

Dibasische Stocklösung für Immunopräzipitation

Natrium-Phosphat dibasisch heptahydrat	53,65 g
Aqua bidest	Ad 1 l

EDTA-Lösung

NaCl	36,55 g
KCl	0,98 g
KH ₂ PO ₄	0,83 g
MgSO ₄ x / H ₂ O	1,45 g
HEPES	11,9 g
EDTA-Natriumsalz	0,93 g
Aqua bidest	Ad 5 l

Einfriermedium für HEK293-Zellen

Medium für HEK293-Zellen	50 ml
DMSO	2,5 ml

Einfríermedium für H9c2-Zellen

Medium für H9c2-Zellen	50 ml
DMSO	2,5 ml

Erstantikörper-Lösung für Immunoblot (BSA)

BSA	5 g
1 x TBS	100 ml
Tween20	500 µl

Erstantikörper-Lösung für Immunoblot (Magermilch)

Magermilchpulver	5 g
1 x TBS	100 ml
Tween20	500 µl

Immunoblot-Sammelgel

Acrylamid, 30 %	1,675 ml
H ₂ O Millipore	6,75 ml
Tris 1 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS, 10 %	100 µl
APS, 10 %	100 µl
TEMED	40 µl

Immunoblot-Trenngel (10 %)

Acrylamid 30 %	6,6 ml
H ₂ O Millipore	8,4 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	5 ml
SDS, 10 %	200 µl
APS, 10 %	50 µl
TEMED	40 µl

Immunoblot-Laufpuffer

Glycerin	144 g
Tris 1 M	30 g
SDS	10 g
Aqua bidest	Ad 1 l
pH 8,2-8,5	

Kathoden-Puffer A für Immunoblot

Tris, 25 mM	3,03 g
6-Aminohexansäure, 40 mM	5,25 g
Methanol, 20 %, pH 9,4	
Aqua bidest	Ad 1 l

Lämmli-DTT-Gemisch für Immunopräzipitation

1 x Lämmli	500 µl
DTT	15 µl

Lowry-Lösung 1

1 M Natrium-Kalium-Tartrat	3,3 g
Aqua bidest	Ad 100 ml

Lowry-Lösung 2

1 M Kupfersulfat	1,25 g
Aqua bidest	Ad 100 ml

Lowry-Lösung 3

1 M Natrium-Carbonat	25 g
Aqua bidest	Ad 1 l

Lowry-Lösung 4

NaOH, 1N	4 g
Aqua bidest	Ad 100 ml

Lowry-Lösung 5

Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz	22,73 ml
Aqua bidest	Ad 100 ml

Lowry-Reagenz A

Natrium-Kalium-Tartrat (Lowry-Lösung 1)	200 µl
Cu ₂ SO ₄ (Lowry-Lösung 2)	200 µl
Na ₂ CO ₃ (Lowry-Lösung 3)	19,6 ml

Medium für HEK293-Zellen

MEM with Glutamax	450 ml
FCS	50 ml
Penicillin / Streptomycin	5 ml

Medium für H9c2-Zellen

DMEM with high glucose	450 ml
Glutamin, 200 mM	5 ml
Na-Pyruvat, 100 mM	5 ml
Penicillin / Streptomycin	5 ml
FCS	50 ml

Monobasische Stocklösung für Immunopräzipitation

Natrium-Phosphat monobasisch	13,9 g
Aqua bidest	Ad 500 ml

Mowiol Medium zur Einbettung von Coverslips

Mowiol	2,4 g
Glycerol	6,0 g
Aqua bidest.	6,0 ml
0,2 M TRIS pH 8,5	12,0 ml
HOECHST Farbstoff 33253	100 µl

M199 / HEPES-Stammlösung

M199	9,62 g/l
HEPES	15,1 mM
Aqua bidest	Ad 10 l
pH 7,4	

NaOH für Proteinbiosynthese-Rate-Bestimmung

NaOH	40 g
SDS, 10 %	1 ml
Aqua bidest	Ad 1 l

Natrium-Phosphat-Puffer für Immunopräzipitation

Monobasische Stocklösung	57 ml
Dibasische Stocklösung	243 ml
pH 7,4	

Paraformaldehyd (Fixierungslösung für Immunfluoreszenz)

Paraformaldehyd	4 g
1 x PBS	Ad 100 ml

PCR-Auftragspuffer

10 x TAE	5 ml
Glycerin	5 ml
Bromphenolblau	0,5 g

PCR-Marker

100 bp DNA-Marker	5 µl
Bromphenolblau	10 µl
1 x TAE	85 µl

Permeabilisierungslösung für Immunfluoreszenz

1 x PBS	20 ml
Triton x-100	20 µl

Powell-Medium

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

RIPA-Puffer

RIPA-Stocklösung	945 µl
PMSF, 0,1 M	10 µl
EDTA, 0,2 M	5 µl
β-Glycerolphosphat, 1 M	40 µl

RIPA-Stocklösung

Tris, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidect P40	1 %
Desoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %

Stripping-Solution

Tris pH 6,8	62,5 mM
SDS	2 %
β -Mercaptopropandiol	100 mM

Stripping-Waschpuffer

Tris pH 6,8	50 mM
NaCl	150 mM
TWEEN20	0,05 %

TCA für Proteinbiosynthese-Rate-Bestimmung

TCA	10 %
Aqua bidest	90 %

Vorplattiermedium für Kardiomyozyten

CCT-Medium	200 ml
FCS	8 ml
Penicillin / Streptomycin	4 ml

Waschlösung für Immunoblot

Tween20	1 ml
1 x TBS	Ad 1 l

Waschlösung 1 für Immunopräzipitation

Natrium-Phosphat-Puffer	20 ml
TWEEN20	20 µl

Waschlösung 2 für Immunopräzipitation

1 x PBS	50 ml
TWEEN20	50 µl

3.6 Geräte und Laborbedarf

3.6.1 Real-Time-PCR

iCycler	BioRad Laboratories GmbH, München
Thermo-Cycler	Techne LTD, UK
NanoDrop ND - 1000 UV / Spektrophotometer	Nanodrop Technologies, USA
UV-Strata-Linker 2400	Stratagene, USA
Pellet-Pestle-Motor	Kimble Chase, USA
Pellet-Pestle	Kimble Chase, USA
0,2 ml Thermo-Strip (Tubes & Cups)	Thermo Fisher, UK

3.6.2 Immunoblot

Glasplatten	Hoefer, Amersham, USA
Spacer	Hoefer, Amersham, USA
Taschenkämme (Slotkämme)	Hoefer, Amersham, USA
Elektrophorese-Kammer	Hoefer, Amersham, USA
Elektroblot-Kammer	Hoefer, Amersham, USA
Laboflex-Silikon-Schlauch	Kronlab, Dinslaken
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamilton-Spritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman GmbH, Dassel
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
Chemilumineszenz-Messgerät	PeQLab GmbH, Erlangen

3.6.3 Immunopräzipitation

Dynal MPC-S	Dynal A.S., Oslo, Norwegen
Stuart-Rotator SB3	Barloworld Scientific, UK

3.6.4 Immunfluoreszenz

Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus M081
-----------------------	--------------

3.6.5 Querschnittsflächen-Messung

Fluoreszenz-Digitalmikroskop	KEYENCE, Essen
------------------------------	----------------

3.6.6 Proteinsynthese-Rate-Messung

Liquid-Scintillation-Analyzer-Tricarb 2810 TR	PerkinElemer, USA
Szinti-Vials	PerkinElemer, USA
Vial-Sample-Holder-Kit	PerkinElemer, USA

3.6.7 Sonstige Geräte

Aqua bidest-Anlage	Heraeus-Schott GmbH, Hanau
Laborwaage	Mettler Toledo, Schweiz
Magnet-Heizrührer	IKA Works Inc., USA
pH-Meter	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Techne Dri-Block® DB.2D (Thermoblock)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	IKA Works Inc., USA
Sterilbank Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments, Hanau
Millipore-Anlage	Millipore S.A.S., Frankreich
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Vacunsafe Comfort	Integra Biosciences, Schweiz
Vacuboy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Schweiz
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Japan

3.7 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Zellkulturschalen	Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Millipore S.A.S., Frankreich
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbergrecht
Coverslips	Menzel, Braunschweig
Objektträger	Langenbrinck, Emmerdingen
Nagellack	Cosnova, Frankfurt a.M.
24- und 48-Well Platten	Falcon Becton Dickinson, USA
Falcons	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kryotubes	Simport Plastics, Kanada
Zellschaber	Falcon Becton Dickinson, USA
Handschuhe	Ansell Healthcare, Belgien

3.8 Software

Mirosoft Windows 2003	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2003	Microsoft Corp., USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft Corp., USA
BZ Analyser 2008	KEYENCE, Essen
BZ Observation 2008	KEYENCE, Essen
Quantity One 4.3.1	Bio-Rad Laboratories, USA
Magellan 6.6 2009	Tecan, Crailsheim
Analysis for Windows 2002	Soft Imaging System GmbH, Münster

PASW Statistics 18.0

IBM Corp, USA

Quanta Smart 3.0

PerkinElemer, USA

Nanodrop ND-1000 3.5.1

Labview, USA

4. Methoden

4.1 Ventrikuläre Kardiomyozyten in der Zellkultur

4.1.1 Versuchstiere

Es wurden ventrikuläre Kardiomyozyten aus Herzen von drei bis vier Monate alten männlichen Wistar-Ratten präpariert. Die Tiere wiesen bei der Präparation ein Lebendgewicht von 300-400 g auf und stammten aus der Zucht des Physiologischen Institutes in Gießen. Die Tiere wurden im institutseigenen Tierstall herangezogen und sowohl ad libitum gefüttert (Altromin®) als auch mit Wasser getränkt.

4.1.2 Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten

Die Präparation der Herzen und die Isolierung der Kardiomyozyten erfolgten nach der Methode von Schlüter et al. (2005). Powell-Medium wurde in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und zur Stabilisierung des pH-Wertes mit Carbogen begast. Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde mit Powell-Medium gespült und mit 80 ml Powell-Medium luftblasenfrei gefüllt. Die Ratten wurden in einen mit Isofluran gefüllten Glastopf verbracht, bis nach ca. zwei Minuten die vollständige Betäubung erfolgte. Die Ratten wurden durch eine Überstreckung des Rückenmarkes getötet und der Thorax eröffnet. Das Herz und die Lunge wurde zusammenhängend entnommen und in eine mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gefüllte Petrischale gelegt. Das Herz wurde vom Lungengewebe isoliert und mit der danach frei präparierten Aorta ascendenz an einen Glaskanülenaufsatz der Perfusionsanlage angehängt. Nun wurde das Herz zum Herauswaschen des Blutes mit 40 ml Powell-Medium perfundiert; danach wurden 10 ml Kollagenase zum Perfusionsmedium gegeben und das Herz für 30 Minuten bei 37 °C perfundiert (1 Tropfen / Sekunde). Nach dieser Perfusionszeit wurden Aorta und die Atria vom Herz entfernt. Das aus den beiden Ventrikeln bestehende Gewebe wurde auf einem Uhrglas mittig eingeschnitten und mit einem Gewebehacker mit einer Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert. Das entstandene Zellgemisch wurde mit 30 ml Powell-Medium und 10 ml Kollagenase

aus der Perfusionsanlage in einem Reagiergefäß unter ständigem Durchmischen mittels einer Pipette im Wasserbad bei 37 °C mit Carbogen begast und nachverdaut, bis eine Homogenisierung eintrat. Das Zellgemisch wurde nun durch eine Nylongase (Porendurchmesser 200 µm) filtriert und anschließend drei Minuten bei 400 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die übrig gebliebenen Myozyten in 50 ml Powell-Medium und 100 µl CaCl₂ (100 mM) resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 400 UpM für zwei Minuten. Nach dem Absaugen des Überstands wurde den Myozyten 15 ml Powell-Medium und 500 µl CaCl₂ (100 mM) zugegeben. Nun wurden die Myozyten nochmals eine Minute bei 300 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch die genannten Präparationsschritte wurde eine Zellpopulation mit 40-60 % stäbchenförmigen Kardiomyozyten gewonnen.

Alle weiteren Arbeiten an intakten Kardiomyozyten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.1.3 Vorinkubation der Zellkulturschalen

Am Vortag der Präparation wurden Zellkulturschalen mit Vorplattiermedium bei 37 °C im Brutschrank ohne CO₂-Begasung vorinkubiert. Durch das im Vorplattiermedium enthaltene FCS wurde eine optimale Anheftung der Kardiomyozyten an den Schalenboden gewährleistet. Fünf Minuten bevor die Kardiomyozyten in die Schalen verbracht wurden, wurde das Vorplattiermedium abgesaugt.

4.1.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden so schnell wie möglich vom Reagenzglas in ein vorbereitetes Fläschchen mit 37 °C warmem Ausplattiermedium überführt und mit diesem vorsichtig durch Pipettieren und Schwenken vermischt. Hierbei wurden die Kardiomyozyten eines Herzens in 24 ml Medium aufgenommen. Die Kardiomyozyten wurden nun durch vorsichtiges und langsames Pipettieren in die Zellkulturschalen verbracht.

4.1.5 Kultivierung der Kardiomyozyten

Die Zellkulturschalen wurden zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wobei sich die intakten Kardiomyozyten am Schalenboden anhefteten. Nach dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem das in den Schalen vorhandene Ausplattiermedium abgesaugt wurde und das auf 37 °C erwärmte Waschmedium in die Schalen gegeben wurde. Nach leichtem Schwenken der Schalen wurde das Waschmedium abgesaugt und neues Waschmedium in die Schalen gegeben. Durch diesen Waschschrift wurden die nicht anhaftenden Zellen entfernt. Es waren nun ca. 90 % stäbchenförmige Kardiomyozyten vorhanden, die für die nachfolgenden Versuche eingesetzt wurden.

4.2 H9c2- und HEK293-Zellen in der Zellkultur

4.2.1 Ausplattieren der H9c2- und HEK293-Zellen

Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen wurden mit 20 ml Medium für H9c2-, bzw. HEK293-Zellen befüllt. Die in Flüssigstickstoff in Kryotubes aufbewahrten H9c2-, bzw. HEK293-Zellen wurden in 20 ml Medium in einem Falcon aufgenommen und bei 1000 Upm für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde tropfenweise auf der vorbereiteten Zellkulturschale verteilt. Die Schalen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung für ca. zwei Tage inkubiert, dann erfolgte ein Mediumwechsel.

4.2.2 Kultivierung der H9c2- und HEK293-Zellen

Nach mikroskopischer Betrachtung wurden die Schalen bei Erreichen des erwünschten Vermehrungsgrades der Zellen zur weiteren Amplifikation oder Behandlung gesplittet. Dies erfolgte bei H9c2-Zellen immer, bevor sie konfluent wurden, da diese nach Konfluenz Myofibrillen ausbilden und sich in ihren Eigenschaften verändern (siehe Abbildung 6).

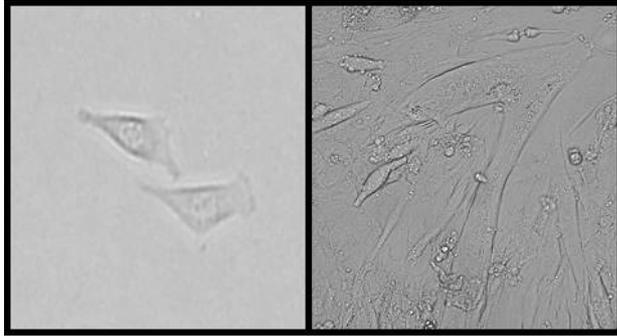


Abbildung 6: H9c2-Zellen vereinzelt (links) und nach Myofibrillen-Bildung (rechts)

Bei HEK293-Zellen erfolgte das Splitten nach Erreichen eines einschichtigen Zellrasens. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und 15 ml EDTA-Lösung auf die Schalen gegeben und wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt um danach zwei ml Trypsin auf die Schalen zu geben und sie ca. fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung zu inkubieren. Hierdurch lösten sich die Zellen sichtbar von der Schale ab. Der Vorgang des Trypsinisierens wurde durch die Zugabe von 10 ml auf 37 °C erwärmten Mediums gestoppt. Dieses Zell-Medium-Gemisch wurde in ein Falcon pipettiert und bei 1000 UpM für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 25 ml Medium resuspendiert. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellanzahl der H9c2-Zellen bestimmt. Die Anzahl der Zellen in vier Quadraten, die wiederum aus 16 mittelgroßen Quadraten bestanden, wurden ausgezählt (siehe Abbildung 7).

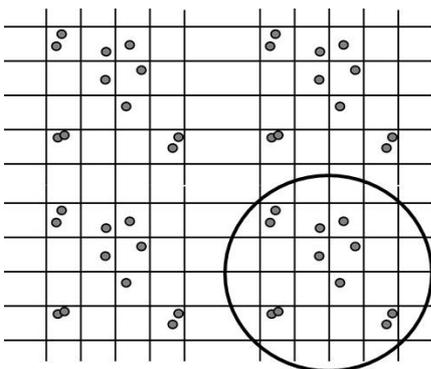


Abbildung 7: Neubauer-Zählkammer zur Auszählung der H9c2-Zellen

Von der Anzahl der in den vier Quadraten enthaltenen Zellen wurde der Mittelwert gebildet. Diese Zahl entsprach einer Zellzahl von $n \times 10^4$ Zellen / ml. Anhand dieser Berechnung wurden 500.000 Zellen auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen, 350.000 Zellen auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 10 ml Arbeitsvolumen, 75.000 Zellen auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit zwei ml Arbeitsvolumen und 30.000 Zellen auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit einem

ml Arbeitsvolumen ausplattiert und für Versuche herangezogen. Alternativ wurden 500.000 Zellen in einem ml Gefriermedium aufgenommen und in Flüssigstickstoff gelagert. Die HEK293-Zellen wurden zur weiteren Vermehrung im Verhältnis 1:5 auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen verteilt, wenn diese zur Amplifikation der Adenoviren (siehe 4.3.1) benötigt wurden. Alternativ wurden HEK293-Zellen in einem ml Gefriermedium aufgenommen und in Flüssigstickstoff gelagert.

4.3 Adenoviren in der Zellkultur

4.3.1 Amplifikation der Adenoviren

Alle Arbeiten mit Verwendung von Adenoviren wurden im S2-Labor unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Amplifikation der Adenoviren wurden HEK293-Zellen auf 25 Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen herangezogen, bis nach mikroskopischer Kontrolle unregelmäßige Zellkontakte entstanden waren. Es wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Schalen mit Adenovirus (AdYB-1 oder AdGFP) infiziert (siehe 4.3.4). Die Schalen wurden mehrmals täglich auf eine beginnende Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale kontrolliert und es wurde entweder dann, bzw. spätestens nach 36 Stunden mit der Virusgewinnung begonnen.

4.3.2 Gewinnung der Adenoviren

Bei beginnendem Ablösen der HEK293-Zellen wurde jeweils der Inhalt von zwei Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen in ein Falcon mit 50 ml Fassungsvermögen verbracht, wobei noch anhaftende Zellen zuvor mit Medium von der Platte gespült wurden. Die Falcons wurden bei 1000 UpM für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde in jedes Falcon ein ml zuvor steril filtriertes 1 x PBS hinzugegeben. Das PBS-Zell-Gemisch wurde mittels einer Pipette gut durchmischt und die Gesamtmenge auf vier große Falcons aufgeteilt. Diese Falcons wurden nun einem Gefrier-Auftau-Zyklus unterworfen, indem sie jeweils für fünf Minuten in Flüssigstickstoff und in ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad verbracht wurden. Dieser Zyklus wurde noch dreimal wiederholt, um die

Zellwände der HEK293-Zellen zu zerstören und das Virus freizusetzen. Der Inhalt der Falcons wurde nun auf 1-ml-Aliquots aufgeteilt und bei 12000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem Falcon zusammengefasst und als Virusstamm-Lösung in Kryotubes aliquotiert.

4.3.3 Titer-Bestimmung der Adenovirus-Stammlösung

Für die Titer-Bestimmung der Adenovirus-Stammlösung wurde das Adeno-X Rapid Titer-Kit von Clontech verwendet. Auf einer Zellkulturschale vom Typ Cellstar® mit 25 ml Arbeitsvolumen wurde ein gleichmäßiger Zellrasen von HEK293-Zellen kultiviert. Diese wurden, wie unter 4.2.2 beschrieben, gewaschen, trypsinisiert und unter einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Eine 24-Well-Platte wurde daraufhin mit 3×10^5 Zellen / Well bestückt und in jedes Well 100 μ l einer zuvor mit 1 x PBS hergestellten Virus-Verdünnung der Virusstamm-Lösung hinzugegeben (siehe Abbildung 8).

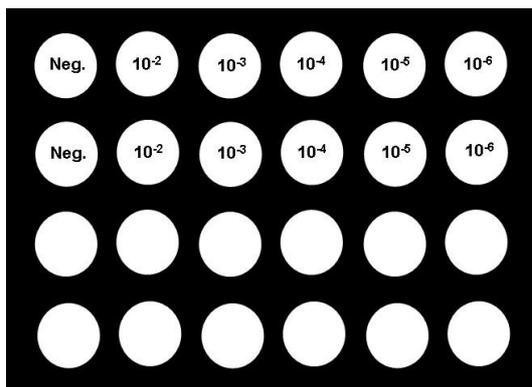


Abbildung 8: 24-Well-Platte zur Titer-Bestimmung der Virusstamm-Lösung, 10^{-2} bis 10^{-6} entspricht der Verdünnung der Virusstamm-Lösung

Die 24-Well-Platte wurde für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Platte fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden 500 μ l eiskaltes Methanol in jedes Well gegeben und die Platte für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Das Methanol wurde abgesaugt und jedes Well dreimal mit 1 x PBS + 1 % BSA gewaschen. Es wurden 250 μ l einer 1:500 Verdünnung des virusspezifischen Mouse-Anti-Hexon-Antikörpers hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und jedes Well dreimal mit 1 x PBS gewaschen, bevor 250 μ l einer 1:500 Verdünnung des Rat-Anti-Mouse-

Antikörpers hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert wurde. Die Lösung wurde abgesaugt und 250 µl DAB-Arbeitslösung (10 x DAB-Konzentrat und 1 x Peroxidase-Puffer im Verhältnis 1:10) hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Arbeitslösung wurde abgesaugt und durch 1 x PBS ersetzt. Nun wurden mikroskopisch in fünf Gesichtsfeldern der höchsten auszählbaren Verdünnungsstufen mittels 20-fach vergrößerndem Objektiv die gefärbten HEK293-Zellen ausgezählt (siehe Abbildung 9) und der Titer (IFU / ml) durch folgende Formel berechnet:

$$\text{IFU / ml} = \frac{\text{Infizierte Zellen / Gesichtsfeld} \times \text{Felder / Schale}}{\text{Virusvolumen} \times \text{Verdünnung}}$$

Vereinfachte Formel:

$$\text{IFU / ml} = \frac{\text{Infizierte Zellen / Gesichtsfeld} \times 640}{\text{Verdünnung}}$$

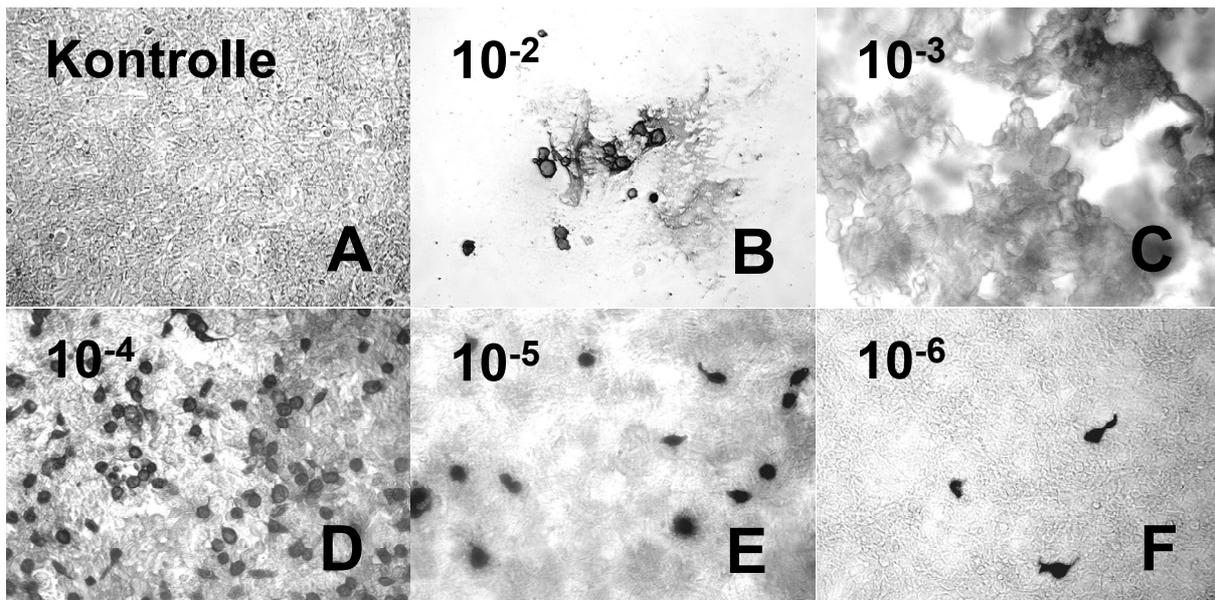


Abbildung 9: Durchlichtbilder einer 24-Well-Platte zur Virustiter-Bestimmung bei 100-facher Vergrößerung. Durch das Virus infizierte HEK293-Zellen sind schwarz angefärbt. (A) Negativkontrolle, hier finden sich keine gefärbten, bzw. infizierten Zellen. (B und C) 10⁻² und 10⁻³ Verdünnung: Ablösung der vollständig infizierten HEK293-Zellen, diese wurden nicht zur Titer-Bestimmung herangezogen. (D und E) Zur Titer-Bestimmung herangezogene Verdünnungsstufen: 10⁻⁴ und 10⁻⁵. (F) Verdünnung von 10⁻⁶ wurde nicht zur Titer-Bestimmung verwendet.

4.3.4 Infektion von Kardiomyozyten, H9c2- und HEK293-Zellen

Die verschiedenen Zelltypen wurden unter sterilen Bedingungen im S2-Bereich mit jeweils 1000 MOI oder 500 MOI / ml Zellen infiziert, indem das Virus direkt in das Medium gegeben wurde und die Schalen leicht geschwenkt wurden.

4.4 Bestimmung der Apoptose- und Nekrose-Rate

4.4.1 Annexin V-FITC / Propidiumiodid / HOECHST 33258-Färbung

Während der frühen Effektorphase der Apoptose findet eine Translokation des Membranbausteins Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite der intakten Zellmembran statt. Dies lässt sich durch das Phospholipid bindende Protein Annexin V nachweisen. In der verwendeten Färbung ist Annexin V mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, FITC (Fluoreszeinisothiozyanat), gekoppelt, der nach Anregung im Fluoreszenz-Mikroskop bei 494-518 nm sichtbar wird. Annexin V ist nicht in der Lage durch eine intakte Zellmembran zu diffundieren. Apoptotische Zellen mit intakter Zellmembran erscheinen somit ausschließlich grünlich fluoreszierend. Um nekrotische Zellen von diesen abzugrenzen, wird ein weiterer Farbstoff, Propidiumiodid, eingesetzt. Propidiumiodid kann nur durch eine zerstörte Zellmembran gelangen, eine nekrotische Zelle erscheint somit bei einer Wellenlänge von 494-518 nm grünlich und bei einer Wellenlänge von 510-550 nm rötlich (siehe Abbildung 10). Um eine Auszählung der Gesamtzellanzahl möglich zu machen, wird HOECHST 33258 hinzugegeben. Dieser Farbstoff gelangt durch eine intakte Membran und färbt Chromatin an. Um intakte, apoptotische und nekrotische H9c2-Zellen zu differenzieren, wurden H9c2-Zellen auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit 1 ml Arbeitsvolumen kultiviert. Die Zellen wurden nach erfolgter Stimulationszeit von vier Stunden mit jeweils fünf µl Annexin V-FITC, Propidiumiodid (20 µg / ml) und HOECHST 33258 (1 mg / ml) angefärbt und zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Am Fluoreszenz-Mikroskop wurden von jeder Bedingung insgesamt 200 Zellen im HOECHST 33258 Filter (340-360 nm) ausgezählt. Diese wurden nach den

oben genannten Kriterien differenziert. Der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde auf die Gesamtzahl bezogen.

	HOECHST 33258	Propidium-iodid	Annexin V-FITC
Intakt	+	-	-
Apoptose	+	-	+
Nekrose	+	+	+

Abbildung 10: Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Annexin V-FITC / Propidiumiodid / HOECHST 33258-Färbung. (+) Anfärbung. (-) Keine Anfärbung.

4.4.2 Kaspase-Assay

Die Aktivitätsbestimmung der Kaspasen 3 und 7 dient als Nachweis der frühen Vorgänge während der Apoptose. Eine Apoptose-Induktion führt zu einer Aktivierung verschiedener Kaspasen im Zytoplasma der apoptotischen Zelle. Die Aktivierung von Kaspasen lässt sich mittels Chemilumineszenz-Messung bestimmen. H9c2-Zellen wurden nach Zellauszählung auf geschwärzten 24-Well-Platten mit durchsichtigem Boden ausplattiert (30000 / Well) und bei 37 °C kultiviert, bis ein gleichmäßiger Zellrasen entstanden war. Es wurde Apoptose induziert und nach erfolgter Stimulationszeit von sechs Stunden das sich auf den Zellen befindende Medium bis auf 100 µl abgesaugt. Es wurden 100 µl des prolumineszenten Kaspase 3 / 7 Substrates in jedes Well gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Substrat enthält eine Tetrapeptidsequenz (DEVD), die von aktivierten Kaspasen gespalten wird. DEVD entlässt Aminoluziferin, dessen Spaltung durch Luziferasen ein chemilumineszentes Signal erzeugt. Durch die Zugabe der Kaspase-Glo 3 / 7-Reagenz werden die Zellen lysiert, und die im Vorgang von Apoptose aktivierten Kaspasen 3 und 7 spalten DEVD. Das erzeugte lumineszente Signal, wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers gemessen. Nach der Messung wurde das Medium-Reagenz-Gemisch in 1,5 ml Reagiergefäße überführt, und jedes Well mit 100 µl 1 x PBS befüllt. Dieses wurde abgenommen und den Reagiergefäßen hinzugegeben. Es folgte eine Protein-Bestimmung nach LOWRY (siehe 4.10.2). Die gemessene Lumineszenz wurde auf die Protein-Gesamtmenge bezogen und die Kaspase-Aktivität berechnet.

4.4.3 HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung

Während der späten Effektorphase der Apoptose findet eine Kondensation des Chromatins statt. Dies lässt sich durch den das Chromatin anfärbenden Farbstoff HOECHST 33258 nachweisen. Um intakte, apoptotische und nekrotische Kardiomyozyten zu differenzieren, wurden Kardiomyozyten auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit einem ml Arbeitsvolumen kultiviert. Nach erfolgter Stimulationszeit von 20 Stunden wurden pro Zellkulturschale fünf μl HOECHST 33258 (1 mg / ml) und fünf μl Propidiumiodid (20 μg / ml) zugesetzt und nach 10-minütiger Inkubation unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. HOECHST 33258 ist ein zellmembrangängiger Farbstoff, der das Chromatin der Zellkerne bei Anregungswellen von 340-360 nm blau färbt. In intakten Kardiomyozyten sind somit längliche, blau angefärbte Zellkerne zu erkennen, wohingegen in apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten abgerundete Kerne zu sehen sind (vergleiche Abbildung 11). Propidiumiodid hingegen kann nur durch eine geschädigte, nicht mehr intakte Zellmembran gelangen, färbt also ausschließlich die abgerundeten Kerne nekrotischer Kardiomyozyten bei 510-550 nm rot an. Es wurden bei 200-facher Vergrößerung mehrere zufällig ausgewählte Gesichtsfelder betrachtet und hierbei insgesamt 200 Kardiomyozyten im Durchlicht ausgezählt. Diese wurden nach den oben genannten Kriterien differenziert. Der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde auf die Gesamtzahl bezogen.

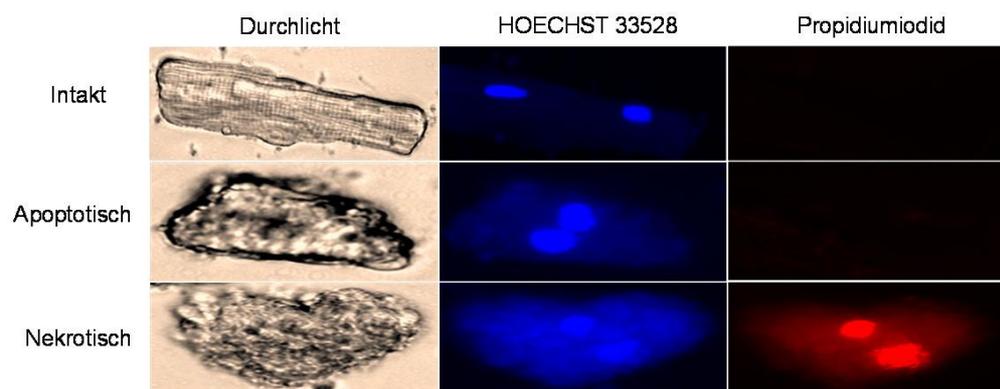


Abbildung 11: Differenzierung von intakten, apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten mittels einer HOECHST 33528 / Propidiumiodid-Färbung.

4.5 Bestimmung von Hypertrophie-Parametern

4.5.1 Querschnittsflächen-Messung

Die Bestimmung der Querschnittsfläche (Cross Sectional Area) von Kardiomyozyten diente der Erfassung von hypertrophem Zellwachstum. Kardiomyozyten wurden auf Zellkulturschalen vom Typ Cellstar® mit einem ml Arbeitsvolumen kultiviert und mit Adenoviren und verschiedenen pro-hypertrophen Stimuli inkubiert, wobei jeweils eine Zellkulturschale eine Bedingung darstellte. Nach der gewünschten Stimulationszeit wurden pro Schale 50 Kardiomyozyten mittels eines Digital-Mikroskops und der BZ Observation-Software® bei 200-facher Vergrößerung fotografiert. Jeder Kardiomyozyt wurde mittels der BZ Analyser-Software® an dessen breitester Stelle vermessen (siehe Abbildung 12). Die Querschnittsfläche wurde mittels nachfolgender Formel berechnet: Querschnittsfläche = Radius² x π



$$\text{Querschnittsfläche} = (\text{Radius})^2 \times \pi$$

Abbildung 12: Vermessung der Querschnittsfläche mittels eines Digital-Mikroskops.

4.5.2 Proteinbiosynthese-Rate-Messung

Die Proteinbiosynthese-Rate ist unter hypertrophem Wachstum erhöht. Ihre quantitative Bestimmung diente deshalb der Erfassung von hypertrophem Wachstum. Kardiomyozyten wurden auf 6-Well-Platten mit einem ml Arbeitsvolumen kultiviert und mit einer radioaktiv markierten Aminosäure, ¹⁴C-Phenylalanin, einem hypertrophen Stimulus und dem Adenovirus inkubiert. Die zur Verfügung gestellte Aminosäure wurde unter hypertrophem Wachstum in die neu entstehenden Proteine eingebaut. Die Menge der radioaktiv markierten Aminosäure wurde mittels eines Beta-Counters gemessen.

Den Kardiomyozyten wurde im Dreifachansatz zuerst das Adenovirus für die gewünschte Zeit und dann 0,1 μCi ^{14}C -Phenylalanin zusammen mit dem hypertrophen Stimulus zugegeben. Um einen Einbau der markierten Aminosäure zu garantieren, wurden die Kardiomyozyten 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, um nicht eingebaute markierte Aminosäuren zu entfernen und die Wells zweimal mit jeweils einem ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen, bevor pro Well 1 ml 10 %ige Trichloressigsäure zugegeben wurde. Hierdurch wurde eine Protein-Präzipitation erreicht. Die Platten wurden nun 24 h bei 4 °C inkubiert. Vom Überstand ($\text{CPM}_{\text{Überstand}}$) wurden nun aus jedem Well 500 μl in ein Vial gegeben, das vorher mit vier ml Szintillationslösung befüllt worden war. Die Vials wurden verschlossen, geschwenkt und in die Recks des Beta-Counters gestellt. Die Wells wurden zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml 1 N NaOH / 0,01 % SDS pro Well behandelt, um die Kardiomyozyten zu lysieren. Die Platten wurden bei 37 °C für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Vom Lysat wurden nun aus jedem Well 500 μl in ein Vial gegeben, das vorher mit vier ml Szintillationslösung befüllt worden war. In diesem Lysat ($\text{CPM}_{\text{Zellen}}$) befanden sich nun die radioaktiv markierten Aminosäuren, die zuvor in Proteine eingebaut worden waren. Die Vials wurden verschlossen, geschwenkt und in die Recks des Beta-Counters gestellt und die Messung aller Proben begonnen. Die Messung erfolgte in Counts per Minute (CPM); hieraus ließ sich die eingebaute Menge an radioaktiv markiertem Phenylalanin ermitteln.

Mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde nun die Protein-Gesamtmenge nach Bradford bestimmt (Noble et al, 2009). Die Farbintensität dieses Farbstoffes ist von der Protein-Konzentration abhängig, da dieser mit Proteinen Komplexe bildet. 10 μl des Proben-Überstandes wurden im Doppelansatz in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Als Bezugswert diente eine Standard-Verdünnungsreihe von BSA in 0,01 % SDS / 1 N NaOH (wt / vol) in den Konzentrationen 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg / ml. Hiervon wurden 10 μl in jeweils ein Well pipettiert. Jedem Well wurden 200 μl Bradford-Reagenz zugegeben. Im Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die Protein-Konzentrationen der Proben wurden nun mittels einer Standardgerade errechnet.

Die Proteinbiosynthese-Rate / μg Protein errechnete sich wie folgt:

$(\text{CPM}_{\text{Zellen}} / \text{CPM}_{\text{Überstand}}) / (\text{Protein-Konzentration } (\mu\text{g} / \text{ml}))$.

4.6 Immunfluoreszenz

Durch das Verfahren der Immunfluoreszenz können Proteine mittels Antikörpern sichtbar gemacht und ihr Vorkommen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle (Nukleus, Zytoplasma) bestimmt werden. Bei der hier angewandten indirekten Immunfluoreszenz wurde H9c2-Zellen ein für das gesuchte Protein spezifischer Primärantikörper zugesetzt. Danach wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper hinzugegeben. Der Sekundärantikörper war mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und konnte somit mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden.

H9c2-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen auf Glasplättchen (Coverslips) ausplattiert und kultiviert. H9c2-Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt und mit Adenoviren infiziert. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit je einem ml 1 x PBS gewaschen und mit je einem ml 4 % Paraformaldehyd für 30 Minuten inkubiert, um sie zu fixieren. Die Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen und, um eine Permeabilisierung zu erreichen, mit je einem ml 1 x PBS / 0,1% Triton x-100 für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen mit einer Blocklösung (1 x PBS / 5 % BSA) für eine Stunde inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Coverslips aus der Schale genommen und in den jeweiligen mit Parafilm ausgelegten Deckel gelegt. Hierauf wurden 300 μl einer 1:100-Verdünnung des Primärantikörpers gegeben und die Zellen eine Stunde inkubiert. Die Coverslips wurden in die Schalen zurück überführt und dreimal für 15 Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Die Coverslips wurden wiederum in die mit Parafilm ausgekleideten Deckel gelegt und mit 300 μl einer 1:1000-Verdünnung des Sekundärantikörpers für 45 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem 15-minütigem Waschen mit 1 x PBS wurden die Coverslips mit einem Fön getrocknet und mittels eines Einbett-Mediums auf Objektträger überführt. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und abfotografiert. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz in den verschiedenen Zellkompartimenten erfolgte mittels der BZ Analyser[®]-Software.

4.7 Quantitative Real-Time-PCR

4.7.1 RNA-Isolierung aus ventrikulären Kardiomyozyten und H9c2-Zellen

Kardiomyozyten und H9c2-Zellen wurden nach erfolgter Stimulationszeit mit einem sterilen Zellschaber von der Zellkulturschale geschabt und zusammen mit dem Medium in ein Falcon überführt. Dieses wurde drei Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in einem ml 1 x PBS aufgenommen und mit diesem gemischt. Dieses Gemisch wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt, nochmals bei 3000 Upm für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde nun mit 500 µl Trizol mit einem Pestler gemischt und für drei Minuten gevortext, um die Zellen zu lysieren, RNAsen zu inaktivieren und DNA und Proteine zu denaturieren. Nun wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben, um eine Extraktion der Nukleinsäuren durch eine Phasentrennung zu erreichen. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 UpM und 4 °C enthielt die obere Phase nun vorwiegend RNA. Die obere Phase wurde in ein neues zuvor UV bestrahltes 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die gleiche Menge Isopropanol hinzugegeben, um die RNA zu präzipitieren. Um die RNA-Präzipitation zu fördern, wurden die Proben über Nacht bei -20 °C inkubiert. Dann wurden die Proben bei 12000 UpM und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nun 500 µl 70 %iges Ethanol in jedes Reagiergefäß gegeben und nochmals bei 12000 UpM und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert um weitere Salze herauszulösen. Der Überstand wurde verworfen und die Reagiergefäße getrocknet. Das entstandene RNA-Pellet wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und eine Stunde auf Eis gelöst.

4.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels des NanoDrop ND-1000 UV-Spektrophotometers. Das Gerät wurde zu Beginn mit Aqua bidest. geeicht, bevor jeweils 1,5 µl der Probe auf den Messpunkt gegeben wurde. Die errechnete Menge entsprach $n = x \text{ ng} / \mu\text{l}$. Hieraus konnte nun die benötigte Menge zur cDNA-Herstellung errechnet werden.

4.7.3 Gel-Elektrophorese der RNA-Proben

Ribosomale RNA kann mittels einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Bei Vorliegen von intakter ribosomaler RNA erscheinen zwei deutliche Banden (28S- und 18S-rRNA-Banden)(siehe Abbildung 13). Um die Qualität der erhaltenen RNA zu beurteilen, wurden fünf μg der gelösten RNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Agarosegels wurden zwei g Agarose auf 100 ml 1 x TAE aufgefüllt und aufgekocht. Das Agarosegel wurde auf 80 °C abgekühlt und fünf μl SYBRsafe[®] hinzugegeben. Das Gel wurde nun in eine Vorlage gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nachdem das Gel fest war wurde der Kamm aus dem Agarosegel herausgezogen. Das Gel wurde in der Vorlage in eine Elektrophorese-Kammer gestellt und diese mit 1 x TAE aufgefüllt. Die RNA-Proben wurden mit jeweils 1,5 μl Auftrags-Puffer gemischt und dann in die entstandenen Gel-Taschen gefüllt. In die erste Gel-Tasche wurde ein 100 bp DNA-Marker gefüllt. Um eine Auftrennung der Proben nach Größe in Basenpaaren zu erreichen, wurde die Kammer nun für 30 Minuten an 90 Volt angeschlossen. Das Gel mit den aufgetrennten RNA-Fragmenten wurde nun unter UV-Licht ($\lambda = 320\text{nm}$) zur Fluoreszenz gebracht und fotografiert. Die Fluoreszenzmaxima des verwendeten Fluoreszenzmittels (SYBRsafe[®]) liegen bei 280 und 502 nm.

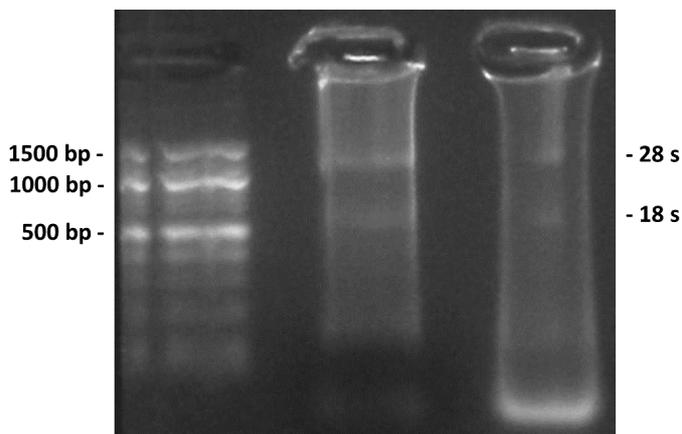


Abbildung 13: Ergebnis der Gel-Elektrophorese isolierter RNA. Links: 100 bp Marker, Mitte: Intakte RNA (28S- und 18S-rRNA-Banden), Rechts: RNA-Bruchstücke (unten)

4.7.4 DNase-Behandlung und Erstellung von cDNA

Um Rest-DNA zu entfernen und die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das Quanti Tect Reverse-Transcription-Kit[®] verwendet. Hierfür wurde für jede Probe ein neues

1,5 ml Reagiergefäß im UV-Stratalinker bestrahlt und je zwei µl gDNA-Wipout-Buffer hinzu gegeben. Hinzu kam jeweils ein µg der Probe (x µl) und Aqua bidest (12-x). Dieses wurde 5 Minuten bei 42 °C im Thermo-Cycler inkubiert. Nun wurden zu jeder Probe jeweils 1 µl Reverse Transkriptase, vier µl 5 x RT-Buffer und ein µl RT-Primer-Mix gegeben, so dass in jedem Reagiergefäß ein Gesamtvolumen von 20 µl zugegen war. Die Proben wurden bei 42 °C für 15 Minuten und anschließend bei 95 °C für drei Minuten im Thermo-Cycler inkubiert und bei -80 °C eingefroren.

4.7.5 Aktin-PCR und Gel-Elektrophorese

Um zu überprüfen, ob die vorangegangene DNase-Behandlung und cDNA-Herstellung erfolgreich und somit keine genomische DNA in den Proben zurückgeblieben war, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit dem Housekeeping-Gen Aktin durchgeführt. Es wurden Primer verwendet, die in zwei durch ein Intron getrennten Exons lagen. Die reine RNA ergibt nach cDNA-Synthese ein DNA-Fragment, das nur aus den beiden Exon-Sequenzen besteht. Liegt auch genomische DNA vor, wird das Intron mit umgeschrieben. Dies ergibt in der PCR ein zweites, größeres Fragment (siehe Abbildung 14).

Es wurden jeweils 1,5 µl der synthetisierten cDNA in ein zuvor UV-bestrahltes Reagiergefäß gegeben und jeweils folgende Substanzen zugesetzt:

10 x PCR-Buffer	1 µl
Aqua bidest.	5,8 µl
Aktin-Primer (100 µmolar)	0,3 µl
dNTPs (10 µmolar)	0,4 µl
MgCl ₂ (50 mmolar)	0,3 µl
1 % W1	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Die Proben wurden abzentrifugiert und eine Aktin-PCR mit folgenden Zyklen gestartet:

1. 93 °C 5 Minuten
2. 60 °C 3 Minuten

3. 72 °C 3 Minuten
4. 93 °C 1 Minute
5. 60 °C 1 Minute
6. 72 °C 3 Minuten

Wiederholung von Zyklus 4., 5. und 6.: 20 x

7. 72 °C 15 Minuten

Die Proben wurden wie unter 4.7.2 beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen und nach einer Aufnahme unter UV-Licht beurteilt.

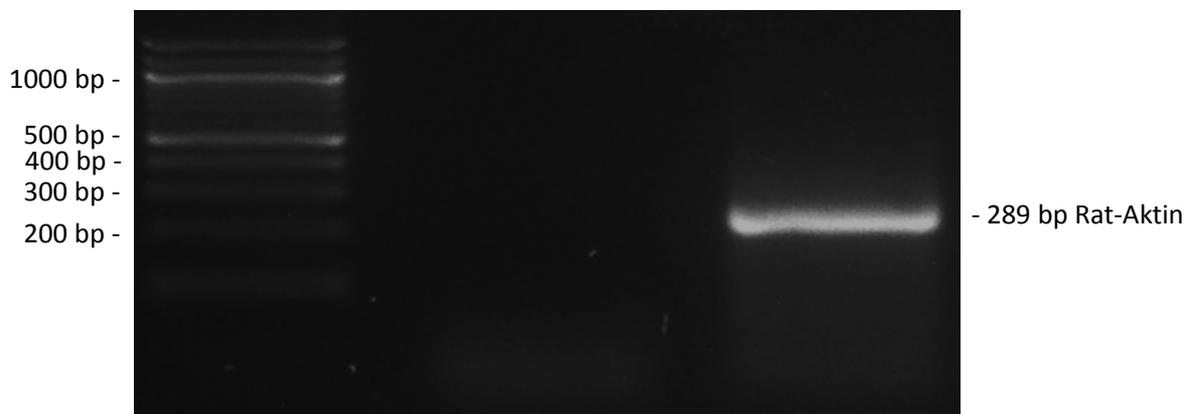


Abbildung 14: Ergebnis der Aktin-Gel-Elektrophorese. Links: 100bp Marker, Mitte: Probe ohne Aktin, Rechts: Probe mit Aktin-Bande

4.7.6 Real-Time-PCR

Bei der hier verwendeten Real-Time-PCR wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase ein gewünschter DNA-Abschnitt der zuvor hergestellten cDNA exponentiell amplifiziert. Das Prinzip der Real-Time-PCR basiert auf sich wiederholenden Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Denaturierung erfolgt durch das Erhitzen auf 95°C; danach wird die Temperatur auf die für den Primer spezifische Annealingtemperatur gesenkt, so dass sich die Primer an die cDNA anlagern. Durch das folgende Erhitzen auf 72 °C wird nun die Primer-Sequenz verlängert (Elongation), bis ein Duplikat entstanden ist. Es kommt nach jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der Produktmenge (exponentielle Vermehrung), bevor es nach einer bestimmten Zyklenzahl zu einer Verlangsamung der Reaktion und somit zum sogenannten Plateau-Effekt kommt (vergleiche Abbildung 15). Die Menge des entstandenen Produktes lässt sich bestimmen, da der Proben-DNA der Cyanin-

Farbstoff SYBR FAST qPCR Master-Mix[®] zugesetzt wurde. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er sich in doppelsträngige DNA einlagert; dies wird nach jedem Zyklus gemessen. Um eine genaue Differenzierung zwischen gesuchten Produkten und anderen unspezifischen Produkten zu erreichen, wurde am Ende der PCR die Proben temperatur schrittweise um 1 °C bis auf 90 °C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, denaturiert die gesuchte DNA bei einer spezifischen Temperatur (Schmelztemperatur), wobei sie ihren gesamten Fluoreszenz-Farbstoff frei gibt. Dies führt zu einem abrupten Abfall des gemessenen Signals. Die Schmelztemperatur ist von der Produktlänge und der Basenzusammensetzung abhängig, wodurch sich das gesuchte Produkt von Primerdimeren oder unspezifischen Produkten abgrenzen lässt.

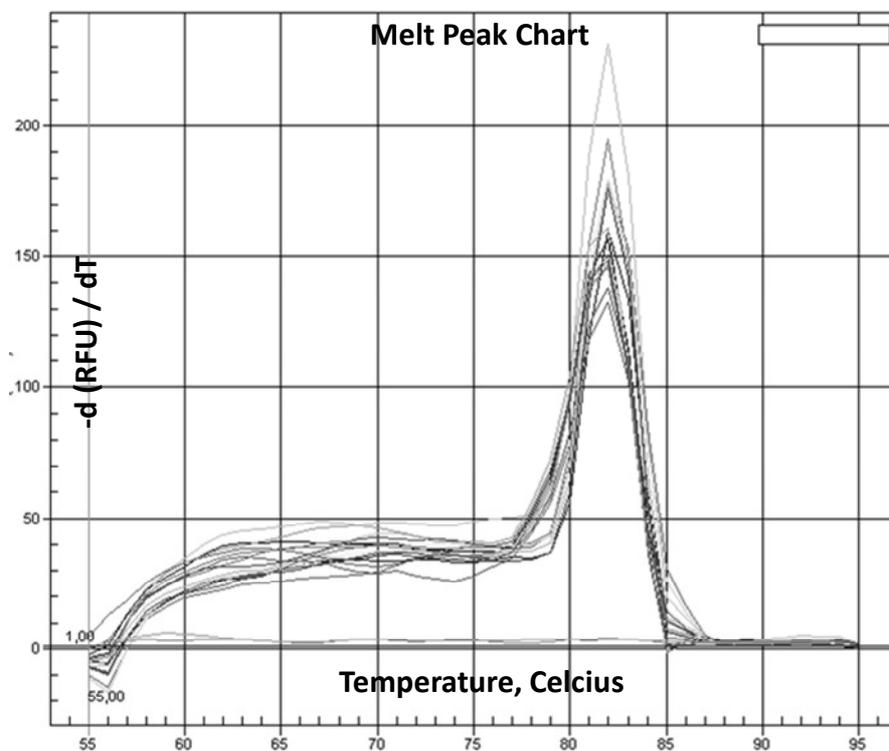


Abbildung 15: Schmelzkurve von acht Proben (Doppelansatz), bei denen dasselbe Produkt (hier YB-1-cDNA) gebildet wurde. Der Peak liegt bei allen Proben bei 83 °C.

4.7.6.1 PCR-Ansatz für Real-Time-PCR

Die hergestellte cDNA wurde mit Aqua bidest 1:10 verdünnt eingesetzt und von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden zwei µl cDNA mit 18 µl PCR-Mix versehen, der sich wie folgt zusammensetzte:

		Methoden
PCR-Mix pro Ansatz:	KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	10 µl
	Forward-Primer	0,6 µl
	Reverse-Primer	0,6 µl
	Aqua bidest	6,8 µl

4.7.6.2 Real-Time-PCR-Laufprogramme

Die Real-Time-PCR wurde in einem Icyler[®] (Fa. BioRad[®]) durchgeführt.

Zyklus 1: (1 x)

95 °C für 3 Minuten

Zyklus 2: (45 x)

95 °C für 30 sek (Denaturierung)

x °C für 30 sek (Annealing)

72 °C für 30 sek (Amplifikation)

Zyklus 3: (100 x)

50 °C-100 °C je 10 sek (Schmelzkurve)

4.7.6.3 Auswertung der Real-Time-PCR

Die erhaltenen Daten wurden nach der Methode von Pfaffl et al. (2001) quantifiziert. Die relative Expression eines Gens wird mit der Expression eines Referenz-Gens (Housekeeping-Gen) verglichen. Ein Housekeeping-Gen muss in den untersuchten Zellen vorliegen und darf unter den Versuchsbedingungen nicht reguliert werden. Bei Kardiomyozyten diene hierfür B2M, bei H9c2-Zellen HPRT, da B2M in H9c2-Zellen nicht exprimiert wird. Das Fluoreszenz-Signal muss einen Schwellenwert (Threshold) übertreffen, um vom Hintergrund differenziert werden zu können. Erst nach einigen Amplifikationszyklen ist die DNA-Konzentration so hoch, dass das entstehende Fluoreszenz-Signal detektiert werden kann. Der Schwellenwert wird so festgelegt, dass der Schnittpunkt des Thresholds mit der Kurve möglichst im Bereich der exponentiellen DNA-Verdopplung liegt (siehe Abbildung 16). Dieser Schnittpunkt wird Ct-Wert genannt und gibt die Zyklenanzahl wieder, bei der der Schwellenwert

erreicht wurde. Je kleiner der Ct-Wert, desto mehr DNA war zu Beginn der Reaktion vorhanden.

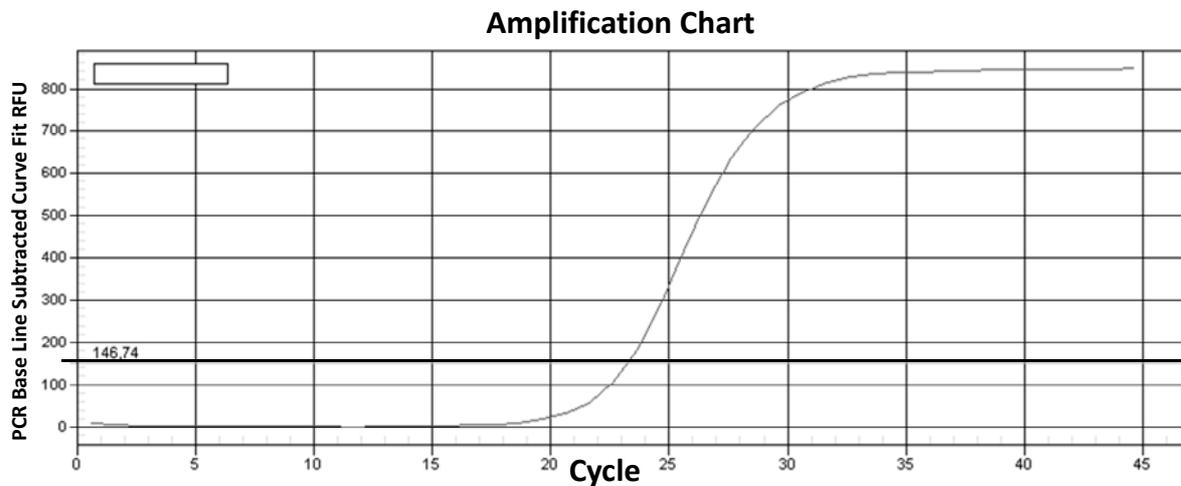


Abbildung 16: Fluoreszenz-Verlauf einer Probe während der Real-Time-PCR. Der Schnittpunkt des Schwellenwerts (hier: 146,74) mit der Kurve ergibt den Ct-Wert (hier: 23,8) der Probe.

Von der Doppelbestimmung jeder Probe wurde der Mittelwert der Ct-Werte errechnet und dieser dann in Beziehung zum Mittelwert der Ct-Werte des Housekeeping-Gens gesetzt und die relative Expression berechnet:

$$\Delta Ct (\text{Ziel-Gen}) = Ct (\text{Ziel-Gen}) - Ct (\text{Housekeeping-Gen})$$

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

4.8 Immunopräzipitation

Mittels der Methode der Immunopräzipitation wird ein bestimmtes Protein mitsamt seinen Interaktionspartnern aus einem Protein-Gemisch präzipitiert. Der Vorgang ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

Hierfür wurden H9c2-Zellen kultiviert und mittels RIPA-Puffer geerntet (siehe 4.10.1). Die Protein-Menge wurde nach LOWRY (siehe 4.10.2) bestimmt und jede Proben auf drei Fraktionen mit jeweils 450 µg Protein-Gehalt aufgeteilt. Für jede zu untersuchende Probe wurden sechs µl mit IgG beschichtete Dynabeads (metallische Mikropartikel) in ein Reagiergefäß gegeben. Die Reagiergefäße wurden nun in einen magnetischen Ständer (Dyna) verbracht, wodurch sich die Dynabeads an der zum Ständer gerichteten Wand des Reagiergefäßes anlagerten. Nun konnte die Flüssigkeit abpipettiert und verworfen werden. Pro Reagiergefäß wurden 500 µl

Natrium-Phosphat-Puffer hinzugegeben und die Dynabeads nun drei Minuten bei 20 UpM auf einem Stuart-Rotator gewaschen. Die Reagiergefäße wurden in den Magnetständer gestellt und der Puffer abpipettiert, wobei die Dynabeads im Reagiergefäß zurück blieben. Dieser Vorgang wurde noch dreimal wiederholt. Nun wurde der Antikörper für das gesuchte Protein, bzw. unspezifisches IgG, in einer 1:50-Verdünnung zu den Dynabeads gegeben und mit Natrium-Phosphat-Puffer auf 150 µl aufgefüllt. Die Proben, die als Kontrolle dienten, wurden ohne Antikörper und IgG inkubiert. Sie wurden mit 150 µl Natrium-Phosphat-Puffer aufgefüllt. Eine Übersicht über die Proben-Behandlung gibt Abbildung 17.

	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	TGF-β ₁	TGF-β ₁	TGF-β ₁
Antikörper	-	-	+	-	-	+
IgG	-	+	-	-	+	-
Dynabeads	+	+	+	+	+	+

Abbildung 17: Pipettierschema für die Durchführung einer Immunopräzipitation. Die Proben wurden jeweils auf drei Fraktionen mit 450 µg Protein-Gehalt aufgeteilt und wie dargestellt behandelt.

Die Reagiergefäße wurden für 110 Minuten auf den Stuart-Rotator verbracht und die Proben dort drehend mit der Antikörper- / IgG-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper- / IgG-Lösung, bzw. der Natrium-Phosphat-Puffer wurde auf dem Magnetständer abpipettiert und verworfen. Alle Reagiergefäße wurden mit 150 µl Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Stuart-Rotator drehend inkubiert. Die Blocklösung wurde auf dem Magnetständer abpipettiert und jedes Reagiergefäß insgesamt viermal mit der Waschlösung 1 für jeweils drei Minuten bei Raumtemperatur auf dem Stuart-Rotator drehend inkubiert und die Waschlösung abpipettiert. Es wurde nun die vorher nach LOWRY bestimmte Protein-Menge in die Reagiergefäße gegeben und diese dann mit Natrium-Phosphat-Puffer auf jeweils 500 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden zwei µl PMSF (0,1 M) gegeben. Die Proben wurden bei vier °C über Nacht auf dem Stuart-Rotator drehend inkubiert.

Der Überstand wurde auf dem Magnetständer abpipettiert und als Überstandskontrolle weggefroren. Die Proben wurden viermal mit der Waschlösung 2 für drei Minuten bei Raumtemperatur auf dem Stuart-Rotator drehend gewaschen und die Waschlösung auf dem Magnetständer abpipettiert. Nun wurden 45 µl Lämmli

+ 1,5 µl DTT (0,5 M) in jedes Eppi gegeben und 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Der Überstand wurde auf dem Magnetständer abpipettiert und weggefroren. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, so dass eine Proben-Menge von insgesamt 90 µl erhalten wurde.

Die Proben wurden auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 4.10.3) und ein Immunoblot durchgeführt (siehe 4.10), wobei ein gegen den gesuchten Interaktionspartner gerichteter Antikörper verwendet wurde.

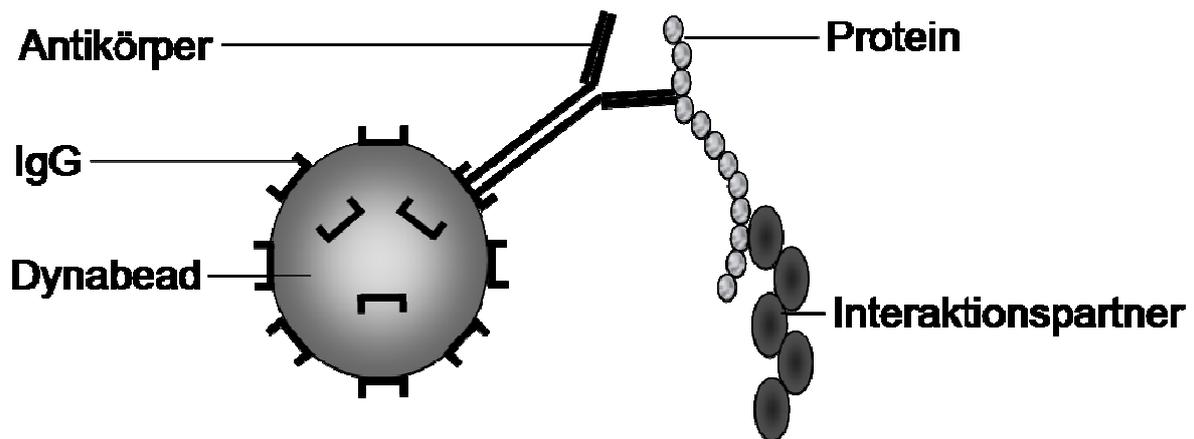


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Vorgänge während einer Immunopräzipitation: Das metallische Partikel (Dynabead) ist mit IgG-Molekülen beschichtet, die die Fc-Region des Antikörpers erkennen und diese binden. Der für das gesuchte Protein spezifische Antikörper bindet das gesuchte Protein (z. B. SMAD2) und gleichzeitig gebundene Interaktionspartner (z.B. P-SMAD3), die im Immunoblot detektiert werden können.

4.9 Immunoblot

4.9.1 Isolierung von Gesamtprotein mittels RIPA-Puffer

Nach Kultivierung und Stimulation der Kardiomyozyten, bzw. H9c2-Zellen wurden selbige zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des 1 x PBS wurden in jede Schale 150 µl RIPA-Puffer gegeben und die Schalen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und das entstandene RIPA-Zell-Gemisch in jeweils ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben. Die Proben wurden nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um danach bei 12000 UpM bei 4 °C für 30

Minuten zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde jeweils in ein frisches 1,5 ml Reagiergefäß überführt und das entstandene Zellpellet verworfen.

4.9.2 Protein-Mengen-Bestimmung nach LOWRY

Um die Protein-Menge jeder einzelnen Probe zu bestimmen, wurde ein LOWRY-Assay durchgeführt (Noble et al, 2009). Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe aus BSA in Aqua bidest hergestellt (0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg / ml). Darauf wurde in neue Reagiergefäße jeweils zusammen gegeben:

Standardreihe:	10 µl Proben-Puffer (z.B. RIPA)
	50 µl Standard-Verdünnungsreihe
	50 µl Lösung 4
	500 µl Reagenz A
Proben-Bestimmung:	10 µl Probe
	50 µl Aqua bidest
	50 µl Lösung 4
	500 µl Reagenz A

Die Reagiergefäße wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde allen Reagiergefäßen 100 µl Lösung 5 zugegeben und die Reagiergefäße bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Hierauf folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 UpM. Aus jedem Reagiergefäß wurden 200 µl in eine 96-Well-Platte gegeben (Doppelansatz) und die Protein-Konzentration im Mikrotiterplatten-Photometer bei 578 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe ließ sich eine Standardgerade ermitteln, mit der die einzelnen Protein-Konzentrationen berechnet wurden:

$$\text{Protein-Menge (mg / ml)} = \frac{\text{MW (Absorption der Proben)} - \text{Achsenabschnitt (Standardgerade)}}{\text{Steigung (Standardgerade)} \times 5 \text{ (Verdünnungsfaktor)}}$$

4.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ist es möglich, Proteine mittels eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden die Proben durch Verdünnung mit RIPA-Puffer auf dieselbe Protein-Konzentration eingestellt. Es wurden jeweils 45 µl der Proben mit 15 µl 4 x Lämmli-Puffer und 1,5 µl DTT (0,5 M) gemischt und bei 95 °C 10 Minuten aufgekocht. DTT wird zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen zugegeben. Das im Gel enthaltene SDS (Sodiumdodecylsulfat) zerstört die Tertiärstruktur der Proteine und bindet die Hauptketten des Proteins, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht. Dieser ist stark negativ geladen und wandert im elektrischen Feld in Richtung Anode, die positiv geladen ist. Die negative Ladung ist hierbei der Masse des Proteins proportional. Für die Gel-Elektrophorese wurde die diskontinuierliche Methode nach Lämmli angewendet, wobei das verwendete Polyacrylamid-Gel aus zwei Gelen, dem Trenn- und dem Sammelgel, unterschiedlicher Zusammensetzung besteht. Um das Gel in eine Form zu bringen, wurde, wie in Abbildung 19 dargestellt ist, zunächst aus zwei Glasplatten, zwei Plastikspacern, einem Gummischlauch und mehreren Klammern eine Glasvorlage zusammengebaut, in die die Gele gegossen wurden (Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels siehe 3.5). Zunächst wurde das Trenngel in die Glasvorlage gegossen und mit Wasser überschichtet. Das Trenngel polymerisierte nach 30 Minuten aus. Das Wasser wurde abgegossen und das Sammelgel in die Glasvorlage gegeben und sofort luftblasenfrei der Gelkamm eingesteckt.

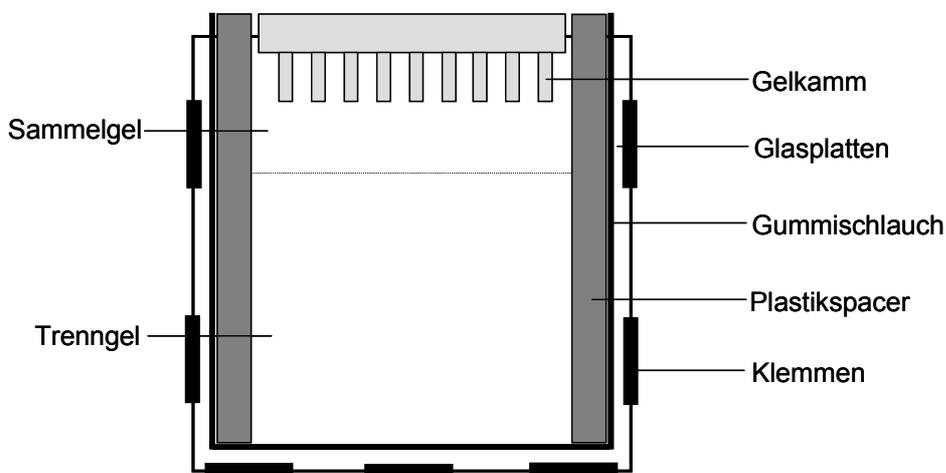


Abbildung 19: Zusammenbau der Glasvorlage für SDS-Page

Das Sammelgel war nach 20-minütiger Auspolymerisationszeit fest und so konnte die Glasvorlage mit dem Gel nach Entfernung des Gummischlauchs in die Elektrophorese-Kammer gestellt werden. Diese wurde mit 1 x Laufpuffer befüllt und der Gelkamm entfernt. Die entstandenen Gel-Taschen wurden nun mittels einer Hamilton-Spritze mit 1 x Laufpuffer gespült und danach die Proben eingefüllt, wobei in die erste Tasche 20 µl eines Molekulargewichtsmarkers gefüllt wurde. Durch die Anlegung einer Spannung von 200 Volt wurde nun ein elektrisches Feld erzeugt. Das Sammelgel besitzt größere Poren, wodurch die Moleküle ohne Auftrennung gleichmäßig bis zum Trenngel wanderten, in dem nun die elektrophoretische Auftrennung nach Molekül-Größe erfolgte.

4.9.4 Blot-Verfahren

Mit der Immunoblot-Technik können Proteine von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran übertragen werden. Dieses wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden Filterpapiere zurecht geschnitten, mit den verschiedenen Puffern getränkt und in der befeuchteten Blot-Kammer sandwichartig mit der Nitrocellulose-Membran und dem Acrylamid-Gel geschichtet (siehe Abbildung 20). Bei der Schichtung wurde darauf geachtet, dass alle Luftblasen entfernt wurden, da diese die elektrische Übertragung stören. Die Blot-Kammer wurde für zwei Stunden an eine Stromstärke von 1,5 mA / cm² angeschlossen.

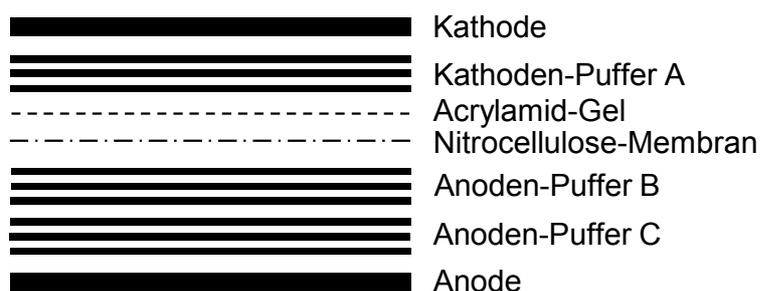


Abbildung 20: Blot-Kammer-Aufbau im Semi-Dry-Verfahren

Nach der erfolgten Übertragung wurde die Membran entnommen. Nun wurden die verschiedenen Marker-Banden nach Herstellerangabe beschriftet. Die Membran wurde mit Ponceaurot-Lösung angefärbt, deren Farbstoff sich unspezifisch an Proteine anlagert. Die Membran wurde mit Millipore-Wasser gewaschen und die erscheinenden Protein-Banden wurden als Lichtbild abfotografiert. Dies diente als Kontrolle für die erfolgreiche Übertragung des Blot-Verfahrens.

Die Membran wurde dreimal für 10 Minuten mit 1 x TBS gewaschen, um den restlichen Farbstoff zu entfernen. Die Membran wurde für eine Stunde mit Magermilchpulver in 1 x TBS / TWEEN20 (siehe 3.5) als Blocklösung abgesättigt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde dreimal für 10 Minuten mit Waschlösung (siehe 3.5) gewaschen, der Erstantikörper in Erstantikörperlösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Membran wurde dreimal für 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen und mit einer Zweitantikörper-Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal jeweils 10 Minuten mit 1 x TBS / TWEEN20 gewaschen.

4.9.5 ChemiDoc-System

Durch das ChemiDoc-System ist es möglich, die Stärke der Chemilumineszenz zu messen. Das Prinzip der Immunfärbung des Immunoblots beruht auf der Bindung eines für das gesuchte Protein (Antigen) spezifischen Antikörpers, der seinerseits wiederum das Antigen für den Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper darstellt. Somit kann der Erstantikörper indirekt sichtbar gemacht werden, da eine Reaktion mit dem am Zweitantikörper haftenden HRP mit dem in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol stattfindet (siehe Abbildung 21). Luminol wird hierbei oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Diese Lichtemission (Chemilumineszenz) wird als Licht-Bande erkennbar und kann im ChemiDoc-System mittels einer Kamera detektiert werden.

Zur Detektion des gesuchten Proteins wurde die Membran für eine Minute bei Dunkelheit in ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung inkubiert und auf eine Glasplatte gelegt und die Chemilumineszenz im ChemiDoc-System gemessen.

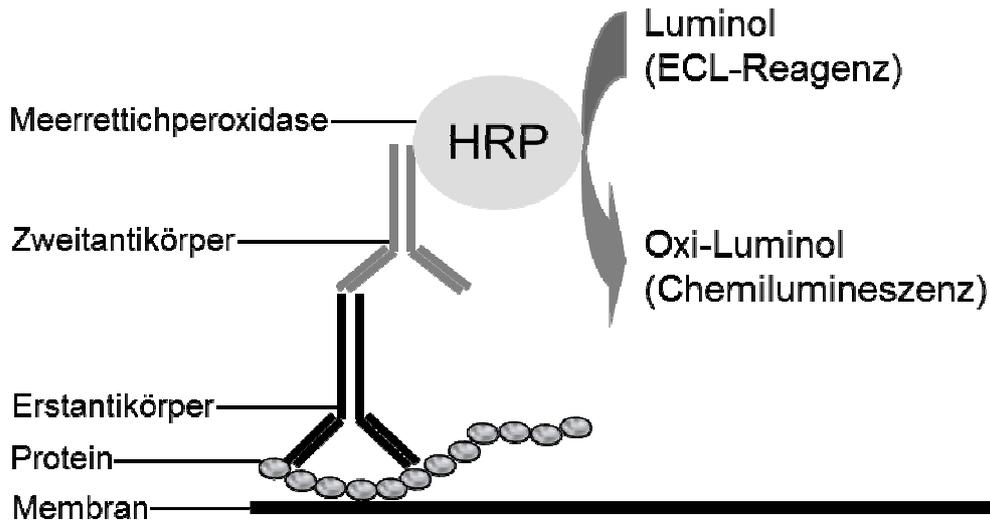


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Proteindetektion durch das Enhanced-Chemiluminescence-Verfahren

Zur Auswertung wurde die Stärke der Chemilumineszenz des gesuchten Proteins mit dem Programm Quantity[®]One ausgemessen. Die Molekülgröße wurde anhand des verwendeten Markers bestimmt und die Protein-Expression in ein relatives Verhältnis zu einem nicht regulierten Protein gesetzt (Beispiel: Vinkulin).

4.9.6 Strippen von Membranen

Das Strippen von Nitrocellulose-Membranen dient der Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern. Hierfür wurde Stripping-Solution (siehe 3.5) in einer verschlossenen Schale auf 70 °C in einem Wasserbad erhitzt und die Membran darin für fünf Minuten schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 15 Minuten mit Stripping-Waschpuffer (siehe 3.5) gewaschen. Nach 10-minütigem Waschen mit 1 x TBS wurde die Membran für eine Stunde in Magermilchpulver in 1 x TBS + TWEEN20 (siehe 3.5) zum Blocken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte wie unter 4.9.4 beschrieben mit der Inkubation des Primärantikörpers fortgefahren werden.

4.10 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes aus n verschiedenen Kardiomyozyten-Präparationen bzw. H9c2-Zellpassagen dargestellt. Eine Anzahl von $n < 20$ wurde durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit anschließendem Mann-Whitney-Test analysiert. Eine Anzahl > 20 wurde durch einen T-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Funktionalität der H9c2-Zellen

Bei H9c2-Zellen handelt es sich um Subklone einer Zelllinie aus dem Herzgewebe embryonaler BDIX-Ratten. H9c2-Zellen sind im Gegensatz zu Kardiomyozyten in der Lage, sich zu teilen, so dass aus den adhären wachsenden Myoblasten von polygonaler Form nach Konfluenz-Bildung mehrkernige tubuläre Strukturen entstehen (vergleiche Abbildung 7). H9c2-Zellen zeigen Charakteristika adulter Kardiomyozyten, zum Beispiel die Expression des Ryanodin-Rezeptors sowie eine Signaltransduktion über membranständige G-Proteine (Hescheler et al., 1991).

Ein Teil der Experimente dieser Dissertation wurde mit H9c2-Zellen durchgeführt, da hierdurch zum einen der Tier-Verbrauch gesenkt und zum anderen eine höhere Zellzahl und Protein-Menge für bestimmte Methoden, wie der Analyse von Protein-Interaktionen, erreicht werden konnte. Um die mittels H9c2-Zelllinie gewonnenen Ergebnisse mit Ergebnissen aus Versuchen mit adulten Kardiomyozyten vergleichen zu können, wurden zunächst H9c2-Zellen bezüglich ihrer AdYB-1-Infektionsmöglichkeit und TGF- β_1 -Ansprechbarkeit näher charakterisiert.

5.1.1 AdYB-1 erhöht die relative YB-1-mRNA-Expression in H9c2-Zellen

Um eine vergleichbare YB-1-Expression in Kardiomyozyten als auch in H9c2-Zellen zu erreichen, war es zu Beginn das Ziel, die Höhe der relativen YB-1-mRNA-Expression nach einer Infektion mit AdYB-1 in Kardiomyozyten zu bestimmen. Die Höhe der relativen YB-1-mRNA-Expression sollte in anschließenden Experimenten mit der in H9c2-Zellen verglichen werden. Zum Nachweis der Transkription der viral eingebrachten DNA-Sequenz wurden Kardiomyozyten für 24 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 infiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es folgte eine Real-Time-PCR mit YB-1-Primern zum Nachweis der relativen YB-1-mRNA-Menge. B2M wurde als Referenz-Gen herangezogen.

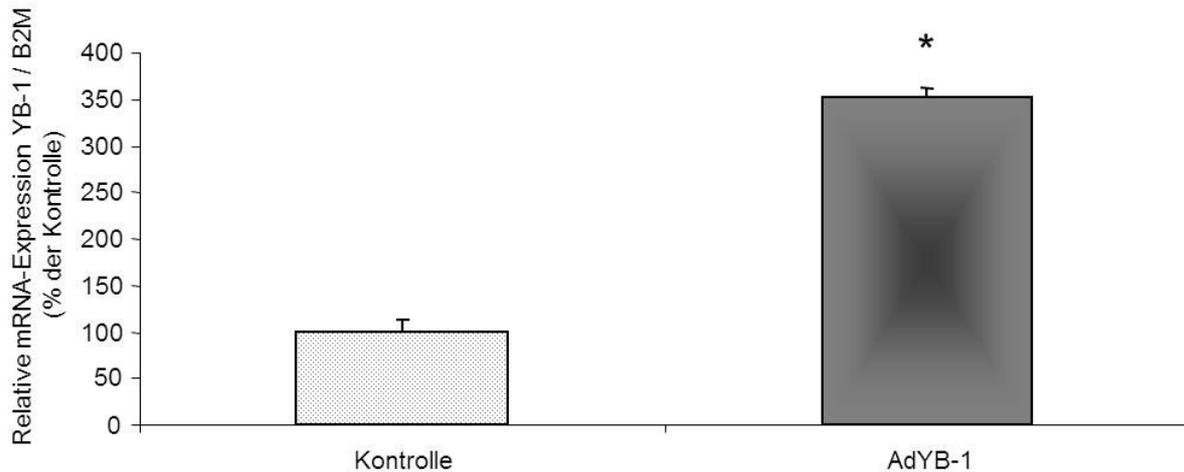


Abbildung 22: Quantitative Real-Time-PCR. Relative YB-1-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Infektion adulter Kardiomyozyten mit 1000 MOI AdYB-1 für 24 Stunden. Real-Time-PCR ist normiert auf B2M. Dargestellt sind der Mittelwert aus acht Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test (*) $p = 0,001$.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen YB-1-mRNA-Expression in den mit AdYB-1 infizierten adulten Kardiomyozyten von $100 \pm 13,26 \%$ (Kontrolle) auf $350,82 \pm 11,34 \%$ (AdYB-1).

Um die Höhe der Transkription der viral eingebrachten DNA-Sequenz nun in H9c2-Zellen zu bestimmen, wurden diese für 24 Stunden mit 500 MOI AdYB-1-Virus infiziert. Diese Dosis wurde gewählt, da hier eine signifikante Steigerung der YB-1-Protein-Expression auftritt (vergleiche Abbildung 24). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es folgte eine quantitative Real-Time-PCR mit YB-1-Primern zum Nachweis der relativen YB-1-mRNA-Menge. HPRT wurde als Referenz-Gen herangezogen.

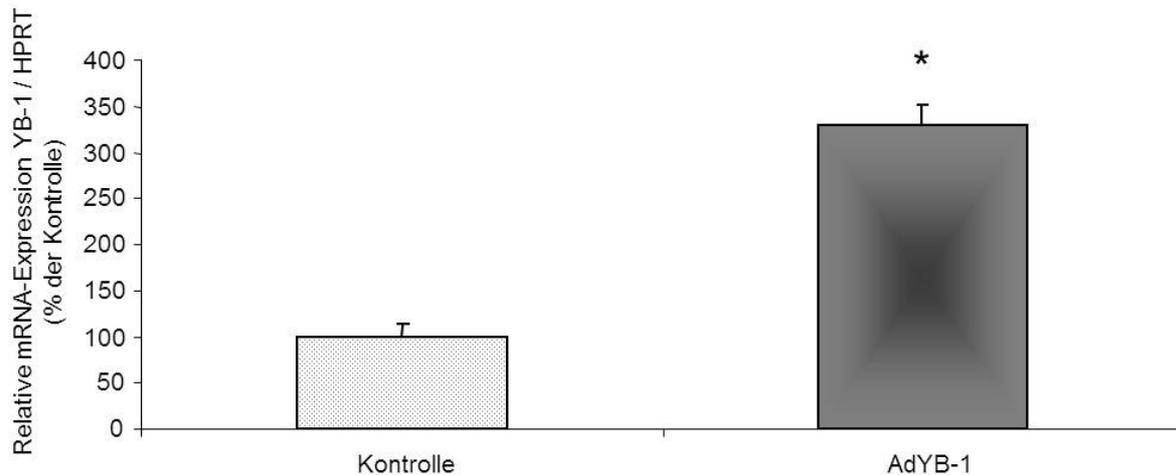


Abbildung 23: Quantitative Real-Time-PCR. Relative YB-1-mRNA-Expression in H9c2-Zellen. Infektion von H9c2-Zellen mit 500 MOI AdYB-1 für 24 Stunden. Real-Time-PCR ist normiert auf HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert aus fünf Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test (*) $p = 0,009$.

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen YB-1-mRNA-Expression in den mit AdYB-1 infizierten H9c2-Zellen von $100 \pm 12,88$ % (Kontrolle) auf $328,84 \pm 22,06$ % (AdYB-1).

Die Höhe der relativen YB-1-mRNA-Expression nach Infektion mit AdYB-1 ist demzufolge in H9c2-Zellen und in adulten Kardiomyozyten vergleichbar.

5.1.2 AdYB-1 erhöht die relative YB-1-Protein-Expression in H9c2-Zellen

Partsch zeigte im Jahre 2009, dass eine Infektion von adulten Kardiomyozyten mit AdYB-1 zu einer erhöhten relativen YB-1-Protein-Expression führt. Zum Nachweis der Translation der viral eingebrachten DNA-Sequenz in H9c2-Zellen wurden diese für 12 Stunden, 24 Stunden, 36 Stunden und 48 Stunden mit 500 MOI AdYB-1 (vergleiche Abbildung 25), bzw. für 24 Stunden mit 10 MOI, 50 MOI, 100 MOI, 250 MOI oder 500 MOI AdYB-1 (vergleiche Abbildung 24) infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die 24 Stunden mit 500 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert wurden (siehe Abbildung 24), sowie unbehandelte Zellen (siehe Abbildungen 24 und 25). Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert, eine Protein-Bestimmung nach LOWRY und ein Immunoblot mit YB-1-Antikörpern durchgeführt. Als Referenz-Protein diente Vinkulin.

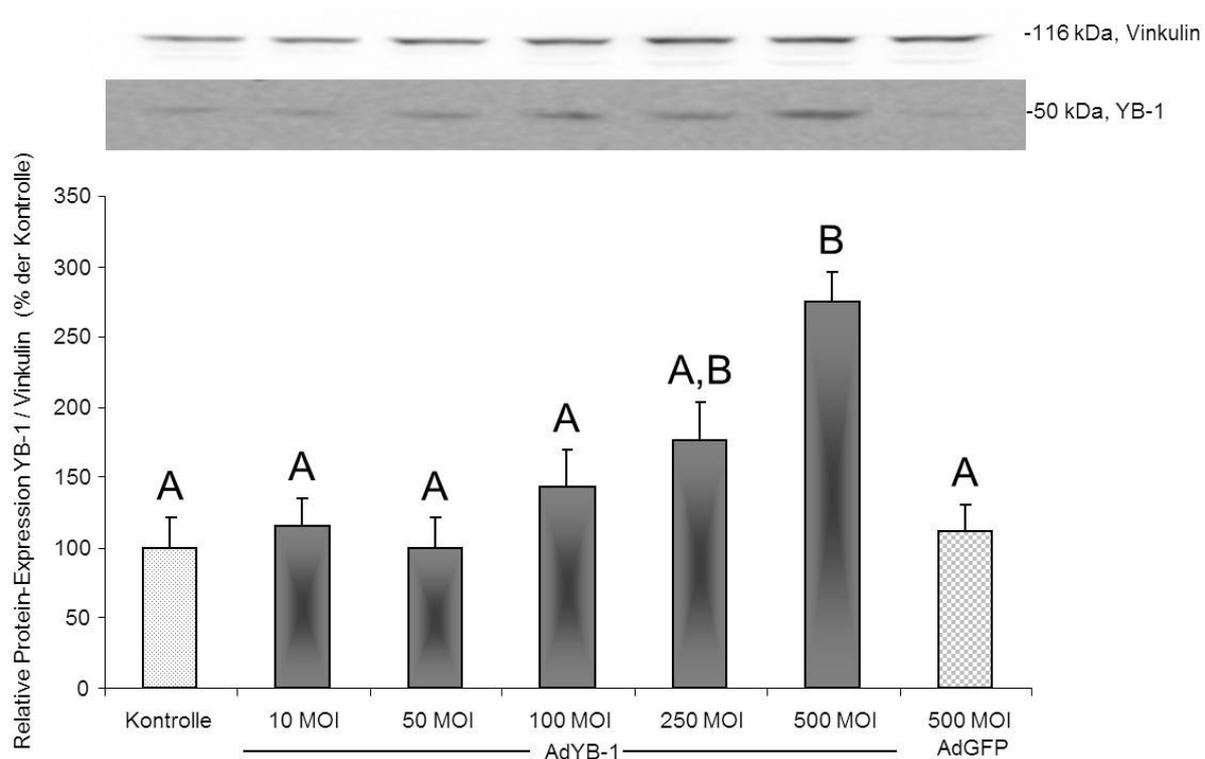


Abbildung 24: Relative YB-1-Expression in H9c2-Zellen nach 24-stündiger Infektion mit 10 MOI, 50 MOI, 100 MOI, 250 MOI und 500 MOI AdYB-1 oder 500 MOI AdGFP. Immunoblot aus 83 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus vier Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet ($p < 0,05$).

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, zeigte sich im Immunoblot eine Steigerung der relativen YB-1-Protein-Expression im Verlauf der Infektionsdosis. Während bei 10 MOI mit $114,55 \pm 20,96 \%$, bei 50 MOI mit $99,46 \pm 21,02 \%$, bei 100 MOI mit $143,58 \pm 25,67 \%$ und bei 250 MOI mit $176,57 \pm 26,17 \%$ noch kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 21,50 \%$) festgestellt werden konnte, zeigte sich bei einer Infektionsdosis von 500 MOI ein signifikanter Anstieg auf $274,58 \pm 21,79 \%$. Eine Infektion mit 500 MOI AdGFP führte nach 24 Stunden zu keiner Erhöhung der YB-1-Protein-Expression ($111,05 \pm 19,89 \%$).

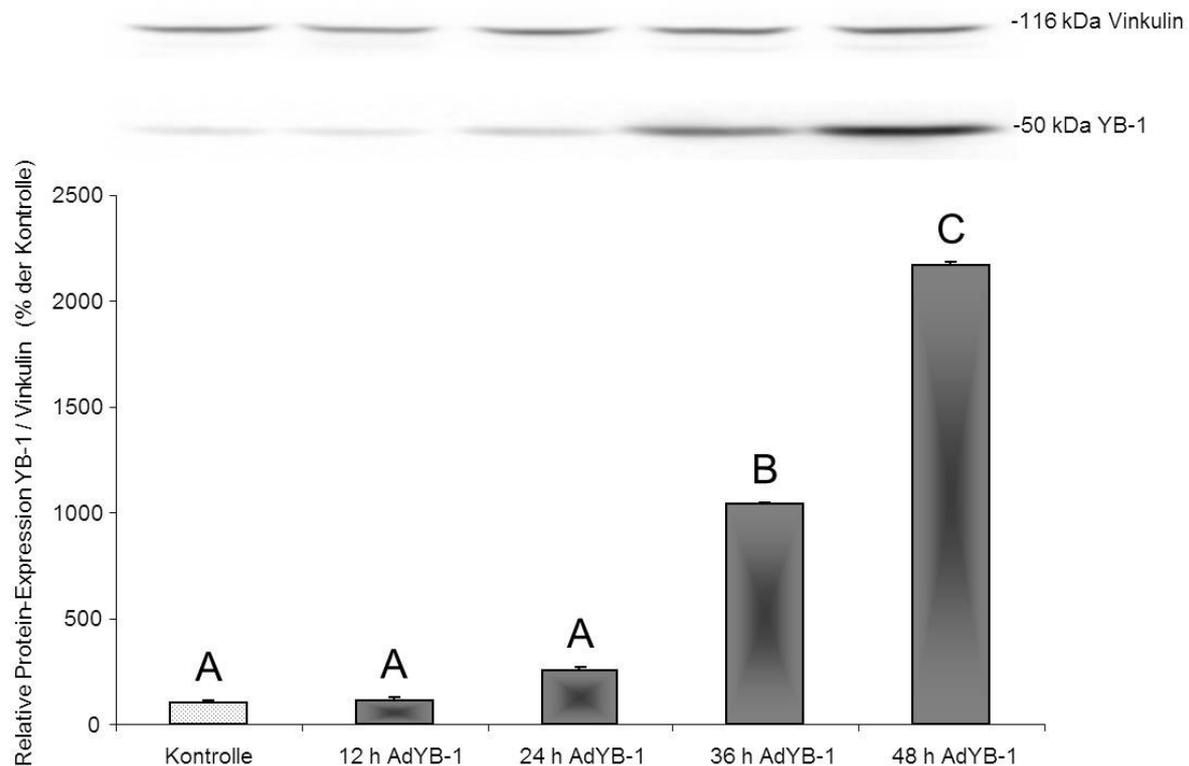


Abbildung 25: Relative YB-1-Expression nach 12-, 24-, 36- und 48-stündiger Infektion mit 500 MOI AdYB-1. Immunoblot aus 80 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet ($p < 0,05$). Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei Kontrolle vs. 24 h AdYB-1 $p = 0,05$.

Wie der Abbildung 25 zu entnehmen ist, zeigte sich im Immunoblot auch eine Steigerung der relativen YB-1-Protein-Expression im Zeitverlauf der Infektion. Während nach 12 Stunden mit $112,08 \pm 13,74$ % noch kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 9,03$ %) festgestellt werden konnte, zeigte sich nach 24 Stunden mit $256,52 \pm 15,08$ %, nach 36 Stunden mit $1036,88 \pm 14,14$ und nach 48 Stunden mit $2168,77 \pm 15,74$ % ein signifikanter Anstieg der relativen YB-1 Protein-Expression. Dabei ähneln sich die 24 Stunden-YB-1-Expressionsswerte (500 MOI) der Abbildungen 24 und 25.

Somit wird die relative YB-1-Protein-Expression nach Einbringen der viralen DNA-Sequenz in H9c2-Zellen signifikant gesteigert. Dies entspricht den von Partsch im Jahre 2009 gewonnenen Erkenntnissen aus Kardiomyozyten. In H9c2-Zellen ist jedoch eine niedrigere Infektionsdosis von 500 MOI nötig, um die vergleichbare YB-

1-Überexpression zu erhalten. In Kardiomyozyten wurden hingegen 1000 MOI eingesetzt (Parsch, 2009).

5.1.3 TGF- β_1 induziert Apoptose in Kardiomyozyten und H9c2-Zellen

Es ist bekannt, dass TGF- β_1 in isolierten adulten Kardiomyozyten Apoptose auslöst (Schneiders et al., 2005). Um die Apoptose-Rate in adulten Kardiomyozyten mit der in H9c2-Zellen zu vergleichen, wurde eine HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung zur Detektion von späten Apoptose-Vorgängen (Chromatinkondensation) in adulten Kardiomyozyten durchgeführt. Eine Schale mit adulten Herzmuskelzellen wurde für 20 Stunden mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Eine weitere Schale diente als nicht behandelte Kontrolle. Nach erfolgter Stimulationszeit wurden die Zellen mit HOECHST 33258 (1 mg / ml) und Propidiumiodid (20 μ g / ml) angefärbt und 10 Minuten inkubiert. Es wurden insgesamt 200 adulte Kardiomyozyten im Durchlicht ausgezählt und mittels der genannten Färbungen in intakte und apoptotische Zellen differenziert (vergleiche 4.4.3). Die Zahl apoptotischer Zellen wurde auf die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen und prozentual auf die Kontrolle bezogen.

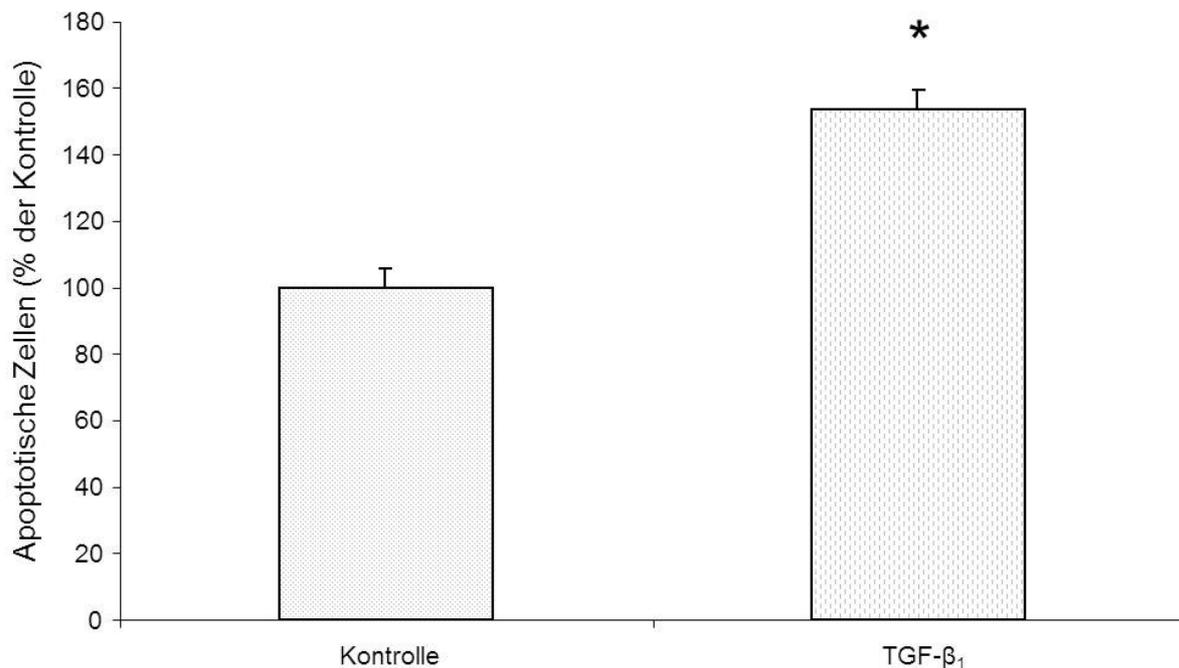


Abbildung 26: Prozentualer Anteil apoptotischer adulter Kardiomyozyten nach 20-stündiger TGF- β_1 -Stimulation (1 ng / ml). Auszählung und Differenzierung mittels HOECHST / Propidiumiodid-Färbung. Dargestellt sind der Mittelwert aus 21 Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach T-Test (*) $p = 0,0006$.

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, zeigte sich nach Auszählung der adulten Kardiomyozyten ein signifikanter Anstieg der relativen Apoptose-Rate von $100,00 \pm 5,77$ % (Kontrolle) auf $153,80 \pm 5,90$ % (TGF- β_1).

Ein pro-apoptotischer Effekt von TGF- β_1 in H9c2-Zellen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Die Detektion einer Chromatinkondensation war in H9c2-Zellen nicht möglich, da sich teilende H9c2-Zellen nicht von apoptotischen H9c2-Zellen unterscheidbar sind.

Um zu analysieren, inwieweit H9c2-Zellen auf eine TGF- β_1 -Induktion reagieren und um die resultierende Apoptose-Rate mit der in adulten Kardiomyozyten vergleichen zu können, wurde die in der frühen Phase der Apoptose stattfindende Translokation des Phosphatidylserins nach TGF- β_1 -Stimulation in H9c2-Zellen untersucht. Es wurde eine Schale mit H9c2-Zellen für vier Stunden mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Eine weitere Schale diente als nicht behandelte Kontrolle. Nach erfolgter Stimulationszeit wurden die Zellen mit HOECHST 33258 (1 mg / ml), Propidiumiodid (20 μ g / ml) und Annexin V-FITC angefärbt und 10 Minuten inkubiert. Es wurden insgesamt 200 H9c2-Zellen mittels HOECHST 33258-Färbung ausgezählt und in intakte und apoptotische Zellen differenziert (vergleiche Abbildung 10). Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde auf die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen und prozentual auf die Kontrolle bezogen.

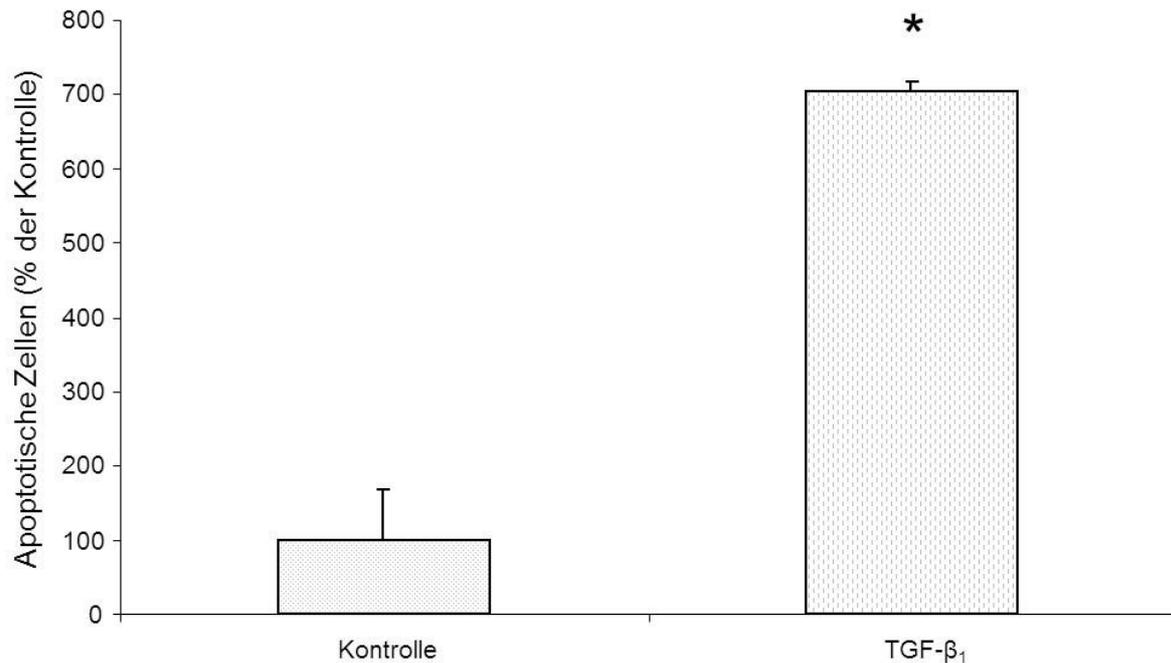


Abbildung 27: Prozentualer Anteil apoptotischer H9c2-Zellen nach vierstündiger TGF-β₁-Stimulation (1 ng / ml). Auszählung und Differenzierung mittels HOECHST 33258 / Propidiumiodid / Annexin V-FITC-Färbung. Dargestellt sind der Mittelwert aus sechs Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test (*) p = 0,006.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, zeigte sich nach Auszählung der H9c2-Zellen ein signifikanter Anstieg der relativen Apoptose-Rate von 100,00 ± 67,51 % (Kontrolle) auf 704,44 ± 11,80 % (TGF-β₁).

TGF-β induziert in H9c2-Zellen nach vierstündiger Stimulationszeit eine Translokation des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Zellmembran. In Kardiomyozyten findet dieser Vorgang unter TGF-β₁-Stimulation ebenfalls statt. Partsch zeigte im Jahre 2009 eine Steigerung der Apoptose-Rate nach vierstündiger TGF-β₁-Stimulation von 100 ± 9,31 % (Kontrolle) auf 146,76 ± 9,72 % (TGF-β₁).

Als weiterer Apoptose-Nachweis wurde eine Aktivierung der Kaspasen 3 und 7 in H9c2-Zellen bestimmt. Um nach einer 6-stündigen TGF-β₁-Stimulation die Aktivierung von Kaspasen in H9c2-Zellen nachzuweisen, wurden H9c2-Zellen in gleicher Anzahl (30000 Zellen / Well) auf eine geschwärzte 24-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausplattiert. Die Platten wurden inkubiert, bis ein gleichmäßiger Zellrasen entstanden war. Es wurden jeweils ein Well mit TGF-β₁ (1 ng / ml) stimuliert, ein Well diente als unbehandelte Kontrolle. Nach erfolgter

Inkubationszeit wurde das Medium bis auf 100 μ l abgesaugt und 100 μ l der Caspase-Glo[®] 3 / 7-Reagenz hinzugegeben. Die 24-Well-Platte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Lumineszenz mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers bestimmt.

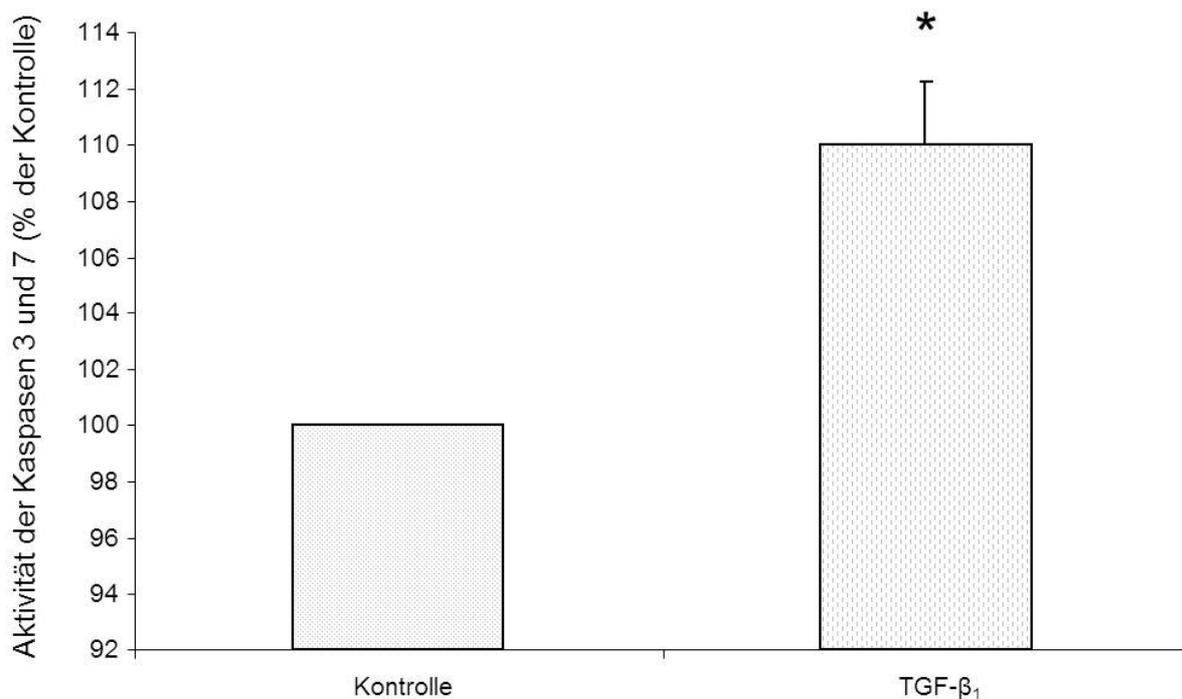


Abbildung 28: Aktivität der Kaspasen 3 und 7 nach sechstündiger Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) in H9c2-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Kontrolle. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mittels Mikrotiter-Photometer. Dargestellt sind der Mittelwert aus 11 Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test (*) $p < 0,001$.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, zeigte sich nach erfolgter Lumineszenz-Messung ein signifikanter Anstieg der Kaspase 3- und 7-Aktivität auf $110,00 \pm 2,24$ % (TGF- β_1) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine im Verhältnis geringe Steigerung der Kaspase-Aktivität scheint in H9c2-Zellen bereits einen starken Einfluss auf die durch frühe Apoptose-Vorgänge hervorgerufene Erhöhung der Apoptose-Rate zu haben (vergleiche Abbildung 27 und Abbildung 28).

Der in Herzmuskelzellen schon beschriebene pro-apoptotische Effekt von TGF- β_1 konnte in H9c2-Zellen durch verschiedene Apoptose-Nachweisverfahren bestätigt werden. TGF- β_1 hat in der eingesetzten Konzentration (1 ng / ml) einen deutlich stärkeren pro-apoptotischen Effekt auf H9c2-Zellen als auf isolierte adulte Kardiomyozyten.

5.1.4 TGF- β_1 induziert eine SMAD2-Phosphorylierung in H9c2-Zellen

Die TGF- β_1 -Signalkaskade ist in H9c2-Zellen bislang weitgehend unbeschrieben. Eine TGF- β_1 -Stimulation führt in H9c2-Zellen zu einer SMAD3-Phosphorylierung (Yang et al., 2009). Um sichere Rückschlüsse aus der H9c2-Zelllinie auf adulte Kardiomyozyten ziehen zu können, war es notwendig die TGF- β_1 -Signalkaskade in H9c2-Zellen vertiefend zu untersuchen. H9c2-Zellen wurden für 0,5 Stunden, eine Stunde und zwei Stunden mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein aus den Zellen extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit P-SMAD2-Antikörpern und ein Immunoblot derselben Proben mit SMAD2 / 3-Antikörpern durchgeführt.

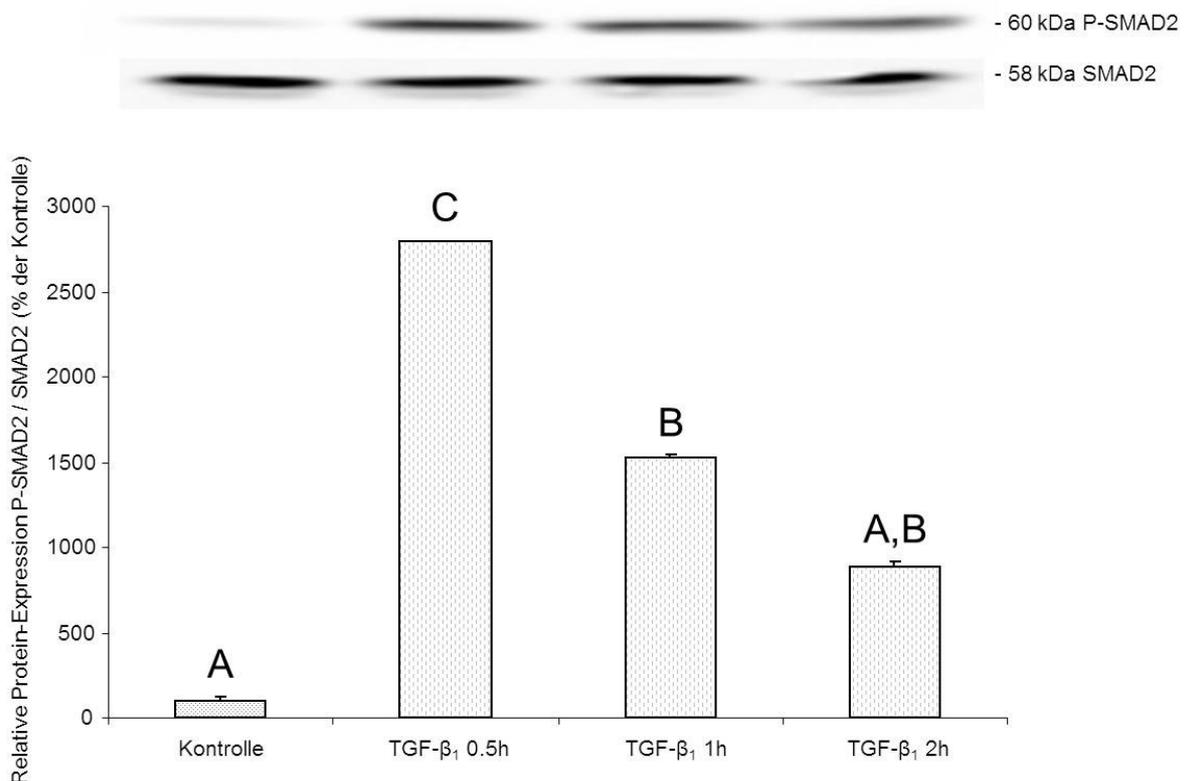


Abbildung 29: Relative P-SMAD2-Expression nach 0,5-, 1-, und 2-stündiger Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) in H9c2-Zellen. Immunoblot aus 90 μ g Gesamtprotein normiert auf SMAD2. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet ($p < 0,05$).

Wie Abbildung 29 zu entnehmen ist, zeigte sich im Immunoblot unter TGF- β_1 -Induktion eine Steigerung der relativen P-SMAD2-Protein-Expression. Bereits nach 0,5 Stunden ($2973,20 \pm 1,19$ %), sowie nach einer Stunde ($1520,21 \pm 21,02$ %)

konnte ein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 22,40 \%$) festgestellt werden. Nach zwei Stunden ($881,47 \pm 34,80 \%$) war dieser Effekt rückgängig.

Das Ergebnis zeigt, dass eine TGF- β_1 -Stimulation in H9c2-Zellen zu einer Phosphorylierung von SMAD2 führt. Diese Induktion findet man auch in Kardiomyozyten. Es besteht jedoch ein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung von SMAD2. In Kardiomyozyten ist, im Gegensatz zu H9c2-Zellen, erst nach 90 Minuten ein signifikanter Anstieg der SMAD2-Phosphorylierung zu verzeichnen (Heger et al., 2011).

5.1.5 TGF- β_1 erhöht die relative SMAD7-Protein-Expression in H9c2-Zellen

SMAD7 wird in der TGF- β_1 -Signaltransduktion als negatives Feedback vermehrt exprimiert, um eine langfristige TGF- β_1 -Antwort zu inhibieren. SMAD7 hemmt die Phosphorylierung von R-SMAD-Proteinen (Nakao et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die SMAD7-Protein-Expression in H9c2-Zellen nach TGF- β_1 -Stimulation verändert ist, wurden diese für 24 Stunden mit TGF- β_1 (1ng / ml) stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit SMAD7-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

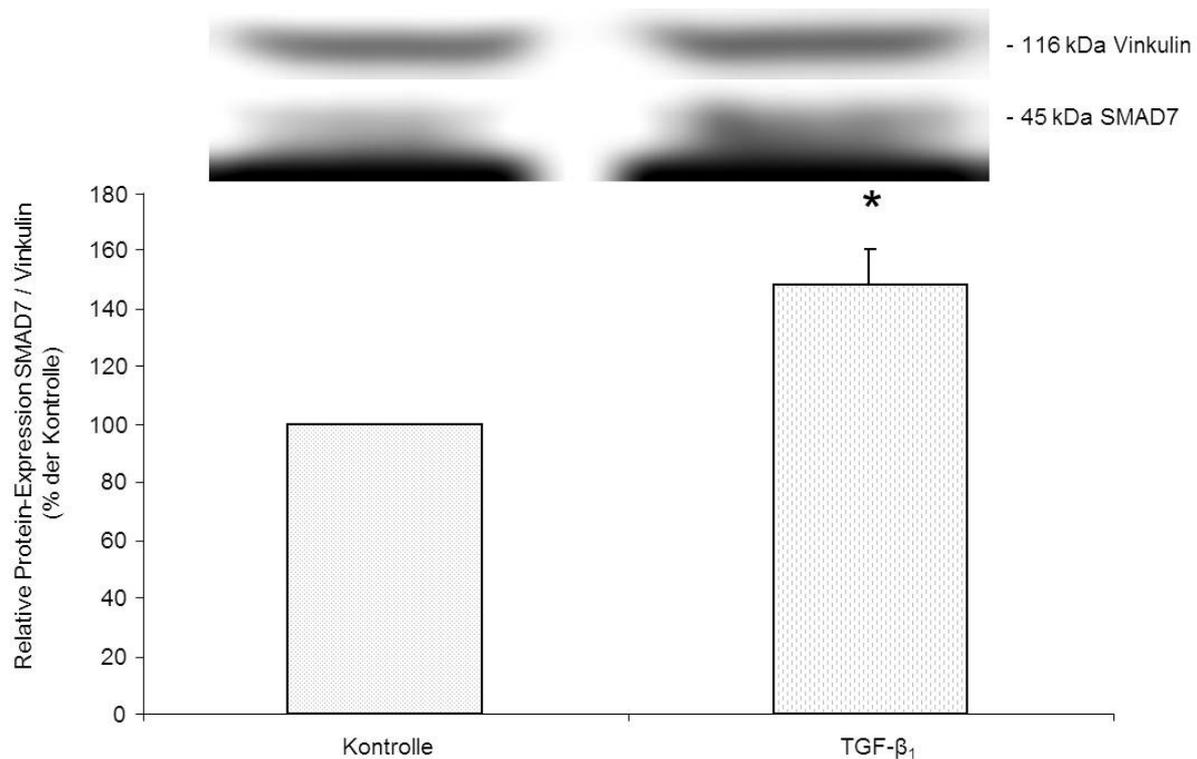


Abbildung 30: Relative SMAD7-Protein-Expression in H9c2-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml). Immunoblot aus 60 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus acht Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test (*) $p = 0,005$.

Wie Abbildung 30 darstellt, zeigte sich im Immunoblot nach 24-stündiger Stimulation mit TGF-β₁ eine signifikante Steigerung der relativen SMAD7-Protein-Expression ($148,24 \pm 0,03$ %) im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle.

Unter TGF-β₁-Einfluss wird SMAD7 in H9c2-Zellen vermehrt auf Protein-Ebene exprimiert. Dies könnte als Schutz vor einer langfristigen Apoptose-Induktion durch TGF-β₁ dienen.

5.1.6 TGF-β₁ induziert eine Bindung von P-SMAD2 an P-SMAD3 in H9c2-Zellen

Es ist bekannt, dass im Rahmen der TGF-β / SMAD-Signalkaskade eine Bindung von SMAD2 an SMAD3 stattfindet (Wu et al., 2001). Um diesen Teil des Signalwegs in H9c2-Zellen zu analysieren, wurden diese für eine Stunde mit TGF-β₁ (1 ng / ml) stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein mittels RIPA-Puffer extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde eine Immunopräzipitation mittels Dynabeads und

SMAD2-Mouse-Antikörpern, bzw. IgG-Mouse durchgeführt (vergleiche Abbildung 31). IgG-Mouse wurde als Kontrolle des möglichen Nachweises des tierartspezifischen IgGs verwendet. Anschließend wurde ein Immunoblot mit P-SMAD2-Rabbit- und P-SMAD3-Rabbit-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

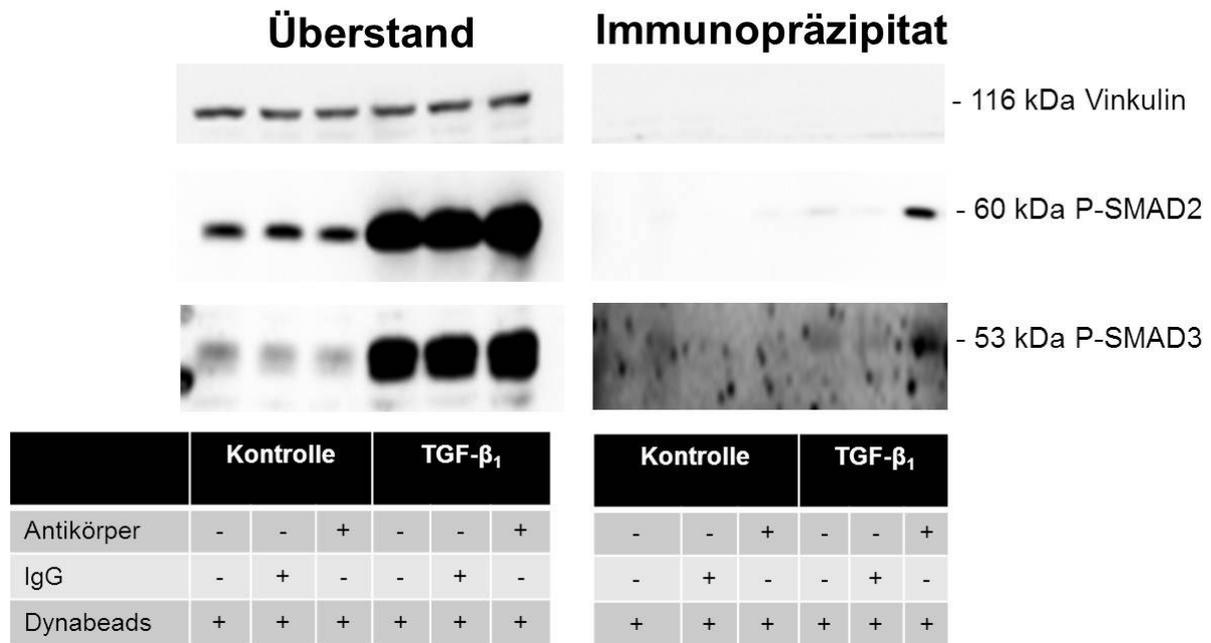


Abbildung 31: Immunpräzipitation des SMAD2-Proteins mittels Dynabeads und SMAD2-Mouse-Antikörpern aus 400 μ g Gesamtprotein von H9c2-Zellen (400 μ g / Probe). Einstündige Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml). Nichtbehandelte H9c2-Zellen dienten als Kontrolle. Immunoblot des Überstandes und des immunopräzipitierten SMAD2-Proteins mit P-SMAD2-Rabbit- und P-SMAD3-Rabbit-Antikörpern. Als Referenz-Protein diente Vinkulin.

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, zeigte sich im Immunoblot eine erfolgreiche Immunopräzipitation von P-SMAD2. Gleichzeitig wurde P-SMAD3 immunopräzipitiert, was eine Bindung von P-SMAD3 an das isolierte P-SMAD2-Protein nachweist. Ein Nachweis von tierartspezifischem IgG konnte durch Verwendung eines IgG-Mouse-Antikörpers ausgeschlossen werden. Das Referenz-Protein Vinkulin war ausschließlich im Überstand zu sehen, was eine Verunreinigung der isolierten SMAD2-Proteinfraktion ausschließt. Unter TGF- β_1 -Stimulation war eine deutliche Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 zu sehen.

Unter TGF- β_1 -Stimulation findet in H9c2-Zellen eine Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 statt. Zudem bindet P-SMAD2 an P-SMAD3 nach TGF- β_1 -Induktion. Dies entspricht dem von Wu et al. im Jahre 2001 beschriebenen Ablauf dieses Teils

der TGF- β_1 / SMAD Signalkaskade. Dies ist der erste Nachweis einer SMAD-Protein-Interaktion in H9c2-Zellen und legt den Grundstein der Vergleichbarkeit von H9c2-Zellen mit Kardiomyozyten nach TGF- β_1 -Stimulation.

5.1.7 TGF- β_1 verhindert die YB-1-Translokation in den Nukleus in H9c2-Zellen

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von YB-1 in Kardiomyozyten eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 zur Folge hat (Partsch, 2009). Um den Einfluss von TGF- β_1 auf die Verteilung von YB-1 in verschiedenen Zellkompartimenten von H9c2-Zellen zu beurteilen, wurden diese für 24 Stunden mit 500 MOI AdYB-1 infiziert und für eine Stunde mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gegen YB-1 und Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines digitalen Fluoreszenz-Mikroskops und der BZ Analyzer[®]-Software gemessen. Die Fluoreszenz des Zytoplasmas wurde auf 100 % gesetzt und auf die Fluoreszenz des Nukleus bezogen.

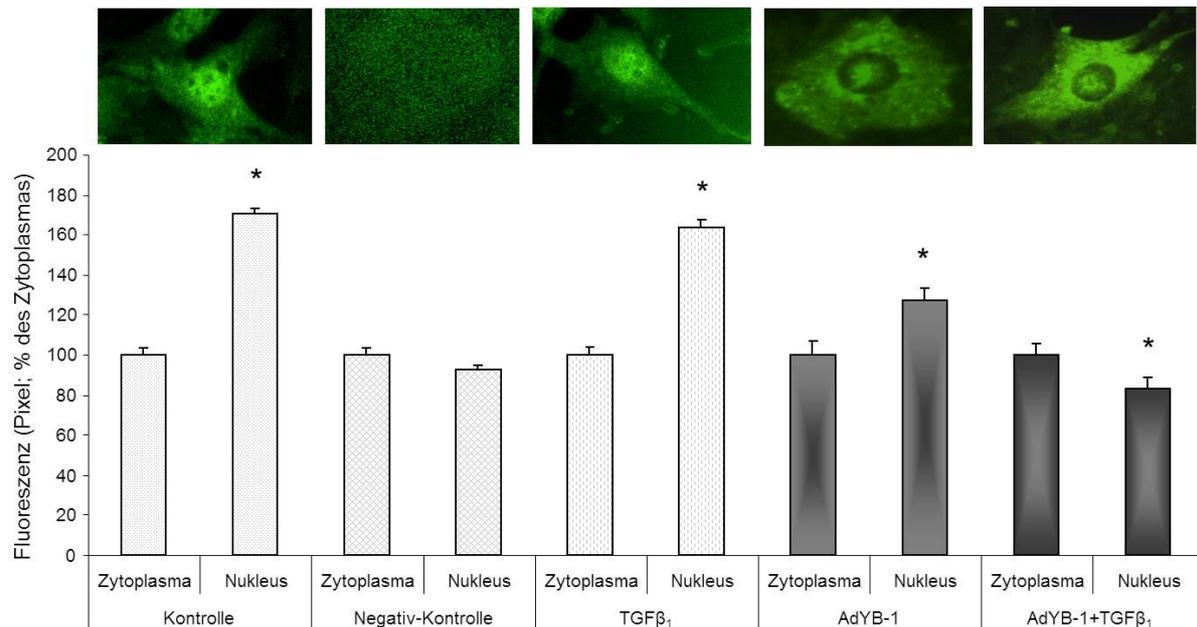


Abbildung 32: Quantitative Auswertung der Fluoreszenz in Zytoplasma und Nucleus von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Infektion mit 500 MOI AdYB-1 und / oder einstündiger Inkubation mit TGF- β_1 (1 ng / ml). Inkubation mit YB-1 Primärantikörper und Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und nur mit Sekundärantikörper inkubierte Zellen. Aufnahme bei 549-563 nm. Oben: Repräsentative Zellen, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen von H9c2-Zellen (Kontrolle: n = 35; Negativ-Kontrolle: n = 34; TGF- β_1 : n = 30; AdYB-1: n = 35; AdYB-1 + TGF- β_1 : n = 28) und der zugehörige Standardfehler. Nach T-Test signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$ vs. Zytoplasma) sind mit * gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, zeigte sich in der Kontrolle eine mittelstarke Fluoreszenz im Zytoplasma ($100 \pm 3,33$ %) und eine im Verhältnis signifikant höhere Fluoreszenz im Nucleus der Zellen ($170,44 \pm 2,58$ %). YB-1 liegt demzufolge in unbehandelten H9c2-Zellen in erhöhter Konzentration im Nucleus als im Zytoplasma vor. In der Negativkontrolle war hingegen eine kaum sichtbare Fluoreszenz zu erkennen (Zytoplasma: $100 \pm 3,59$ %, Nucleus $92,30 \pm 2,45$ %). In den mit TGF- β_1 stimulierten Zellen war eine ähnliche Verteilung von YB-1 wie in den Kontrollzellen zu sehen (Zytoplasma: $100 \pm 3,74$ %, Nucleus: $163,63 \pm 3,70$ %). Nach 24-stündiger Infektion mit 500 MOI AdYB-1 ist ebenso eine signifikant höhere Fluoreszenz im Nucleus ($126,92 \pm 6,48$ %) als im Zytoplasma ($100 \pm 6,70$ %) zu erkennen. Diese erscheint im Verhältnis zur Kontrolle etwas schwächer, da durch die Infektion mehr YB-1 im Zytoplasma der Zellen zu finden ist. In den für 24 Stunden mit 500 MOI AdYB-1 infizierten und für eine Stunde mit TGF- β_1 stimulierten Zellen zeigte sich eine

Umkehr der Fluoreszenz-Verhältnisse: Es ist eine deutliche Überexpression von YB-1 im Zytoplasma ($100 \pm 5,13$ %) zu erkennen, wobei diese im Nukleus signifikant abnimmt ($83,0 \pm 5,61$ %).

In H9c2-Zellen wird YB-1 bereits ohne zusätzlichen Stimulus, aber auch nach alleiniger Überexpression von YB-1 oder TGF- β_1 -Stimulation in den Kern transloziert. Im Gegensatz dazu, liegt YB-1 in Kardiomyozyten unter den genannten Einflüssen hauptsächlich im Zytoplasma vor (Parsch, 2009). Eine TGF- β_1 -Stimulation verhindert in Kombination mit einer Überexpression von YB-1 in H9c2-Zellen die schon in der Kontrolle beobachtete Translokation von YB-1 in den Nukleus. Als Ursache für die fehlende Translokation ist eine Interaktion von YB-1 mit zytoplasmatischen Faktoren denkbar.

5.1.8 PE hat keinen Einfluss auf die YB-1-Translokation in den Nukleus in H9c2-Zellen

Auf eine Phenylephrin-Induktion reagieren H9c2-Zellen ähnlich wie Kardiomyozyten mit hypertrophem Wachstum. Jeong et al. zeigten im Jahre 2008 eine 2,3-fache vergrößerte Zellquerschnittsfläche von H9c2-Zellen nach PE-Stimulation.

Um die Verteilung von YB-1 in verschiedenen Zellkompartimenten der H9c2-Zellen unter PE-Induktion zu beurteilen, wurden diese für 24 Stunden mit 500 MOI AdYB-1 infiziert und für eine Stunde mit PE ($1 \mu\text{M}$) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gegen YB-1 und Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines digitalen Fluoreszenz-Mikroskops und der BZ Analyzer[®]-Software gemessen. Die Fluoreszenz des Zytoplasmas wurde auf 100 % gesetzt und auf die Fluoreszenz des Nukleus bezogen.

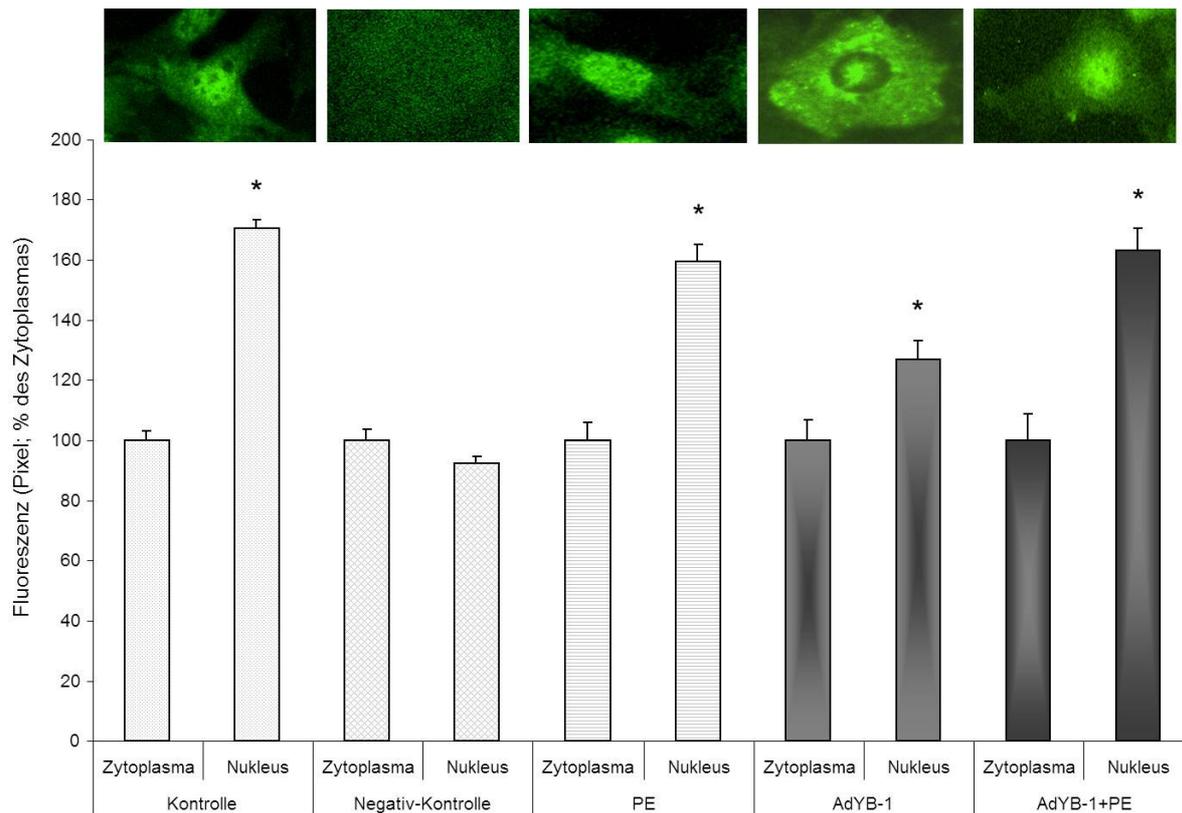


Abbildung 33: Quantitative Auswertung der Fluoreszenz im Zytoplasma und im Nukleus von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Infektion mit 500 MOI AdYB-1 und / oder einstündiger Inkubation mit PE (1 μ M). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und nur mit Sekundärantikörper inkubierte Zellen. Inkubation mit YB-1 Primärantikörper und Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper. Aufnahme bei 549-563 nm. Dargestellt sind der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen von Zellen (Kontrolle: n = 35; Negativ-Kontrolle: n = 34; PE: n = 14; AdYB-1: n = 35; AdYB-1 + PE: n = 14) und der zugehörige Standardfehler. Oben: Repräsentative Zellen, unten: Quantitative Auswertung. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test: Kontrolle: Zytoplasma vs. Nukleus $p < 0,001$. PE: Zytoplasma vs. Nukleus $p < 0,001$. AdYB-1 Zytoplasma vs. Nukleus $p = 0,014$. AdYB-1 + PE: Zytoplasma vs. Nukleus $0,002$.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, zeigte sich in der Kontrolle eine mittelstarke Fluoreszenz im Zytoplasma ($100 \pm 3,33$ %) und eine im Verhältnis signifikant höhere Fluoreszenz im Nukleus der Zellen ($170,44 \pm 2,58$ %). YB-1 ist demzufolge, wie bereits schon in Abbildung 32 gezeigt, in unbehandelten H9c2-Zellen in erhöhter Konzentration im Nukleus vorhanden. In der Negativkontrolle war hingegen eine kaum sichtbare Fluoreszenz zu erkennen (Zytoplasma: $100 \pm 3,59$ %, Nukleus $92,30 \pm 2,45$ %). In den mit PE stimulierten Zellen war eine ähnliche Verteilung von YB-1 wie in den Kontrollzellen zu sehen (Zytoplasma: $100 \pm 5,73$ %, Nukleus: $159,49 \pm 5,56$ %). Nach 24-stündiger Infektion mit 500 MOI AdYB-1 ist ebenso eine signifikant höhere Fluoreszenz im Nukleus ($126,92 \pm 6,48$ %) als im Zytoplasma ($100 \pm 6,70$ %)

zu erkennen. Diese erscheint im Verhältnis zur Kontrolle etwas schwächer, da durch die Infektion mehr YB-1 im Zytoplasma der Zellen zu finden ist. In den für 24 Stunden mit 500 MOI AdYB-1 infizierten und für eine Stunde mit PE stimulierten Zellen bleiben die Verhältnisse bestehen: Es zeigt sich keine Umkehr der Fluoreszenzverhältnisse. Es ist eine Überexpression von YB-1 im Zytoplasma ($100 \pm 8,71$ %) zu erkennen, diese ist jedoch im Nukleus signifikant stärker ausgeprägt ($163,11 \pm 7,14$ %).

Eine Überexpression von YB-1 in Kombination mit einer PE-Stimulation hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von YB-1 in H9c2-Zellen. Im Gegensatz zu einer kombinierten Überexpression von YB-1 und einer TGF- β_1 -Stimulation (vergleiche Abbildung 32) findet unter einer kombinierten Überexpression von YB-1 und einer PE-Stimulation keine Translokation von YB-1 aus dem Nukleus in das Zytoplasma statt.

5.2 Der Einfluss von YB-1 auf eine TGF- β_1 induzierte Apoptose

5.2.1 Kardiomyozyten

5.2.1.1 YB-1 beeinflusst die relative SMAD4-, SMAD7-, JunB- und JunD-mRNA-Expression in Kardiomyozyten

Partsch zeigte in seinen Untersuchungen im Jahre 2009 den inhibitorischen Effekt einer YB-1 Überexpression auf eine durch TGF- β_1 induzierte Apoptose. Es sollte untersucht werden, ob die genannte anti-apoptotische Wirkung von YB-1 durch eine verminderte, bzw. erhöhte Expression von SMAD-Proteinen oder AP-1-Untereinheiten ausgelöst sein kann (vergleiche 2.2.4).

Adulte Herzmuskelzellen wurden für 19 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 Virus infiziert und für 12 Stunden mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten. Nach der entsprechenden Zeit wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach DNase-Verdau in cDNA umgeschrieben. Danach folgte eine Real-Time-PCR mit den Primern für SMAD4, SMAD7, JunB, und JunD zum

Nachweis der relativen SMAD4-, SMAD7-, JunB- und JunD-mRNA-Menge. B2M diente als Referenz-Gen.

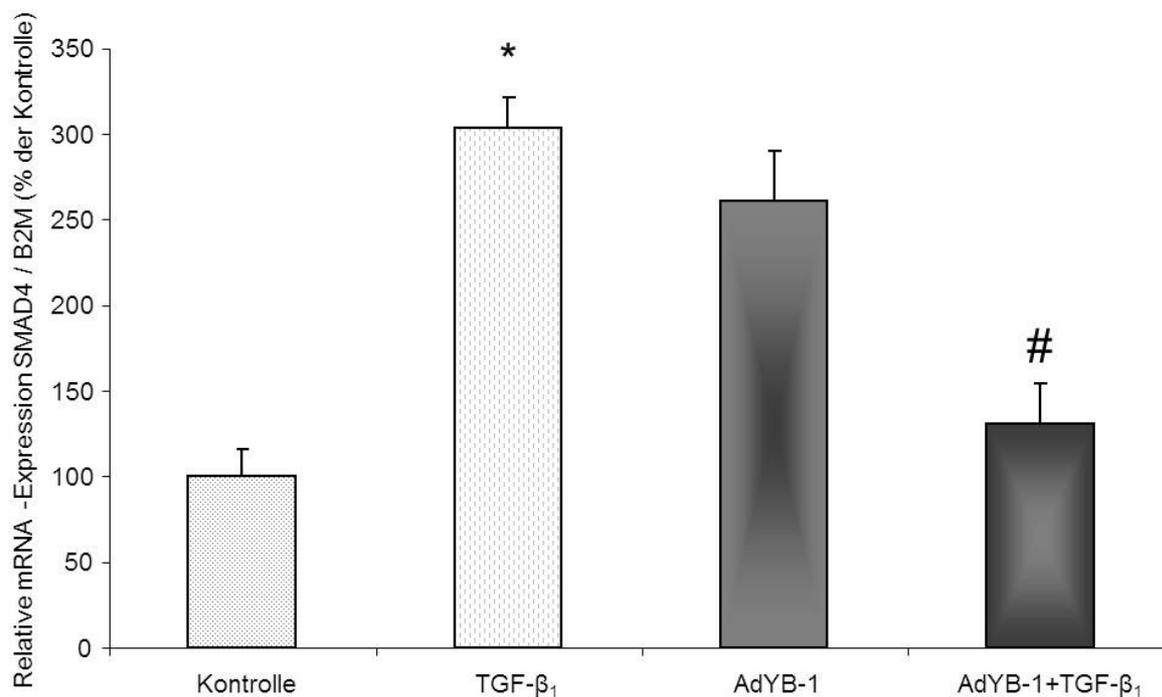


Abbildung 34: Quantitative Real-Time-PCR. Relative SMAD4-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Infektion der Kardiomyozyten für 19 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) für 12 Stunden. Die Real-Time-PCR ist normiert auf B2M. Dargestellt sind der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen aus Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 4; TGF-β₁: n = 8; AdYB-1: n = 8; AdYB-1 + TGF-β₁: n = 9) und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei TGF-β vs. Kontrolle (*) $p = 0,017$ und bei TGF-β₁ vs. AdYB-1 + TGF-β₁ (#) $p = 0,021$.

Wie Abbildung 34 zeigt, erhöhte sich die relative SMAD4-mRNA-Expression nach einer 12-stündigen Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) signifikant von $100 \pm 15,73$ % (Kontrolle) auf $303,48 \pm 17,56$ % (TGF-β₁). Nach einer 19-stündigen Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 lag die relative SMAD4-mRNA-Expression bei $260,95 \pm 28,63$ % (AdYB-1). Nach kombinierter 12-stündiger Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) und 19-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 erniedrigte sich die relative SMAD4-mRNA Expression signifikant auf $131,63 \pm 22,91$ (AdYB-1 + TGF-β₁).

Eine alleinige Stimulation mit TGF-β₁ führt in Kardiomyozyten zu einer signifikant erhöhten SMAD4-mRNA-Expression. Das Co-SMAD4-Protein spielt eine wichtige pro-apoptotische Rolle in der TGF-β induzierten Apoptose (vergleiche Abbildung 2). Eine Überexpression von YB-1 hat in Kombination mit TGF-β₁ einen hemmenden

Einfluss auf die relative SMAD4-mRNA-Expression in Herzmuskelzellen. Dies könnte die anti-apoptotische Wirkung der YB-1-Überexpression erklären.

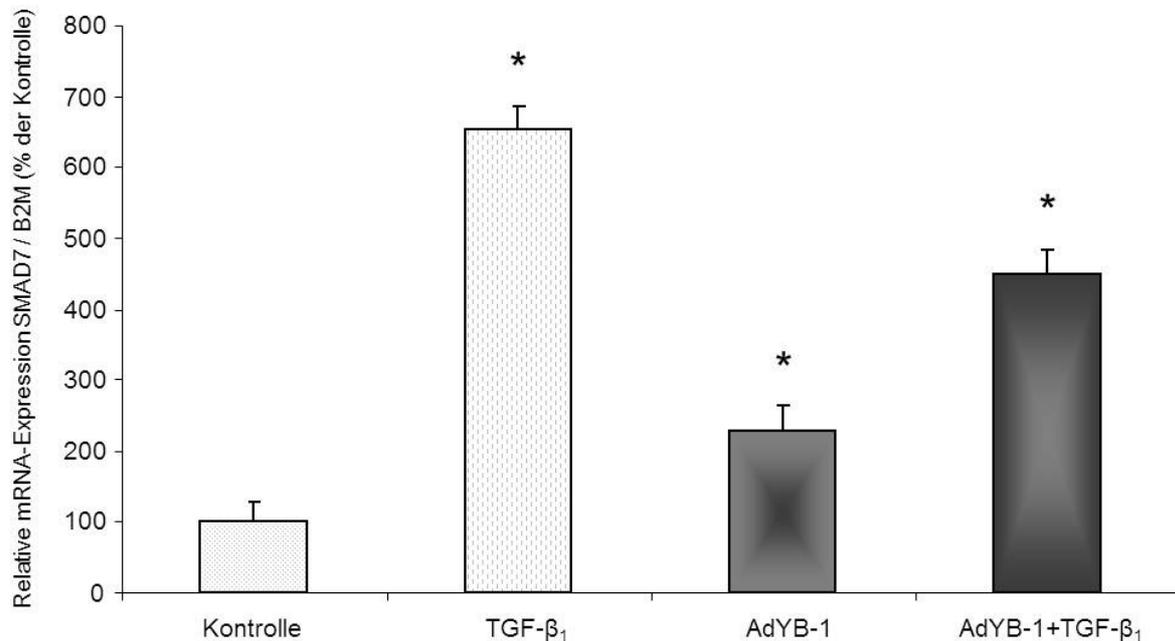


Abbildung 35: Quantitative Real-Time-PCR. Relative SMAD7-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Infektion der Kardiomyozyten für 19 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) für 12 Stunden. Die Real-Time-PCR ist normiert auf B2M. Dargestellt sind der Mittelwert aus sieben Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei TGF-β vs. Kontrolle (*) p = 0,004, bei AdYB-1 vs. Kontrolle (*) p = 0,048 und bei AdYB-1 + TGF-β vs. Kontrolle (*) p = 0,12.

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, erhöhte sich nach einer 12-stündigen Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) die relative SMAD7-mRNA-Expression signifikant von 100 ± 27,62 % (Kontrolle) auf 653,69 ± 31,05 % (TGF-β₁). Nach einer 19-stündigen Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 lag die relative SMAD7-mRNA-Expression bei 228,18 ± 33,98 % (AdYB-1). Nach kombinierter 12-stündiger Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml) und 19-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 erhöhte sich die relative SMAD7-mRNA Expression signifikant auf 450,35 ± 33,10 (AdYB-1 + TGF-β₁).

Die alleinige Stimulation mit TGF-β₁ führt in Kardiomyozyten zu einer signifikant erhöhten SMAD7-mRNA-Expression. Das I-SMAD7-Protein spielt eine wichtige anti-apoptotische Rolle in der TGF-β induzierten Apoptose (vergleiche Abbildung 2). Eine

Überexpression von YB-1 hat sowohl alleine als auch in Kombination mit TGF- β_1 eine Steigerung der relativen SMAD7-mRNA-Expression in Herzmuskelzellen zur Folge. Dies könnte die anti-apoptotische Wirkung der YB-1-Überexpression erklären.

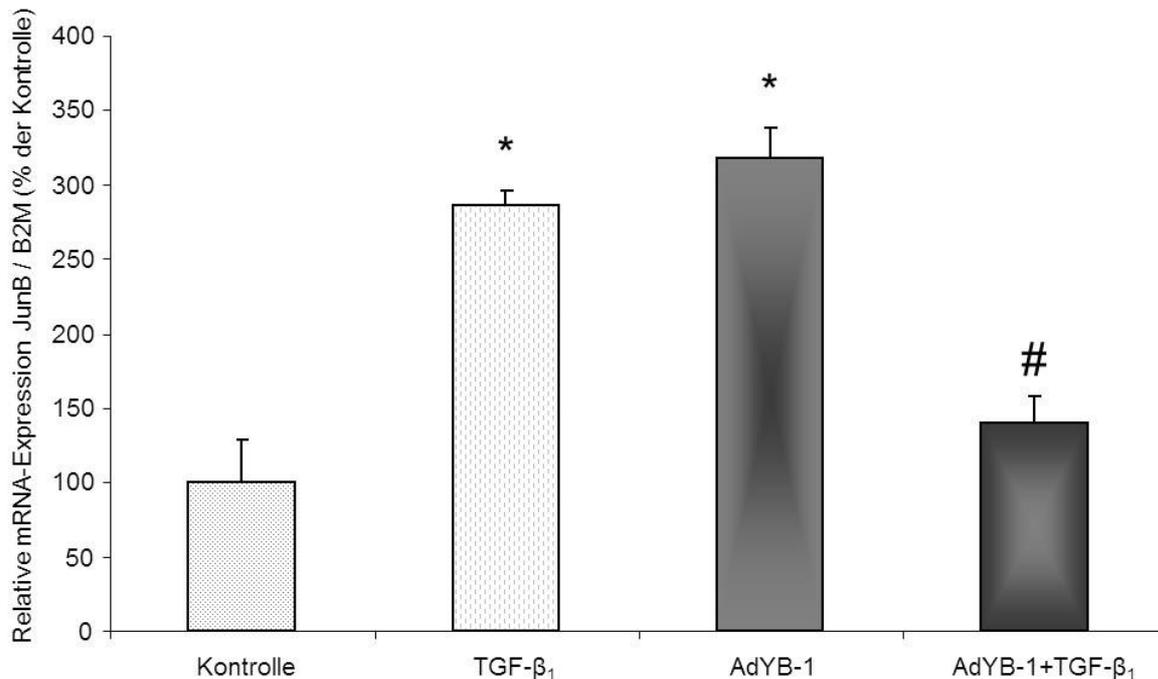


Abbildung 36: Quantitative Real-Time-PCR. Relative JunB-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Infektion der Kardiomyozyten für 19 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) für 12 Stunden. Die Real-Time-PCR ist normiert auf B2M. Dargestellt sind der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen aus Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 5; TGF- β_1 : n = 7; AdYB-1: n = 6; AdYB-1 + TGF- β_1 : n = 9) und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei TGF- β_1 vs. Kontrolle (*) p = 0,007, bei AdYB-1 vs. Kontrolle (*) p = 0,011 und bei TGF- β_1 vs. AdYB-1 + TGF- β_1 (#) p = 0,014.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, erhöhte sich nach einer 12-stündigen Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) die relative JunB-mRNA-Expression signifikant von $100 \pm 27,77$ % (Kontrolle) auf $286,30 \pm 9,85$ % (TGF- β_1). Nach 19-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 lag die relative JunB-mRNA-Expression bei $317,70 \pm 20,45$ % (AdYB-1). Nach kombinierter 12-stündiger Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) und 19-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 erniedrigte sich die relative JunB-mRNA-Expression signifikant auf $139,68 \pm 17,52$ (AdYB-1 + TGF- β_1).

Die alleinige Stimulation mit TGF- β_1 führt in Kardiomyozyten zu einer signifikant erhöhten JunB-mRNA-Expression. Die AP-1-Untereinheit JunB spielt eine wichtige pro-apoptotische Rolle in der TGF- β induzierten Apoptose (vergleiche 2.2.4). Eine Überexpression von YB-1 hat in Kombination mit TGF- β_1 einen hemmenden Einfluss auf die relative JunB-mRNA-Expression in Herzmuskelzellen. Dies könnte die anti-apoptotische Wirkung der YB-1-Überexpression erklären. Eine alleinige Überexpression von YB-1 erhöht hingegen die relative JunB-mRNA-Expression in Kardiomyozyten.

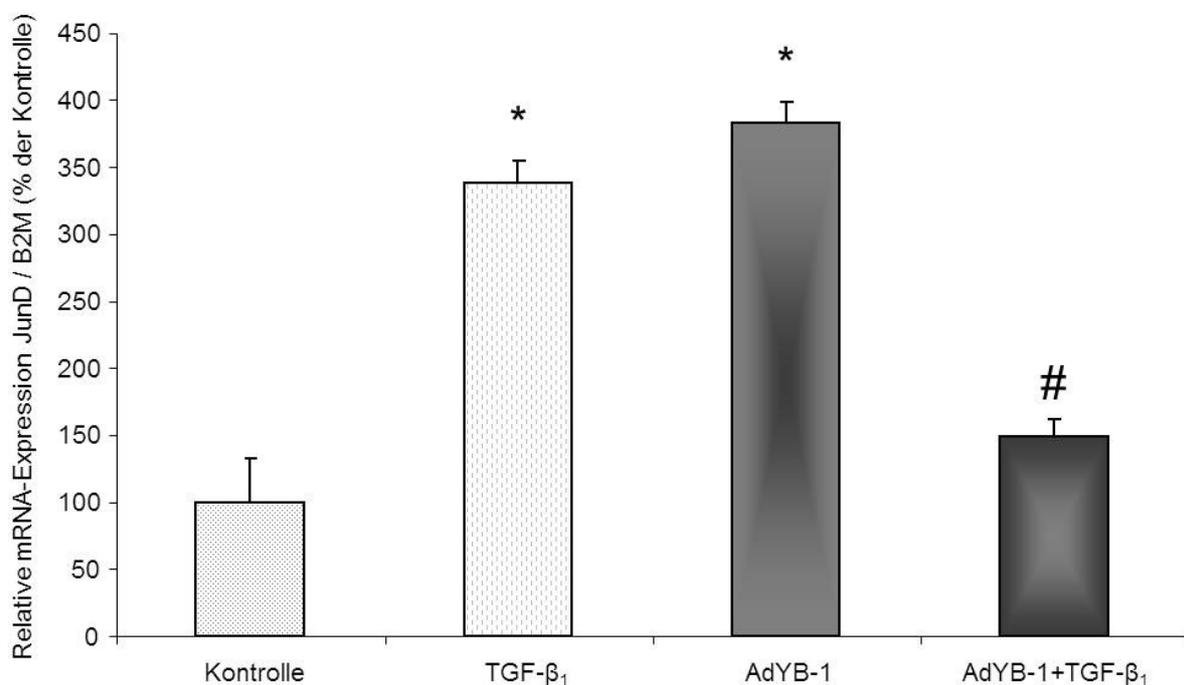


Abbildung 37: Quantitative Real-Time-PCR. Relative JunD-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Infektion der Kardiomyozyten für 19 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) für 12 Stunden. Die Real-Time-PCR ist normiert auf B2M. Dargestellt sind der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen aus Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 5; TGF- β_1 : n = 7; AdYB-1: n = 6; AdYB-1 + TGF- β_1 : n = 8) und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei TGF- β vs. Kontrolle (*) p = 0,012, bei AdYB-1 vs. Kontrolle (*) p = 0,011 und bei TGF- β vs. AdYB-1 + TGF- β (#) p = 0,025.

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, erhöhte sich nach einer 12-stündigen Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) die relative JunD-mRNA-Expression signifikant von 100 ± 32,52 % (Kontrolle) auf 338,47 ± 15,70 % (TGF- β_1). Nach 19 Stunden Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 lag die relative JunD-mRNA-Expression bei 382,47 ± 16,40 %

(AdYB-1). Nach kombinierter 12-stündiger Stimulation mit TGF- β_1 (1 ng / ml) und 19-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 erniedrigte sich die relative JunD-mRNA-Expression signifikant auf $148,88 \pm 13,25$ (AdYB-1 + TGF- β_1).

Die alleinige Stimulation mit TGF- β_1 führt in Kardiomyozyten zu einer signifikant erhöhten JunD-mRNA-Expression. Die AP-1-Untereinheit JunD spielt eine wichtige pro-apoptotische Rolle in der TGF- β induzierten Apoptose (vergleiche 2.2.4). Eine Überexpression von YB-1 hat in Kombination mit TGF- β_1 einen hemmenden Einfluss auf die relative JunD-mRNA-Expression in Herzmuskelzellen. Dies könnte die anti-apoptotische Wirkung der YB-1-Überexpression erklären. Eine alleinige Überexpression von YB-1 erhöht hingegen die relative JunD-mRNA-Expression in Kardiomyozyten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von YB-1 in Kombination mit TGF- β_1 einen hemmenden Einfluss auf die relative SMAD4-, JunB- und JunD-mRNA-Expression in Kardiomyozyten hat. Die genannten Faktoren spielen eine wichtige pro-apoptotische Rolle in der Apoptose-Induktion durch TGF- β_1 (vergleiche Abbildung 2). Dies könnte die anti-apoptotische Wirkung der YB-1-Überexpression erklären.

5.2.1.2 YB-1 erhöht die relative SMAD7-Protein-Expression in Kardiomyozyten

Die in Kardiomyozyten nachgewiesene Erhöhung der relativen SMAD7-mRNA-Expression durch eine Überexpression von YB-1 (siehe Abbildung 35) sollte in Kardiomyozyten auf Protein-Ebene analysiert werden. Kardiomyozyten wurden 27 Stunden mit AdYB-1 (1000 MOI) infiziert und 20 Stunden mit TGF- β_1 (1 ng / ml) stimuliert. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit SMAD7-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

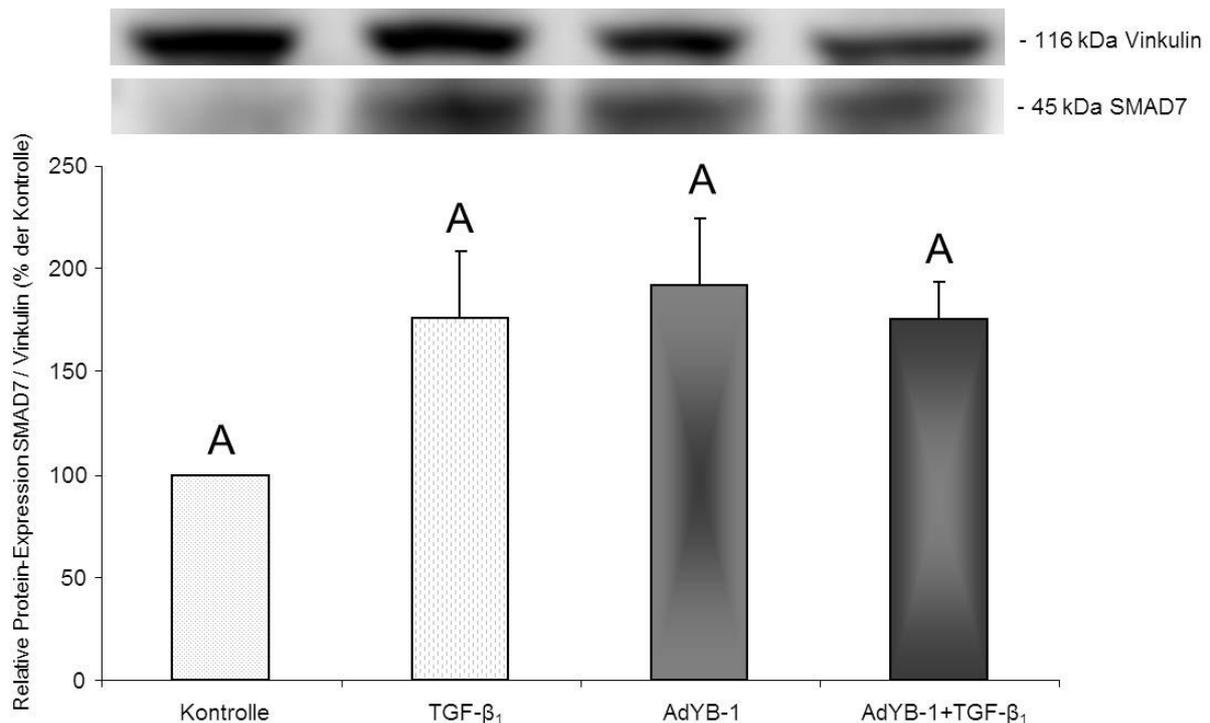


Abbildung 38: Relative SMAD7-Protein-Expression in Kardiomyozyten nach 27-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 und 20-stündiger Stimulation mit TGF-β₁ (1 ng / ml). Immunoblot aus 55 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler.

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, zeigte sich im Immunoblot eine tendenzielle Steigerung der relativen SMAD7-Protein-Expression unter TGF-β₁ (176,39 ± 31,86 %) verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (100 ± 0,00 %). Eine alleinige Überexpression von YB-1 zeigte eine tendenzielle Erhöhung der relativen SMAD7-Protein-Expression auf 191,93 ± 32,14 %. Nach kombinierter Überexpression von YB-1 und Gabe von TGF-β₁ konnte ein Anstieg der relativen SMAD7-Protein-Expression auf 175,59 ± 17,73 % festgestellt werden.

Das I-SMAD7-Protein spielt eine wichtige anti-apoptische Rolle in der TGF-β₁ induzierten Apoptose (vergleiche Abbildung 2). Wie in Abbildung 38 zu erkennen, führte die alleinige Stimulation mit TGF-β₁ in Kardiomyozyten zu einer tendenziell erhöhten SMAD7-Protein-Expression. Eine Überexpression von YB-1 hat sowohl alleine als auch in Kombination mit TGF-β₁ eine Steigerung der relativen SMAD7-Protein-Expression in Herzmuskelzellen zur Folge.

5.3 Der Einfluss von YB-1 auf eine durch PE induzierte Hypertrophie

Während die durch TGF- β_1 induzierte Apoptose sowohl AP-1- als auch SMAD-abhängig ist (Euler-Taimor & Heger, 2006), kommt den SMAD-Proteinen in einer PE induzierten Hypertrophie keine besondere Rolle zu. In der α -adrenerg induzierten Hypertrophie durch PE spielt AP-1 alleine eine große Rolle (Taimor et al., 2004). Da YB-1 sowohl mit AP-1 (Samuel et al., 2005) als auch mit SMAD-Proteinen (Higashi, 2006) interagiert, sollte der Einfluss einer YB-1-Überexpression auf eine durch PE induzierte Hypertrophie untersucht werden.

5.3.1 Kardiomyozyten

5.3.1.1 YB-1 hemmt eine durch PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten

Es ist beschrieben, dass YB-1 einen inhibitorischen Effekt auf AP-1 hat (Samuel et al., 2005). Da AP-1 eine Rolle in der Phenylephrin induzierten Hypertrophie spielt (Taimor et al., 2004), wurde von Partsch im Jahre 2009 im Langzeitversuch die Wirkung einer Überexpression von YB-1 auf eine Hypertrophie-Induktion durch PE untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine sehr hohe Überexpression von YB-1 nach einer 48-stündigen Infektion die PE induzierte Hypertrophie hemmt. Um die Auswirkung einer kurzzeitigen und somit schwachen YB-1-Überexpression auf die PE induzierte Hypertrophie zu untersuchen, wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen mit 1000 MOI AdYB-1 und zwei weitere Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert. Zwei Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Nach siebenstündiger Infektion wurde jeweils eine Schale von jeder Gruppe mit 10 μ M PE inkubiert. Weitere 24 Stunden später wurde eine Zellquerschnittsmessung mittels BZ Observation[®] / Analyzer[®]-Software durchgeführt.

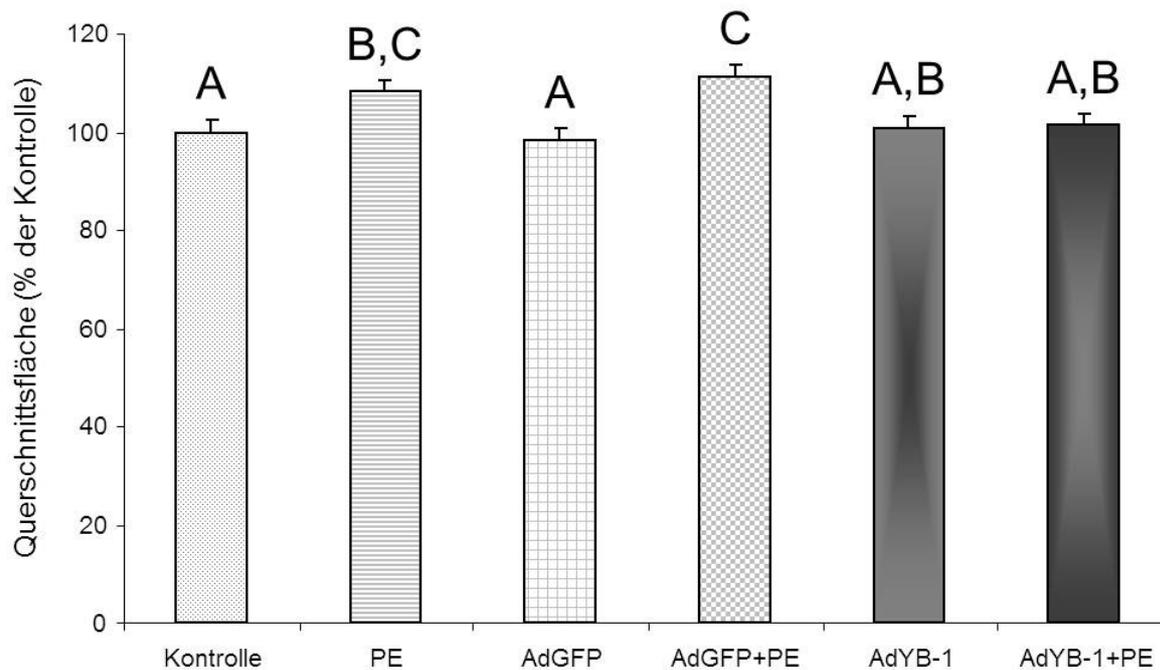


Abbildung 39: Quantitative Darstellung der Zellquerschnittsfläche von Kardiomyozyten nach 31-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 oder AdGFP und 24-stündiger Stimulation mit PE (10 μ M). Dargestellt sind der Mittelwert von 14 Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Wie Abbildung 39 zeigt, kam es in der Kontrollgruppe nach Hypertrophie-Induktion mit PE zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $100 \pm 2,34$ % (Kontrolle) auf $108,20 \pm 2,30$ % (PE). Auch in der mit 1000 MOI AdGFP infizierten Gruppe kam es nach Induktion durch PE zur signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $98,31 \pm 2,25$ % (AdGFP) auf $111,29 \pm 2,30$ (AdGFP + PE). Dagegen kam es in der mit 1000 MOI AdYB-1 infizierten Gruppe auch nach Inkubation mit PE nicht zu einer Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche ($100,57 \pm 2,62$ % ohne PE; $101,42 \pm 2,34$ % mit PE).

Dieser Versuch zeigt, dass YB-1 auch im Kurzzeitversuch, also bei geringer YB-1-Expression, die durch Phenylephrin induzierte Hypertrophie hemmt. Es ist zu sehen, dass die Zellquerschnittsfläche unter AdYB-1 + PE auf Kontroll-Niveau bleibt.

Als weiterer Parameter einer Hypertrophie-Entwicklung unter PE wurde die Proteinbiosynthese-Rate nach 31-stündiger Überexpression von YB-1 ermittelt. Zur Untersuchung der Proteinbiosynthese-Rate wurden sechs Schalen mit 1000 MOI AdYB-1 und weitere sechs Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert.

Weitere sechs Schalen dienten als unbehandelte Kontrolle. Nach sieben Stunden Infektion wurde allen Schalen radioaktiv-markiertes Phenylalanin zugegeben und bei jeweils drei Schalen wurde die Hypertrophie mit PE (10 μ M) stimuliert. 24 Stunden später wurde die Proteinbiosynthese-Rate bestimmt.

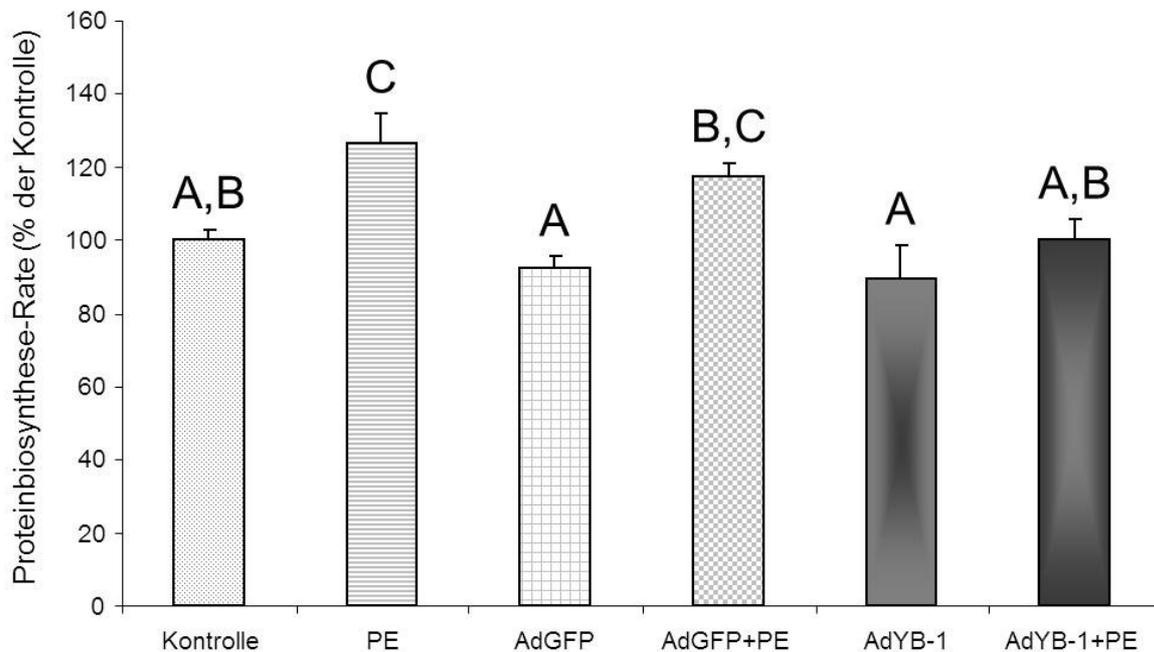


Abbildung 40: Quantitative Darstellung der relativen Proteinbiosynthese-Rate nach 31 Stunden Infektion mit 1000 MOI AdYB-1, bzw. AdGFP. Stimulation mit PE (10 μ M) für 24 Stunden. Gemessen wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Phenylalanin. Dargestellt sind der Mittelwert verschiedener Anzahlen von Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 13; PE: n = 13; AdGFP: n = 10; AdGFP + PE: n = 11; AdYB-1: n = 11; AdYB-1 + PE: n = 10) und zugehöriger Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Wie Abbildung 40 zeigt, kam es in der Kontrollgruppe nach Hypertrophie-Induktion durch PE zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $100 \pm 2,54$ % (Kontrolle) auf $126,35 \pm 8,25$ % (PE). Auch nach Infektion mit 1000 MOI AdGFP kam es nach Induktion durch PE zur signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $92,63 \pm 2,71$ % (AdGFP) auf $117,45 \pm 3,32$ % (AdGFP + PE). Im Gegensatz dazu blieb nach Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 die durch PE ausgelöste Hypertrophie aus ($89,36 \pm 9,38$ ohne PE; $100,27 \pm 5,44$ mit PE).

Dieser Versuch zeigt, dass YB-1 auch im Kurzzeitversuch, also bei geringer YB-1-Expression, die durch Phenylephrin induzierte Hypertrophie hemmt. Es ist zu sehen, dass die Proteinbiosynthese-Rate unter AdYB-1 + PE auf Kontroll-Niveau bleibt.

Der hemmende Effekt von YB-1 auf die Phenylephrin induzierte Hypertrophie konnte auch im Kurzzeitversuch, also bei niedriger YB-1-Expression, durch Messung der Proteinbiosynthese-Rate und der Zellquerschnittsfläche nachgewiesen werden.

5.3.1.2 YB-1 erhöht die relative RGS2-mRNA-Expression in Kardiomyozyten

Es wurde untersucht, ob die hemmende Wirkung von YB-1 auf eine PE induzierte Hypertrophie durch eine Beeinflussung der Expression der an den Hypertrophie-Vorgängen beteiligten Signalmolekülen ausgelöst wird. RGS2 ist ein bekannter Inhibitor der PE induzierten Hypertrophie in Kardiomyozyten (Zou et al., 2006). Herzmuskelzellen wurden für 31 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 infiziert und für 24 Stunden mit PE (1 μ M) stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Zeit wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und nach DNase-Verdau in cDNA umgeschrieben. Danach folgte eine quantitative Real-Time-PCR mit Primern für RGS2 zum Nachweis der relativen RGS2-mRNA-Menge. B2M diente als Referenz-Gen.

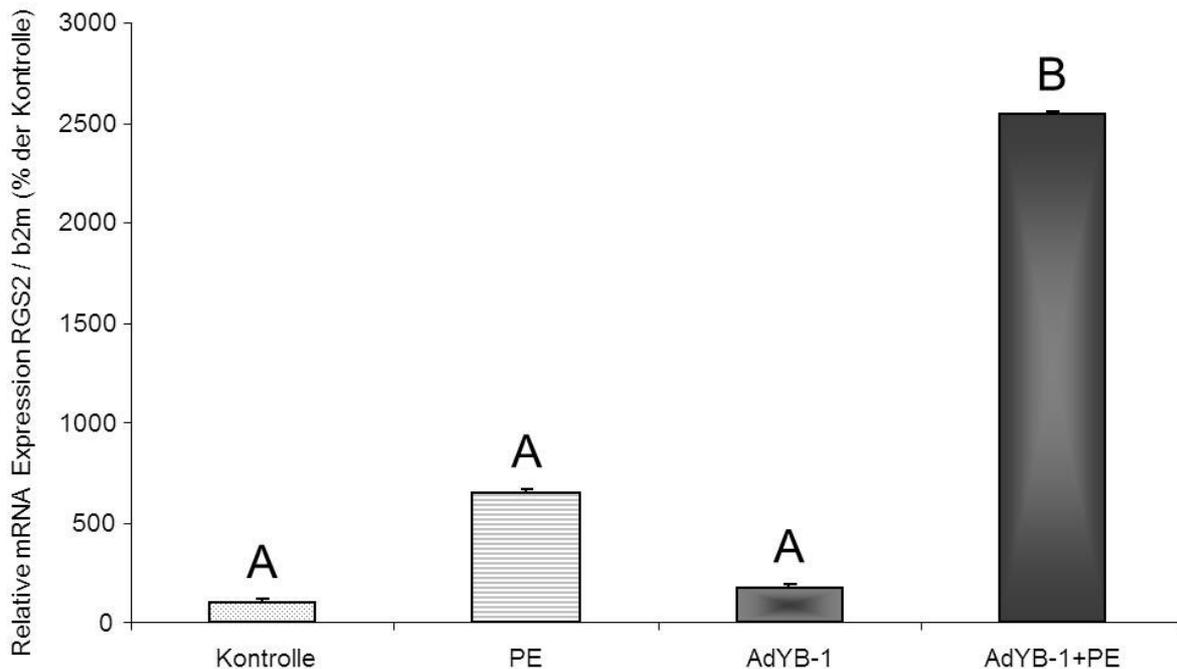


Abbildung 41: Relative RGS2-mRNA-Expression in einer quantitativen Real-Time-PCR. Infektion der Kardiomyozyten für 31 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und Stimulation mit PE (1 μ M) für 24 Stunden. Dargestellt sind der Mittelwert aus sechs Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Wie Abbildung 41 zeigt, erhöhte sich nach einer 24-stündigen Stimulation mit PE (1 μ M) die relative RGS2-mRNA-Expression tendenziell von $100 \pm 11,40$ % (Kontrolle) auf $650,89 \pm 18,79$ % (PE). Nach 31 Stunden Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 lag die relative Expression von RGS2 bei $174,48 \pm 20,54$ % (AdYB-1). Nach kombinierter 24-stündiger Stimulation mit PE (1 μ M) und 31-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 erhöhte sich die relative RGS2-mRNA-Expression auf $2541,03 \pm 14,41$ % (AdYB-1 + PE).

Eine Überexpression von YB-1 steigert in Kombination mit PE in Herzmuskelzellen die relative Expression des Hypertrophie-Inhibitors RGS2. Dies kommt als eine mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts von YB-1 auf eine PE induzierte Hypertrophie in Frage.

5.3.1.3 YB-1 erhöht die relative SMAD4-Protein-Expression in Kardiomyozyten

SMAD4 ruft eine Hemmung der PE induzierten Hypertrophie in Kardiomyozyten hervor (Heger et al., 2010). Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von YB-1 auf die relative SMAD4-Protein-Expression in Kardiomyozyten Einfluss nimmt, wurden Kardiomyozyten für 48 Stunden mit AdYB-1 infiziert (1000 MOI). Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit SMAD4-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

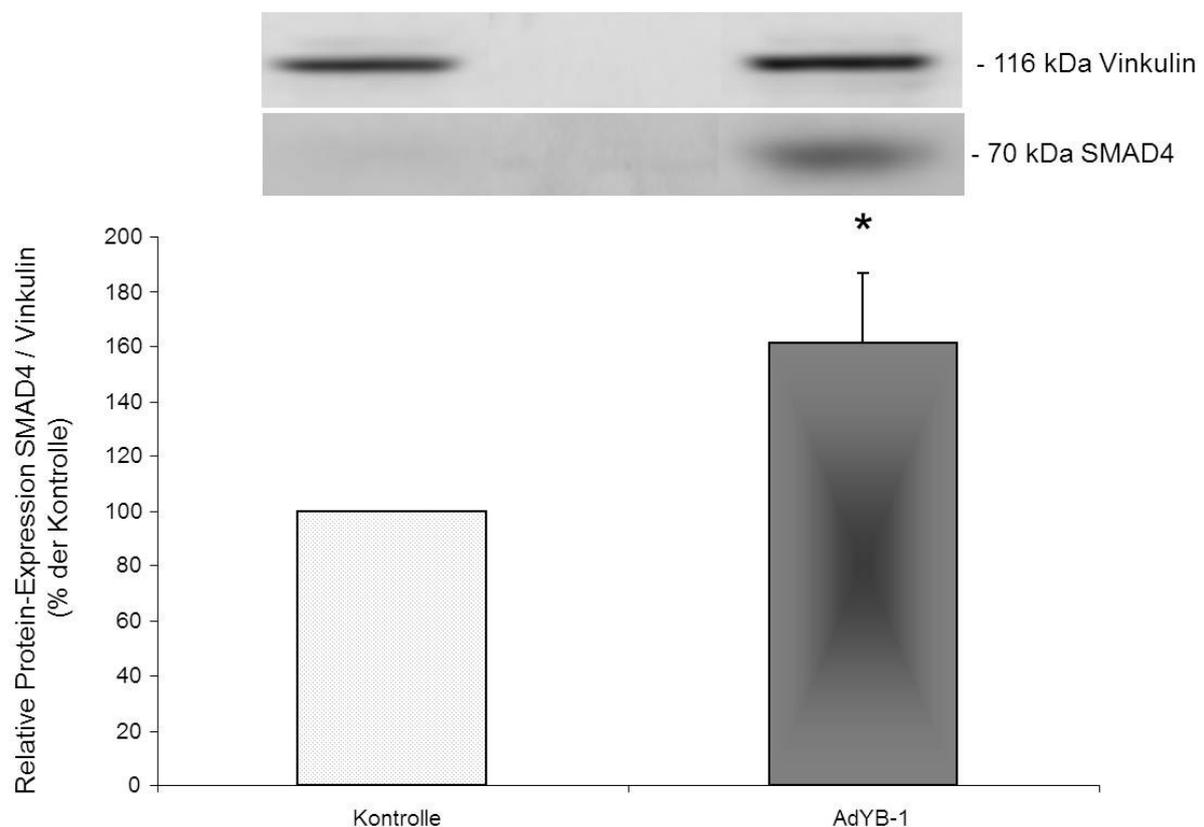


Abbildung 42: Relative SMAD4-Protein-Expression nach 48-stündiger Infektion mit AdYB-1 (1000 MOI). Immunoblot aus 55 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus fünf Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei AdYB-1 vs. Kontrolle (*) $p = 0,014$.

In Abbildung 42 ist zu sehen, dass sich im Immunoblot eine Steigerung der relativen SMAD4-Protein-Expression unter AdYB-1 ergab. Nach 48 Stunden konnte mit $161,34 \pm 25,73$ % (AdYB-1) ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 0,00$ %) festgestellt werden.

Eine YB-1-Überexpression steigert somit die relative Protein-Expression des Hypertrophie-Inhibitors SMAD4 in Kardiomyozyten. Dies kommt als eine mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts von YB-1 auf eine PE induzierte Hypertrophie in Frage.

5.3.2 H9c2-Zellen

Auf eine Phenylephrin-Induktion reagieren H9c2-Zellen ähnlich wie Kardiomyozyten mit hypertrophem Wachstum. Jeong et al. zeigten im Jahre 2008 eine 2,3-fache vergrößerte Zellquerschnittsfläche von H9c2-Zellen nach PE-Stimulation.

5.3.2.1 YB-1 erhöht die relative RGS2-Protein-Expression in H9c2-Zellen

Die in Kardiomyozyten (vergleiche Abbildung 41) nachgewiesene Erhöhung der relativen RGS2-mRNA-Expression durch eine kombinierte Gabe von AdYB-1 und Phenylephrin sollte nun in H9c2-Zellen untersucht werden. H9c2-Zellen wurden 24 Stunden mit PE (1 μ M) stimuliert und 48 Stunden mit AdYB-1 (500 MOI) infiziert. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach einer Protein-Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit RGS2-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

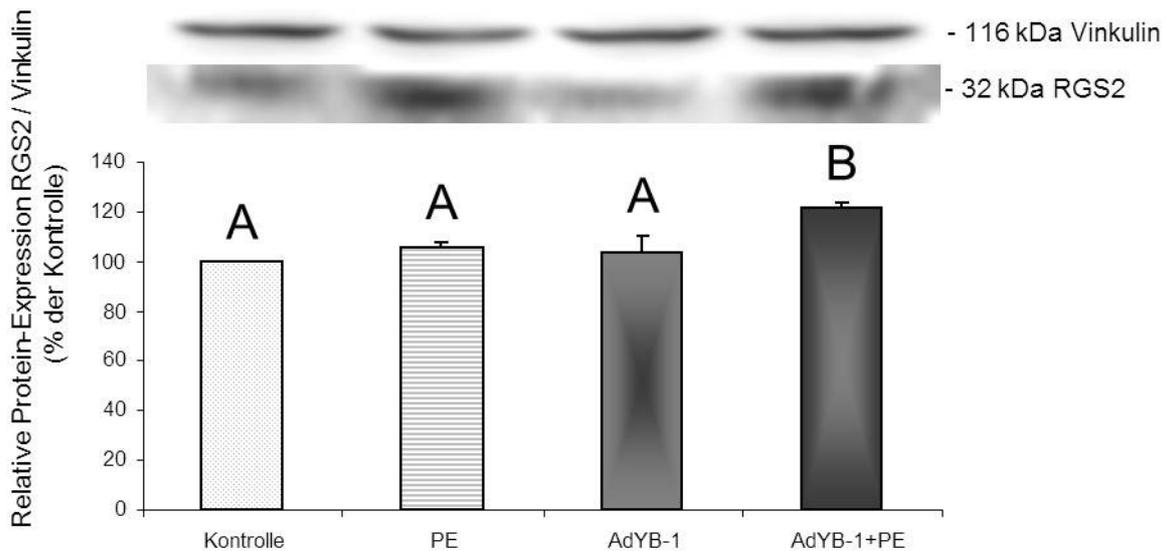


Abbildung 43: Relative RGS2-Protein-Expression nach 24-stündiger Stimulation mit PE (1 μ M) und 48-stündiger Infektion mit AdYB-1 (500 MOI) in H9c2-Zellen. Immunoblot aus 60 μ g Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert einer verschiedenen Anzahl von Zellpassagen (Kontrolle: n = 5; PE: n = 5; AdYB-1: n = 5; AdYB-1 + PE: n = 3) und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Abbildung 43 zeigt eine Steigerung der relativen RGS2-Protein-Expression unter kombinierter Gabe von AdYB-1 und PE auf $121,58 \pm 2,50$ % (AdYB-1 + PE). Phenylephrin und AdYB-1 hatten einzeln keinen Einfluss auf die relative RGS2-Protein-Expression ($105,30 \pm 2,39$ % PE; $103,78 \pm 13,82$ % AdYB-1).

Der Hypertrophie-Inhibitor RGS2 wird somit in H9c2-Zellen auf Protein-Ebene unter Stimulation mit PE und gleichzeitiger YB-1 Überexpression vermehrt exprimiert. Dies kommt als eine mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts von YB-1 auf eine PE induzierte Hypertrophie in Frage.

5.3.2.2 YB-1 erhöht die relative SMAD4-Protein-Expression in H9c2-Zellen

Eine Überexpression von YB-1 führt in Kardiomyozyten zu einer erhöhten relativen SMAD4-Protein-Expression (siehe Abbildung 42). Um dieses in H9c2-Zellen zu überprüfen, wurden diese für 48 Stunden mit AdYB-1 infiziert (500 MOI). Nach der entsprechenden Zeit wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach einer Protein-

Bestimmung nach LOWRY wurde ein Immunoblot mit SMAD4-Antikörpern durchgeführt. Vinkulin diente als Referenz-Protein.

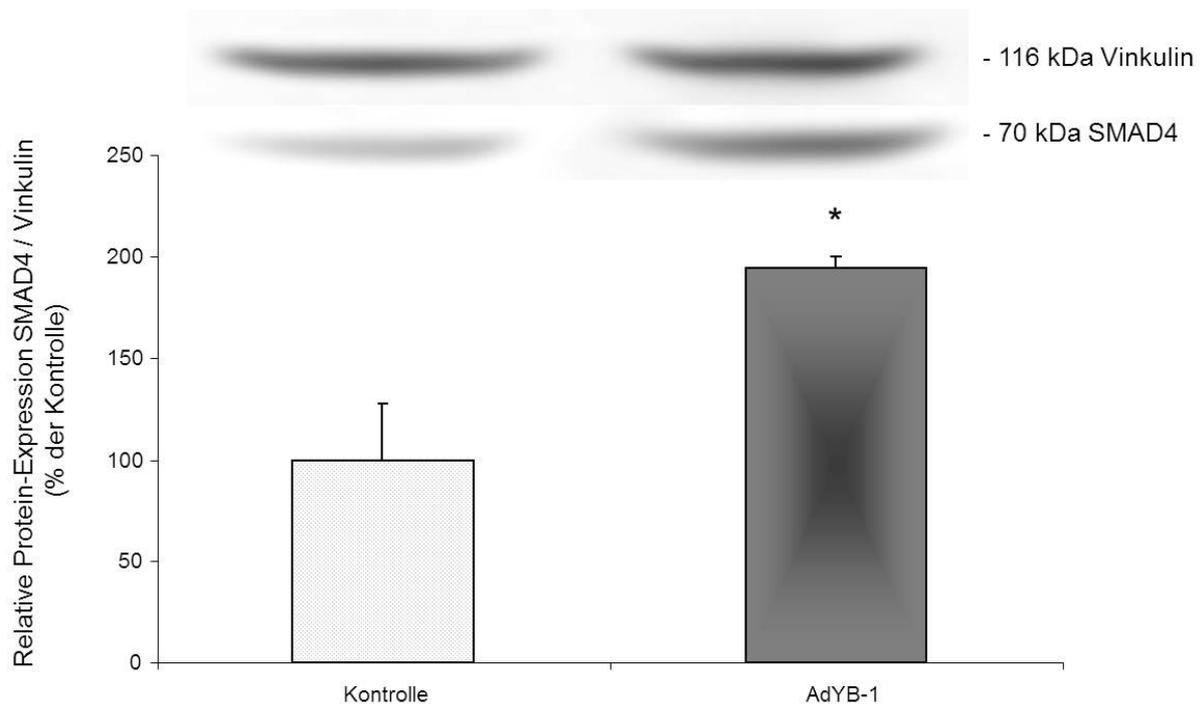


Abbildung 44: Relative SMAD4-Protein-Expression nach 48-stündiger Infektion mit AdYB-1 (500 MOI) in H9c2-Zellen. Immunoblot aus 60 µg Gesamtprotein normiert auf Vinkulin. Oben: Repräsentativer Blot, unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt sind der Mittelwert aus sechs Zellpassagen und der zugehörige Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach Mann-Whitney-Test bei AdYB-1 vs. Kontrolle (*) $p = 0,018$.

Wie in Abbildung 44 zu sehen ist, zeigte sich im Immunoblot eine Steigerung der relativen SMAD4-Protein-Expression unter AdYB-1. Nach 48 Stunden mit $194,44 \pm 5,41$ % konnte ein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 27,73$ %) festgestellt werden.

Die relative SMAD4-Protein-Expression steigt auch in H9c2-Zellen unter YB-1 Überexpression. Dies kommt als eine mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts von YB-1 auf eine PE induzierte Hypertrophie in Frage.

5.4 Der Einfluss von YB-1 auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie

5.4.1 Kardiomyozyten

5.4.1.1 YB-1 hat keinen Einfluss auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten

Es ist bekannt, dass GDF-15 in Kardiomyozyten Hypertrophie auslöst (Heger et al., 2010). Diese Hypertrophie wird im Gegensatz zu PE unter anderem über SMAD-Proteine vermittelt. Um die Auswirkung einer 31-stündigen und somit relativ schwachen Überexpression von YB-1 auf die durch GDF-15 induzierte Hypertrophie zu untersuchen, wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen mit 1000 MOI AdYB-1 und zwei weitere Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert. Zwei Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Nach siebenstündiger Infektion wurde jeweils eine Schale von jeder Gruppe mit GDF-15 (3 ng / ml) inkubiert. Weitere 24 Stunden später wurde die Zellquerschnittsmessung mittels BZ Observation[®] / Analyzer[®]-Software durchgeführt.

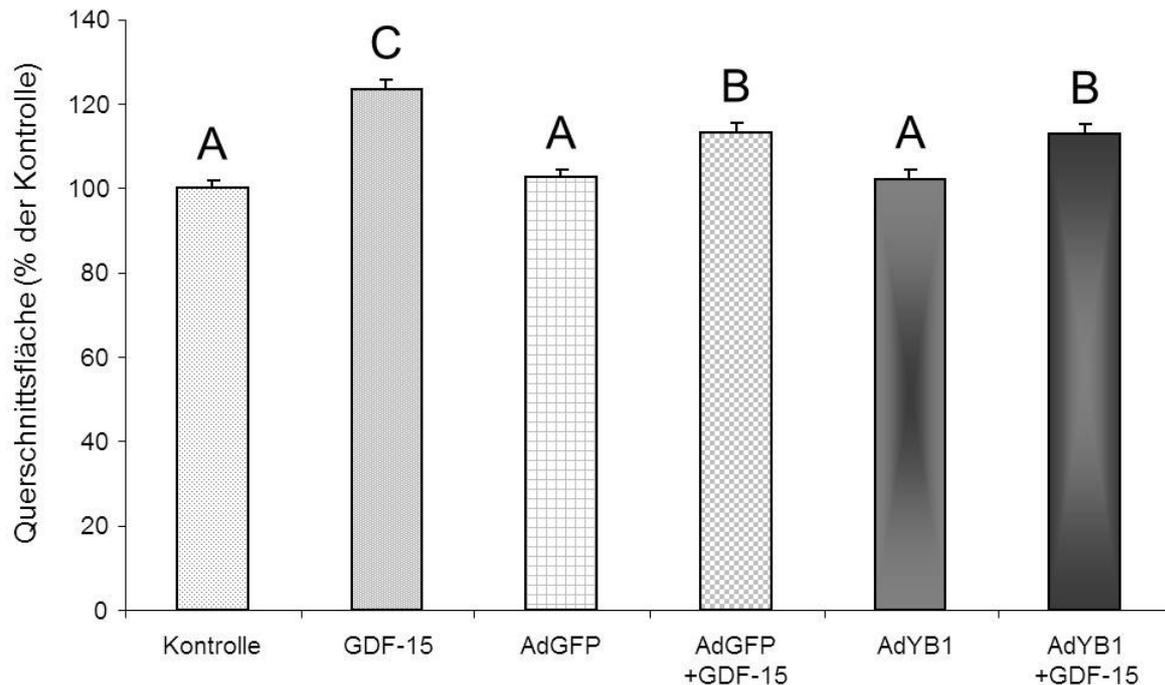


Abbildung 45: Quantitative Darstellung der Zellquerschnittsfläche von Kardiomyozyten nach 31-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 oder AdGFP und 24-stündiger Stimulation mit GDF-15 (3 ng / ml). Dargestellt sind der Mittelwert aus 11 Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Wie die Abbildung 45 zeigt, kam es bei der Kontrollgruppe nach Hypertrophie-Induktion mit GDF-15 zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $100 \pm 1,94$ % (Kontrolle) auf $123,40 \pm 2,22$ % (GDF-15). Auch in der mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infizierten Gruppe kam es nach Induktion durch GDF-15 zur signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $102,45 \pm 2,14$ % (AdGFP) auf $113,50 \pm 2,06$ % (AdGFP + GDF-15). In der mit 1000 MOI AdYB-1 infizierten Gruppe kam es nach Inkubation mit GDF-15 ebenfalls zu einer Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche ($102,24 \pm 2,23$ % ohne GDF-15; $112,97 \pm 2,34$ % mit GDF-15).

Eine 31-stündige Überexpression von YB-1 hat keinen Einfluss auf die durch GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten, hier dargestellt in Form der Zellquerschnittsfläche. Eine Größenzunahme der Kardiomyozyten findet also auch unter YB-1-Überexpression statt.

Als weiterer Parameter einer Hypertrophie-Entwicklung wurde die Proteinbiosynthese-Rate nach 31-stündiger Überexpression von YB-1 ermittelt. Es wurden sechs Schalen Kardiomyozyten mit 1000 MOI AdYB-1 und weitere sechs Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert. Weitere sechs Schalen dienten als unbehandelte Kontrolle. Nach sieben Stunden Infektion wurde allen Schalen radioaktiv markiertes Phenylalanin zugegeben und bei jeweils drei Schalen wurde zusätzlich die Hypertrophie mit GDF-15 (3 ng / ml) stimuliert. 24 Stunden später wurde die Proteinbiosynthese-Rate bestimmt.

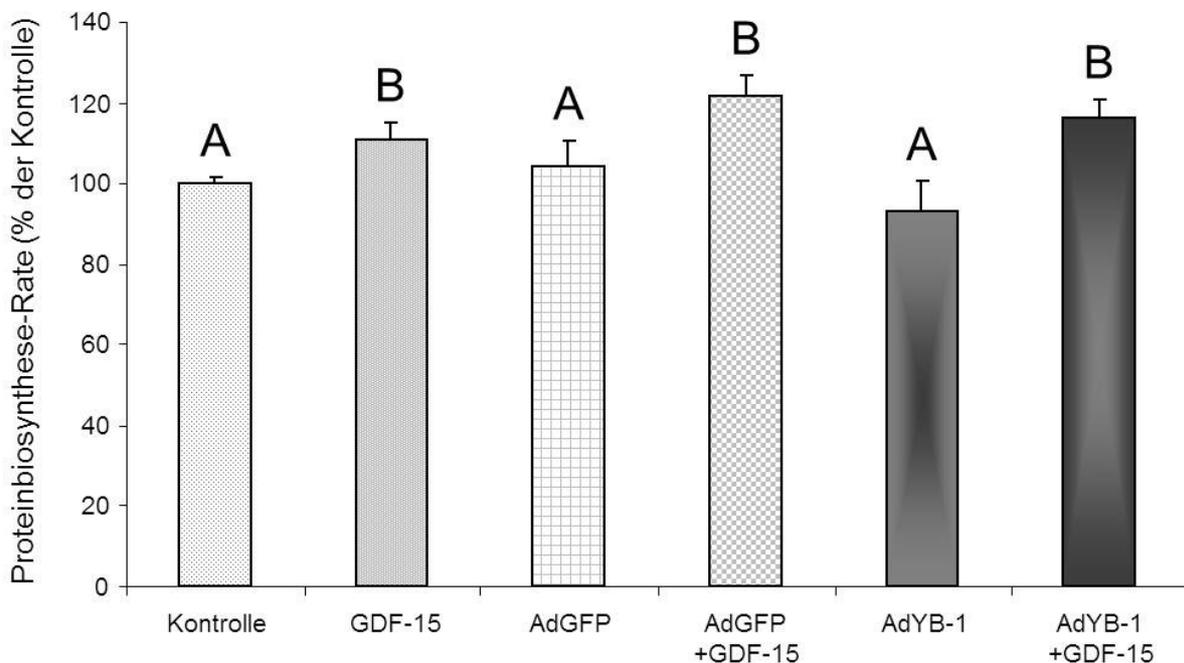


Abbildung 46: Quantitative Darstellung der relativen Proteinbiosynthese-Rate nach 31 Stunden Infektion mit 1000 MOI AdYB-1, bzw. AdGFP. Stimulation mit GDF-15 (3 ng / ml) für 24 Stunden. Dargestellt sind der Mittelwert verschiedener Anzahlen von Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 14; GDF-15: n = 14; AdGFP: n = 16; AdGFP + GDF-15: n = 16; AdYB-1: n = 16; AdYB-1 + GDF-15: n = 16) und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Wie Abbildung 46 zeigt, kam es in der Kontrollgruppe nach Hypertrophie-Induktion mit GDF-15 zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $100 \pm 1,37$ % (Kontrolle) auf $111,05 \pm 4,27$ % (GDF-15). Auch nach Infektion mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP kam es nach Induktion durch GDF-15 zur signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $104,17 \pm 6,39$ % (AdGFP) auf $121,87 \pm 4,86$ % (AdGFP + GDF-15). Im Gegensatz zu einer Hypertrophie-Reduktion durch YB-1-Überexpression unter PE-Stimulation fand man nach Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 keine Reduktion der Hypertrophie unter GDF-15 ($93,18 \pm 7,24$ ohne GDF-15; $116,25 \pm 4,56$ mit GDF-15).

Auch die Messung der Proteinbiosynthese-Rate ergab, dass kein Einfluss einer 31-stündigen YB-1-Überexpression auf eine GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte.

Um den Langzeiteffekt und den Einfluss einer hohen Überexpression von YB-1 auf eine GDF-15 induzierte Hypertrophie in Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden zwei Schalen mit Herzmuskelzellen für 48 Stunden mit 1000 MOI AdYB-1 und zwei weitere Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert. Zwei Schalen dienten als nicht infizierte Kontrolle. Nach 24-stündiger Infektion wurde jeweils eine Schale von jeder Gruppe mit GDF-15 (3 ng / ml) inkubiert. Weitere 24 Stunden später wurde eine Zellquerschnittsmessung mittels BZ Observation[®] / Analyzer[®]-Software durchgeführt.

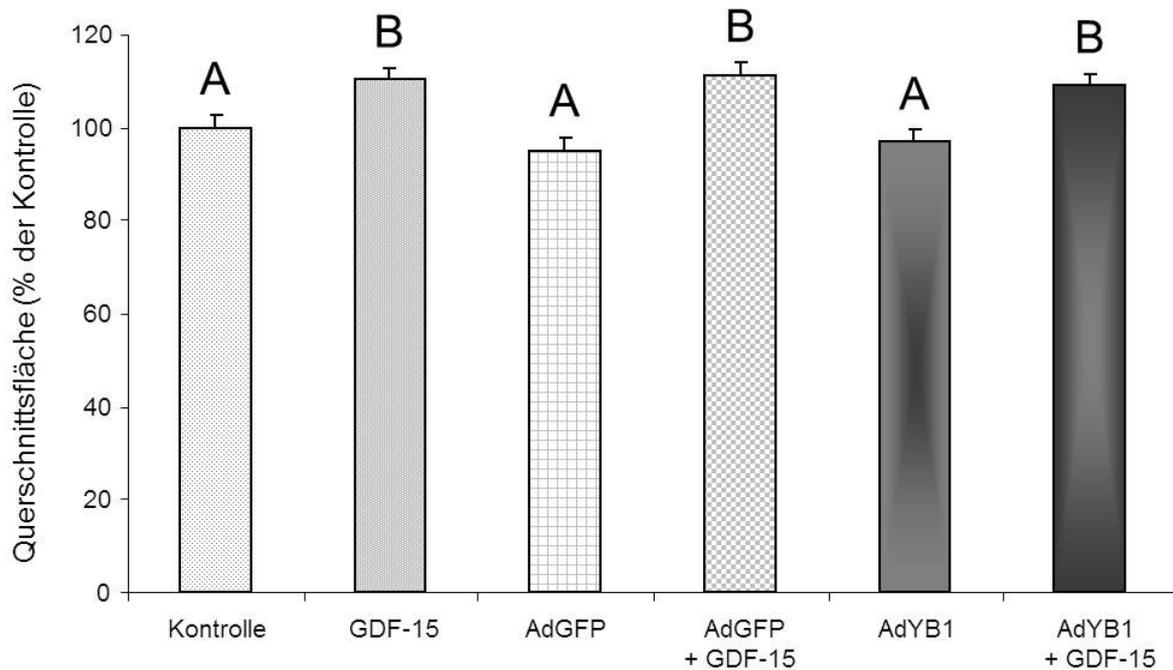


Abbildung 47: Quantitative Darstellung der Zellquerschnittsfläche von Kardiomyozyten nach 48-stündiger Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 oder AdGFP und 24-stündiger Stimulation mit GDF-15 (3 ng / ml). Dargestellt sind der Mittelwert aus neun Kardiomyozyten-Präparationen und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Abbildung 47 zeigt, dass es in der Kontrollgruppe nach Induktion mit GDF-15 zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $100 \pm 2,57$ % (Kontrolle) auf $110,16 \pm 2,64$ % (GDF-15) kam. Auch in der mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infizierten Gruppe kam es nach Induktion durch GDF-15 zur signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche von $95,00 \pm 2,79$ % (AdGFP) auf $111,13 \pm 2,65$ % (AdGFP + GDF-15). In der mit 1000 MOI AdYB-1 infizierten Gruppe kam es nach Inkubation mit GDF-15 ebenfalls zu einer Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche ($97,13 \pm 2,53$ % ohne GDF-15; $109,03 \pm 2,70$ % mit GDF-15).

Der Langzeitversuch zeigt, dass eine 48-stündige Überexpression von YB-1 keinen Einfluss auf die durch GDF-15 induzierte Hypertrophie hat. Die Zellquerschnittsfläche erhöhte sich in allen mit GDF-15 stimulierten Versuchsgruppen signifikant.

Als weiterer Parameter einer Hypertrophie-Entwicklung unter GDF-15 wurde die Proteinbiosynthese-Rate nach 48-stündiger Überexpression von YB-1 ermittelt. Es wurden sechs Schalen Kardiomyozyten mit 1000 MOI AdYB-1 und weitere sechs Schalen mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP infiziert. Weitere sechs Schalen dienten als unbehandelte Kontrolle. Nach 24 Stunden Infektion wurde allen Schalen radioaktiv markiertes Phenylalanin zugegeben und bei jeweils drei Schalen wurde zusätzlich die Hypertrophie mit GDF-15 (3 ng / ml) stimuliert. 24 Stunden später wurde die Proteinbiosynthese-Rate bestimmt.

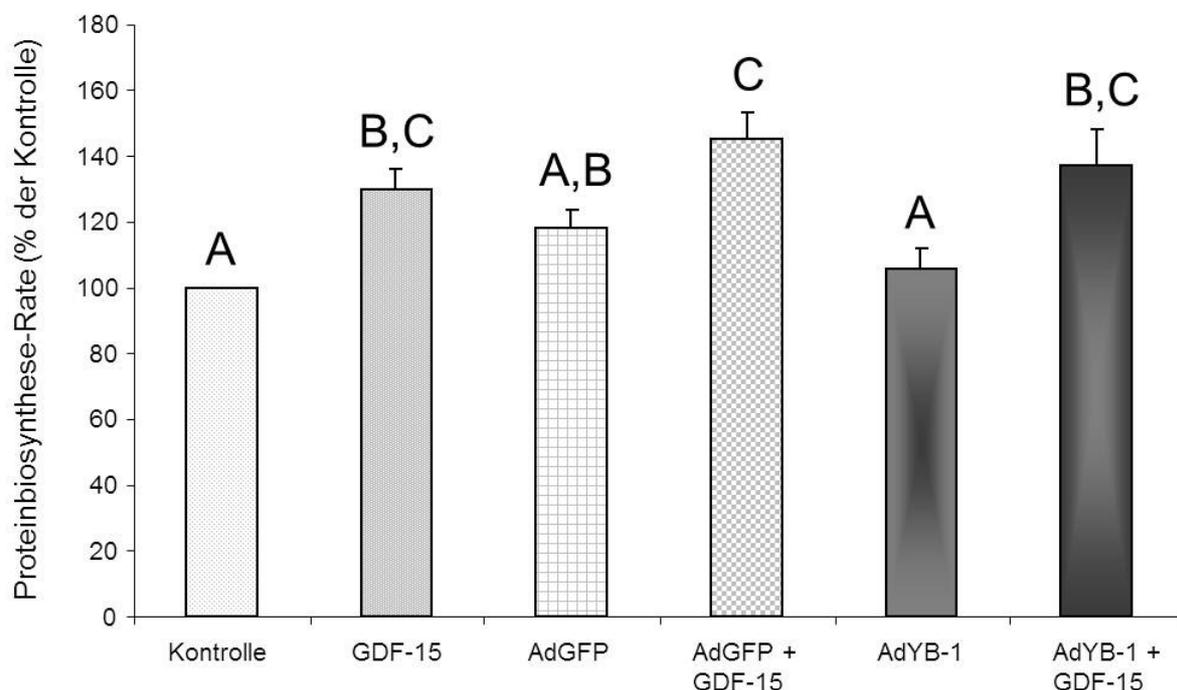


Abbildung 48: Quantitative Darstellung der relativen Proteinbiosynthese-Rate nach 48 Stunden Infektion mit 1000 MOI AdYB-1, bzw. AdGFP. Stimulation mit GDF-15 (3 ng / ml) für 24 Stunden. Dargestellt sind der Mittelwert verschiedener Anzahlen von Kardiomyozyten-Präparationen (Kontrolle: n = 17; GDF-15: n = 10; AdGFP: n = 16; AdGFP + GDF-15: n = 10; AdYB-1: n = 17; AdYB-1 + GDF-15: n = 10) und der zugehörige Standardfehler. Nach ANOVA signifikant unterschiedliche Gruppen ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet.

Abbildung 48 zeigt, dass es in der Kontrollgruppe nach Hypertrophie-Induktion mit GDF-15 zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $100 \pm 0,00$ % (Kontrolle) auf $129,99 \pm 6,21$ % (GDF-15) kam. Auch nach Infektion mit 1000 MOI des Kontrollvirus AdGFP kam es nach Induktion durch GDF-15 zur signifikanten Erhöhung der relativen Proteinbiosynthese-Rate von $118,42 \pm 5,17$ %

(AdGFP) auf $145,35 \pm 7,87\%$ (AdGFP + GDF-15). Nach Infektion mit 1000 MOI AdYB-1 fand man ebenfalls diese durch GDF-15 ausgelöste Hypertrophie ($105,78 \pm 6,24\%$ ohne GDF-15; $137,35 \pm 10,63\%$ mit GDF-15).

Auch die Messung der Proteinbiosynthese-Rate zeigt, dass eine 48-stündige YB-1-Überexpression keinen Einfluss auf eine GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten hat.

Eine Überexpression von YB-1 in Kardiomyozyten hat sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch keinen Einfluss auf eine GDF-15 induzierte Hypertrophie.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche YB-1-Signalwege zur Hemmung einer durch TGF- β_1 induzierten Apoptose und einer durch PE induzierten Hypertrophie aufgezeigt. Die Beeinflussung einer Hypertrophie durch YB-1, die durch GDF-15 induziert wurde, konnte in Kardiomyozyten der adulten Ratte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde der Einsatz von H9c2-Zellen als Modell für eine adenovirale Überexpression des YB-1-Proteins etabliert sowie ihre Ansprechbarkeit auf TGF- β_1 gezeigt.

6.1 H9c2-Zelllinie ergänzt Kardiomyozyten-Modell zur Untersuchung von YB-1 und TGF- β_1

6.1.1 H9c2-Zellmodell

Um Untersuchungen durchführen zu können, die eine große Anzahl an Zellen voraussetzen, wurde eine Zelllinie gesucht, die möglichst viele Ähnlichkeiten mit adulten Kardiomyozyten aufweist. Die Wahl fiel hierbei auf die H9c2-Zelllinie, einen Subklon der klonalen Zelllinie des Herzgewebes embryonaler BDIX-Ratten, da diese viele ausgeprägte kardiale Eigenschaften besitzt, wie zum Beispiel die Expression nikotinerger Rezeptoren und die Synthese einer muskelspezifischen Kreatin-Phosphokinase (Kimes und Brandt, 1978). Hescheler et al. bewiesen im Jahre 1991, dass H9c2-Zellen kardial spezifische G-Proteine sowie spannungsabhängige Kalzium-Kanäle besitzen. Weiterhin ist die Oberflächenstruktur von H9c2-Zellen und Kardiomyozyten sehr ähnlich, denn beide Zellarten zeigen eine deutliche Mikrovilli-Ausbildung auf der Zelloberfläche (Hescheler et al., 1991). Weiterhin bilden H9c2-Zellen nach Konfluenz sogenannte Myofibrillen aus. Dieser Vorgang markiert den phänotypischen Übergang von kardialen zu skelettalen Muskelzellen (Menard et al., 1999).

6.1.2 TGF- β_1 -Ansprechbarkeit von H9c2-Zellen

In der vorliegenden Studie konnte eine weitere Übereinstimmung zwischen H9c2-Zellen und adulten Kardiomyozyten gezeigt werden. H9c2-Zellen sprechen auf eine TGF- β_1 -Stimulation (1 ng / ml) an, die bisher nur unzureichend in dieser Zelllinie untersucht worden ist. Es wurde gezeigt, dass TGF- β_1 in H9c2-Zellen eine SMAD2-Phosphorylierung hervorruft. Diese Phosphorylierung von SMAD-Proteinen in H9c2-Zellen entspricht der in adulten Kardiomyozyten beschriebenen Signalkaskade unter TGF- β_1 (Heger et al., 2011). Jedoch unterscheidet sich die Dauer der Phosphorylierung von SMAD2 in H9c2-Zellen und adulten Kardiomyozyten. In den hier durchgeführten Analysen zeigte sich, dass in H9c2-Zellen bereits nach 30 Minuten eine starke Phosphorylierung von SMAD2 stattfindet. Diese schwächt bereits nach 90 Minuten deutlich ab. In adulten Kardiomyozyten hingegen erreicht die SMAD2-Phosphorylierung ihren Höhepunkt erst nach 90 Minuten (Heger et al., 2011). Die hier gezeigte frühere Phosphorylierung von SMAD2 in H9c2-Zellen entspricht den Befunden von van Geest et al. im Jahre 2009 in Endothelzellen. Hier war bereits nach 30 Minuten ein starker Anstieg der SMAD2-Phosphorylierung zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass H9c2-Zellen wie auch Endothelzellen teilungsaktiv sind. Weiterhin lassen sich H9c2-Zellen und adulte Kardiomyozyten auch morphologisch unterscheiden. Adulte Kardiomyozyten sind mehrkernige, stäbchenförmige Zellen, können sich physiologisch nicht teilen (Auclair et al., 1980), und runden sich bereits nach wenigen Tagen in Zellkultur ab. H9c2-Zellen besitzen dagegen nur einen Kern, sind teilungsfähige und kubisch-geformte Zellen, die Ausläufer bilden und sich über eine längere Zeitspanne als Kardiomyozyten in Zellkultur verwenden lassen. Sie sind somit passagierbar, so dass eine hohe Anzahl von Zellen generiert werden kann. Hierdurch konnte eine höhere Protein-Ausbeute erzielt werden, als sie mit adulten Kardiomyozyten präparationsbedingt zu erreichen war.

In H9c2-Zellen ist bislang nur eine SMAD3-Phosphorylierung unter TGF- β_1 -Stimulation beschrieben worden (Yang et al., 2009). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich sowohl eine Phosphorylierung von SMAD2 als auch von SMAD3 nach einstündiger TGF- β_1 -Stimulation. Für Fibroblasten und Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass unter TGF- β_1 -Stimulation nach erfolgter Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 eine Komplexbildung mit dem Co-

120

SMAD4-Molekül stattfindet (Liu et al., 1997 und Lagna et al., 1996). Dieser heterotrimere Komplex wird in den Nukleus transloziert und fungiert dort als Transkriptionsfaktor (Euler-Taimor & Heger, 2006). In dieser Arbeit wurde nun erstmals eine Komplexbildung von P-SMAD2 und P-SMAD3 in H9c2-Zellen nachgewiesen. Dies stellt den ersten Nachweis dieser Interaktion von TGF- β_1 -Signal-molekülen in einer kardialen Zelllinie dar und ist somit ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des TGF- β_1 -Signalwegs in H9c2-Zellen.

In der hier durchgeführten Studie konnte zudem eine vermehrte SMAD7-Protein-Expression nach 24-stündiger TGF- β_1 -Stimulation in H9c2-Zellen nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass durch Bindung der phosphorylierten SMAD2- und SMAD3-Proteine eine Aktivierung des SMAD7-Promotors erfolgt, die zur Transkription als auch zur Translation von SMAD7 führt. Es ist gezeigt worden, dass SMAD7 ein TGF- β -Ziel-Gen darstellt, dessen Promotor SMAD-Bindungsstellen enthält (Denissova et al., 2000) und dessen Expression durch die Bindung von SMAD4 und SMAD3 induziert wird (Nagarajan et al., 1999). Es wurde auch von Nakao et al. im Jahre 1997 gezeigt, dass das inhibitorische SMAD7-Molekül unter TGF- β_1 -Stimulation vermehrt gebildet wird. SMAD7 hemmt die Phosphorylierung von R-SMAD-Proteinen (Nakao et al., 1997). Da die Phosphorylierung von R-SMAD-Proteinen bereits nach wenigen Stunden stattfindet, ist eine erhöhte SMAD7-Protein-Expression als Langzeit-Regulator der TGF- β_1 -Antwort zu bewerten.

In adulten Kardiomyozyten konnte mit Hilfe der Detektion von späten Apoptose-Vorgängen wie der Chromatinkondensation oder dem Nachweis von DNA-Leitern ein signifikanter Anstieg der Apoptose-Rate unter TGF- β_1 gezeigt werden (Partsch, 2009; Schneiders et al., 2005). Ein direkter pro-apoptotischer Effekt von TGF- β_1 ist in H9c2-Zellen in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Jedoch führt eine TGF- β_1 -Stimulation in H9c2-Zellen zu einer Erhöhung einer durch den α_1 -Adrenozeptorblocker Doxazosin induzierten Apoptose-Rate (Yang et al., 2009). Die Durchführung einer Chromatinkondensation-Detektion war in H9c2-Zellen nicht möglich, da sich in Teilung befindliche H9c2-Zellen nicht von apoptotischen Zellen unterscheiden lassen. Es wurden somit alternative Apoptose-Nachweise, wie die Detektion einer Kaspase-Aktivierung oder der Umbau der Plasmamembran verwendet. Diese zeigten eindeutig, dass TGF- β_1 in H9c2-Zellen pro-apoptotisch wirkt. Die Apoptose-Induktion durch TGF- β_1 hatte einen starken Einfluss auf die Translokation des Phosphatidylserins. Die Detektion der Translokation des

Phosphatidylserins als Nachweis von frühen Apoptose-Vorgängen ist in H9c2-Zellen bereits von Rajamani et al. im Jahre 2010 angewandt worden, wo Apoptose durch einen hohen Glukose-Anstieg ausgelöst wurde. In den hier durchgeführten Analysen hatte eine TGF- β_1 -Induktion eine relativ geringe Erhöhung der Kaspasen 3 / 7-Aktivität zur Folge. Auch Rajamani wandte erfolgreich die Messung der Aktivität der Kaspasen 3 / 7 in H9c2-Zellen an und fand eine im Verhältnis geringere Erhöhung der Kaspasen-Aktivität als eine Translokation des Phosphatidylserins. Auch Yang et al. wiesen im Jahre 2009 eine erhöhte Aktivität der Kaspase 3 in H9c2-Zellen nach Doxazosin-Stimulation nach. In den hier durchgeführten Analysen hatte eine TGF- β_1 -Induktion eine relativ geringe Erhöhung der Kaspasen 3 / 7-Aktivität zur Folge. Die geringe Erhöhung ist in H9c2-Zellen jedoch ausreichend, um Apoptose-Prozesse einzuleiten, da der Umbau der Membran bereits stattgefunden hat. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels zweier unabhängiger Apoptose-Nachweisverfahren ein direkter TGF- β_1 -Einfluss auf die Apoptose-Induktion in H9c2-Zellen nachgewiesen werden.

6.1.3 Funktionalität von AdYB-1 in H9c2-Zellen

Um die Funktionalität des in dieser Studie eingesetzten rekombinanten Adenovirus in H9c2-Zellen zu untersuchen, wurden H9c2-Zellen mit AdYB-1 infiziert. Auf mRNA-Ebene entsprachen sich die jeweiligen YB-1-mRNA-Expressionen nach 24 Stunden in H9c2-Zellen (ca. 330 %) und in adulten Kardiomyozyten (ca. 350 %). Auf Protein-Ebene war die beobachtete YB-1-Protein-Expression nach 24 Stunden in H9c2-Zellen (ca. 274 %) jedoch geringer als die von Stefan Partsch im Jahre 2009 analysierten YB-1-Protein-Expression in Kardiomyozyten (ca. 400 %). Dies könnte daran liegen, dass sich H9c2-Zellen teilen und damit die Proteinmenge nach Infektion noch etwas zunimmt, während sie bei adulten Kardiomyozyten gleichbleibt. Die Menge von YB-1 am Gesamtprotein variiert somit.

In H9c2-Zellen wurde eine Infektionsdosis von 500 MOI AdYB-1 eingesetzt, um die gewünschte YB-1-Expressionssteigerung zu erlangen. In adulten Kardiomyozyten wurden 1000 MOI AdYB-1 eingesetzt. Die schon beschriebenen morphologischen Unterschiede zwischen H9c2-Zellen und adulten Kardiomyozyten könnten für die unterschiedliche Infektionsdosis ursächlich sein. In anderen sich teilenden Zelltypen ist jedoch eine wesentlich geringere AdYB-1-Infektionsdosis beschrieben, wie in

A549-Zellen, in denen eine Infektionsdosis von 10-50 MOI eingesetzt wird (Glockzin et al., 2006). Für andere rekombinante Adenoviren wie dem AdEGFP (Lee et al., 2006) und dem AdHCMV-TK (Bengel et al., 2000) ist zudem in H9c2-Zellen eine wesentlich niedrigere Infektionsdosis von 10 MOI beschrieben. Eine Ursache für die in H9c2-Zellen höhere AdYB-1-Infektionsdosis könnte eine schlechtere Ablesbarkeit der YB-1-mRNA in der H9c2-Zelllinie sein.

Die subzelluläre Verteilung von YB-1 in H9c2-Zellen ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Ein gehäuftes Vorkommen von YB-1 innerhalb von bestimmten Zellkompartimenten kann einen Hinweis auf seine Funktionen in der Zelle geben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass YB-1 in unbehandelten H9c2-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vorhanden war. Es war im Verhältnis zum Zytoplasma eine größere Menge an YB-1 im Nukleus zu finden. YB-1 ist sowohl ein wichtiger Faktor der Transkription Wachstums-assoziiierter Gene (Kohno et al., 2003) als auch der Regulation der Translation (Evdokimova et al., 1995). Y-Box-Proteine werden vermehrt unter proliferativen Bedingungen, wie in embryonalen Geweben und in der fetalen Leber, exprimiert (Ladomery et al., 1995). Dies könnte der Grund für die H9c2 zellspezifische Verteilung von YB-1 zwischen Nukleus und Zytoplasma sein. Zudem beschrieben Miwa et al. im Jahre 2006 einen altersabhängigen Abfall der YB-1-Expression in Herzen von Mäusen. Bei H9c2-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie embryonalen Gewebes. YB-1 vermittelt während des Wachstums im Herzen die Expression der leichten Myosin-Kette (Zou et al., 1995). Die hohe transkriptionale Aktivität könnte zu einer vermehrten nukleären Lokalisation von YB-1 in unbehandelten H9c2-Zellen beitragen. Auch in Endothelzellen wurde vermehrt YB-1 im Nukleus gefunden. Eine Stimulation mit Thrombin, einem bekannten Induktor von Gen-Expression, führt zu einer Translokation von YB-1 aus dem Zytoplasma in den Nukleus (Stenina et al., 2000). Auch eine Hyperthermie führte zur Translokation von YB-1 aus dem Zytoplasma in den Nukleus und hier zu einer vermehrten Expression des MDR-verwandten ABC-Reporters in Kolon-Karzinom-Zellen (Stein et al., 2001).

Die Kombination der TGF- β_1 -Induktion mit einer AdYB-1-Infektion führte jedoch zu einer Änderung der Lokalisation von YB-1 in H9c2-Zellen: Es fand eine Umkehr der Verhältnisse statt. YB-1 war unter TGF- β_1 -Stimulation und gleichzeitiger YB-1-Überexpression hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Eine Umkehr der Verhältnisse unter gleichzeitiger TGF- β_1 -Stimulation und YB-1-Überexpression

spricht für eine eventuelle Interaktion von YB-1 mit TGF- β -Signalmolekülen im Zytoplasma von H9c2-Zellen. Das vermehrte Vorkommen von YB-1 im Zytoplasma unter gleichzeitiger TGF- β_1 -Stimulation und YB-1-Überexpression kann jedoch ebenso für eine stärkere Einbindung von YB-1 in zytoplasmatische Ribonukleoprotein-Komplexe (mRNPs) sprechen. Im Zytoplasma ist YB-1 der Hauptbestandteil von mRNPs und beeinflusst somit die Translation von mRNA (Evdokimova et al., 1995). In proximalen Tubuluszellen wurde von Zhang et al. im Jahre 2006 gezeigt, dass eine TGF- β_1 -Gabe zu einem erhöhten TGF- β_1 -mRNA-Gehalt und einer erhöhten TGF- β_1 -De-Novo-Protein-Synthese führt. Jenkins et al. (2010) zeigten in HK (Human Kidney)-Zellen eine Interaktion von YB-1 mit der UTR (Untranslated Region) der TGF- β_1 -mRNA. Diese Interaktion führte zu einer verminderten Aktivierung der TGF- β_1 -mRNA-Translation. Eine Aktivierung der TGF- β_1 -mRNA-Translation ist assoziiert mit einer erniedrigten Bindung von YB-1 an die TGF- β_1 -mRNA (Fraser et al., 2008). Das vermehrte zytoplasmatische Vorkommen von YB-1 unter gleichzeitiger TGF- β_1 -Stimulation und YB-1-Überexpression ist ein Hinweis auf eine gesteigerte Hemmung der TGF- β_1 -mRNA-Translation durch die Bindung von YB-1 an die UTR der TGF- β_1 -mRNA. Dies wäre ein Mechanismus, der den TGF- β_1 -Signalweg direkt zu Beginn hemmen würde. Wie bei SMAD7 stellt dies eher eine langfristige Kontrolle dar. An dieser Stelle kann deshalb nur spekuliert werden, welche Funktion YB-1 bei der Translokation in das Zytoplasma übernimmt.

H9c2-Zellen sind somit aufgrund vieler ausgeprägter kardialer Eigenschaften, vorhandener TGF- β_1 -Ansprechbarkeit und einer erfolgreichen YB-1-Überexpression im Kontext dieser Arbeit für Experimente einsetzbar, insbesondere in Bereichen, in denen für Untersuchungen hohe Protein-Mengen benötigt wurden. H9c2-Zellen sind jedoch aufgrund einer abweichenden Morphologie nicht mit adulten Kardiomyozyten gleichzusetzen und sollten somit lediglich als Ergänzung zu adulten Kardiomyozyten gesehen werden.

6.2 YB-1 als anti-apoptotisches Molekül unter TGF- β_1 : Mögliche Signalwege

6.2.1 Beeinflussung von SMAD4 durch YB-1

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TGF- β_1 die Expression des SMAD4-Proteins erhöht. In adulten Kardiomyozyten der Ratte wurde bislang in DNA-Protein-Bindungsstudien bewiesen, dass TGF- β_1 zu einer Aktivierung von SMAD-Transkriptionsfaktoren führt, die essentiell für die Apoptose-Induktion sind (Schneiders et al., 2005). Weiterhin zeigten die Autoren, dass eine Suppression der SMAD4-Synthese durch eine Transformation der Kardiomyozyten mit Antisense-Oligonukleotiden eine NO induzierte Apoptose hemmt. SMAD4 spielt auch für die Apoptose-Induktion unter TGF- β_1 eine wichtige Rolle. Mit Antisense-Oligonukleotiden konnte nach 28 Stunden die Protein-Expression von SMAD4 auf 34 % reduziert werden. Dies geht einher mit einer Abnahme der Apoptose-Rate (Heger et al., 2009). Die Proteinmenge von SMAD4 ist somit entscheidend für die Induktion der Apoptose. YB-1 hemmt die frühen und späten Apoptose-Vorgänge in der durch TGF- β_1 induzierten Apoptose in adulten Kardiomyozyten (Partsch, 2009). In dieser Arbeit konnte jetzt demonstriert werden, dass YB-1 einen Einfluss auf die SMAD4-mRNA-Expression in Kardiomyozyten hat. AdYB-1 allein führt - wie eine alleinige Stimulation mit TGF- β_1 - zu einer starken SMAD4-mRNA-Expressionssteigerung. Die Kombination einer YB-1-Überexpression mit einer TGF- β_1 -Stimulation verringerte hingegen die relative SMAD4-mRNA-Expression. AdYB-1 hat jedoch, wie schon gezeigt wurde (Partsch et al., 2009), trotz erhöhter SMAD4-Expression keinen Einfluss auf die Apoptose-Induktion in Kardiomyozyten. Weiterhin konnten Heger et al. (2009) zeigen, dass selbst eine adenovirale Überexpression von SMAD4 nicht zur Apoptose führt. Das liegt daran, dass für eine Apoptose-Induktion unter TGF- β_1 nicht nur SMAD-Moleküle, sondern auch AP-1 benötigt werden (Schneiders et al., 2005). Erst durch die Aktivierung von AP-1 nach einer PE-Stimulation in Kombination mit einer SMAD4-Überexpression, wird in Kardiomyozyten Apoptose ausgelöst (Heger et al., 2009). Eine Überexpression von AdYB-1 hat somit eine ähnliche Wirkung wie der Einsatz von SMAD4-Antisense-Oligonukleotiden, die beide bei einer TGF- β_1 -Stimulation zur Verringerung der SMAD4-Expression und somit zur Hemmung der

Apoptose führen. Die hier gezeigte Hemmung der SMAD4-Transkription unter TGF- β_1 -Stimulation und YB-1-Überexpression könnte einen Teil der anti-apoptotischen Funktion von YB-1 ausmachen.

6.2.2 Beeinflussung von AP-1-Untereinheiten durch YB-1

Eine Interaktion von SMAD4 mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, spielt für die pro-apoptotische Funktionsweise von SMAD4 eine große Rolle. Der Komplex aus P-SMAD2, P-SMAD3 und SMAD4 kann im Nukleus mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 interagieren (Euler-Taimor & Heger, 2006), da SMAD-Proteine Jun-Proteine direkt binden. Es ist beschrieben worden, dass sowohl SMAD3 als auch SMAD4 JunD binden können (Liberati et al., 1999). Weiterhin ist eine Interaktion von YB-1 mit SMAD3 (Higashi et al., 2003) und mit AP-1 (Samuel et al., 2005) beschrieben worden. Durch die Bindung von SMADs an AP-1 wird die transkriptionale Aktivität von AP-1 gesteigert (Liberati et al., 1999, Yamamura et al., 2000). Auch in Kardiomyozyten ist AP-1 unter NO-Gabe in seiner pro-apoptotischen Funktion aus c-Jun, JunB- und FosB-Untereinheiten zusammengesetzt (Schneiders et al., 2005). Dies legte die Vermutung nahe, dass auch die Hemmung von AP-1 zu einer Inhibition der TGF- β_1 induzierten Apoptose führen kann. Und tatsächlich, in den hier durchgeführten Versuchen waren sowohl die JunB- als auch die JunD-mRNA-Expression unter TGF- β_1 -Induktion stark gesteigert. Die kombinierte YB-1-Überexpression mit einer TGF- β_1 -Induktion hob die JunB- und JunD-Expressionssteigerung auf. Also wirkt YB-1 nach einer TGF- β_1 -Stimulation, wie auch bei SMAD4, hemmend auf die Transkription. Dass die JunD-Isoform maßgeblich zum TGF- β_1 -Signalweg beiträgt, wurde auch schon für andere Zellen gezeigt wie in Mauskeratinozyten (Virolle et al., 1998), in humanen KMST Fibroblasten (Virolle et al., 1998) und in intestinalen Epithelzellen (Yue and Mulder, 2000). In Lungenfibroblasten wird nach TGF- β_1 -Stimulation ein JunD-Homodimer aktiviert. Antisense-Oligonukleotide, die gegen JunD aber nicht gegen c-Jun oder c-Fos gerichtet waren, konnten die TGF- β_1 induzierte Kollagen-Ablagerung inhibieren. Aber auch für JunB ist eine Aktivierung bei Apoptose-Prozessen gemessen worden. So spielt JunB neben FosB als Bestandteil von AP-1 auch für die Apoptose-Induktion unter NO eine wichtige Rolle (Schneiders et al., 2005).

Ein direkter Zusammenhang zwischen einer Aktivierung von JunD und einer Apoptose-Induktion konnte in Hepatoma-Zellen gezeigt werden. Hier führt die Stimulation mit TGF- β_1 über die Aktivierung von TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand) zur Apoptose. Die Expression und damit die Apoptose-Induktion sind abhängig von AP-1, das hier aus JunD und FosB zusammengesetzt ist (Herzer et al., 2008). Interessanterweise ist auch hier das Zusammenspiel von SMAD4 und AP-1 ausschlaggebend, denn der Knock-down von JunD, FosB und SMAD4 mit siRNA konnte die Expression von TRAIL als auch die Apoptose hemmen. Somit könnte die Hemmung der JunB-, JunD- und SMAD4-Transkription einen wesentlichen Beitrag zur anti-apoptotischen Funktion von YB-1 leisten.

6.2.3 Beeinflussung von SMAD7 durch YB-1

Weiterhin wurde ein Anstieg der SMAD7-mRNA-Expression nach 24-stündiger TGF- β_1 -Stimulation gezeigt. Dieser Effekt ist in der Literatur bereits als autoinhibitorisches Feedback des TGF- β_1 / SMAD-Signalwegs beschrieben worden (Park, 2005). Die kombinierte Gabe von TGF- β_1 und AdYB-1 führte in diesem Fall nicht zu einer Hemmung von Transkriptionsfaktoren, sondern zu einer signifikanten SMAD7-mRNA-Expressionsteigerung in Kardiomyozyten. SMAD7 hemmt die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 (Nakao et al., 1997) und bedarf zu seiner Aktivierung keiner Phosphorylierung (Park, 2005). Eine Expressionssteigerung von SMAD7 nach 24 Stunden hätte somit in Kardiomyozyten eine direkte anti-apoptotische Wirkung zur Folge. Diese Steigerung der SMAD7-Transkription durch YB-1 könnte ein weiterer Teil der anti-apoptotischen Funktion von YB-1 ausmachen. Partsch zeigte im Jahre 2009, dass eine YB-1-Überexpression keinen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 ausübt. Da dies jedoch nach zwei Stunden von Partsch detektiert wurde, könnte eine SMAD7-Expressionssteigerung nach 24 Stunden eher einen langfristigen direkten Einfluss einer YB-1-Überexpression auf die Phosphorylierung von R-SMAD-Proteinen darstellen. Ähnliche Befunde zeigten Dooley et al (2006). Sie zeigten, dass YB-1 ein wichtiger Mediator von Interferon- γ in hämatopoetischen Stammzellen ist. Interferon- γ induziert eine SMAD7-Transkription und somit eine Inhibition des TGF- β_1 -Signalwegs (Ulloa et al., 1999). Die Expressionsteigerung von SMAD7 ist somit ein genereller Mechanismus, um den TGF- β_1 -Signalweg zu blockieren.

6.2.4 Weitere anti-apoptotische YB-1-Funktionen

Die anti-apoptotische Wirkung von YB-1 beschränkt sich jedoch nicht nur auf eine TGF- β -Stimulation. In HeLa-Zellen inhibiert YB-1 die Transkription des pro-apoptotischen Proteins p53 und wirkt somit anti-apoptotisch (Lasham et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor Twist1, dessen Ziel-Gen YB-1 ist, interagiert in humanen Prostata-Krebs-Zellen mit dem pro-apoptotischen Protein p53 und hemmt dessen Wirkung (Shiota et al., 2008 und 2009). In B-Lymphozyten wurde wiederum beschrieben, dass YB-1 das pro-apoptotische Gen Fas herunterreguliert (Lasham et al., 2000). YB-1 spielt folglich in verschiedenen Zellarten eine Rolle in der Hemmung von Apoptose-Prozessen. Die genaue anti-apoptotische Wirkungsweise von YB-1 unter TGF- β_1 -Stimulation in Kardiomyozyten bedarf also weiterer Studien, wie der Expressionsanalyse von YB-1-Ziel-Genen wie p53 oder Fas.

6.3 YB-1 als anti-hypertrophes Molekül unter Phenylephrin: Mögliche Signalwege und Abgrenzung zu GDF-15

Partsch zeigte im Jahre 2009 einen anti-hypertrophen Effekt der Langzeit-YB-1-Überexpression auf die durch PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. In dieser Arbeit wurde nun auch ein anti-hypertropher Effekt nach einer kurzzeitigen Infektion mit AdYB-1 nachgewiesen. YB-1 hat demzufolge auch in einer schwachen Überexpression, einen hemmenden Einfluss auf die durch PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. In der hier durchgeführten Studie konnte jetzt gezeigt werden, dass eine YB-1-Überexpression die durch PE stimulierte RGS2-mRNA-Expression in Kardiomyozyten steigert. Dies konnte auch in H9c2-Zellen auf Protein-Ebene nachgewiesen werden.

6.3.1 Beeinflussung von RGS2 und SMAD-Proteinen durch YB-1

Phenylephrin vermittelt seinen pro-hypertrophen Effekt in Kardiomyozyten über G-Protein gekoppelte α_1 -Adrenozeptoren (Schlüter et al., 1992). Die Konformationsänderung der G-Proteine im Zuge der Aktivierung des Rezeptors kann in Kardiomyozyten durch die GTPase RGS2 gehemmt werden (Tsang et al., 2010).

YB-1 hemmt somit über Heraufregulation der GTPase RGS2 die durch PE induzierte Signalkaskade und könnte somit zur anti-hypertrophen Wirkung von YB-1 beitragen. Diese Annahme wird durch weitere Studien unterstrichen. In MDCK (Madin Darby Canine Kidney)-Zellen konnte eine Interaktion zwischen dem Y-Box-Transkriptionsfaktor ZONAB und einer kleinen GTPase (RalA) nachgewiesen werden (Frankel et al., 2005). Ral Proteine aktivieren unter anderem die AP-1-Untereinheit c-Jun (de Ruiter et al., 2000). Es wäre denkbar, dass auch YB-1 mit der GTPase RGS2 interagiert und somit deren Aktivität steigern könnte. Eine Interaktion von YB-1 mit RGS2 könnte zudem die pro-hypertrophen Funktionen von AP-1 negativ beeinflussen.

Im Gegensatz zu der anti-hypertrophen Wirkung von YB-1 auf eine durch PE induzierte Hypertrophie konnte durch die in dieser Arbeit angefertigten Analysen in isolierten Kardiomyozyten sowohl in Kurzzeit- als auch in Langzeit-YB-1-Überexpression kein anti-hypertropher Effekt auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten gezeigt werden. Im Gegensatz zu PE wirkt GDF-15 als Mitglied der TGF- β -Superfamilie nicht über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, sondern über Serin / Threonin-Kinasen (Ago et al., 2006). Es ist wahrscheinlich, dass GDF-15 über ALK 1 / 2 / 3 / 6 wirkt, da diese Typ I-Kinasen SMAD1 aktivieren. Eine Aktivierung von SMAD1 durch GDF-15 wurde in Kardiomyozyten von Heger et al. im Jahre 2010 gezeigt. SMAD2 und SMAD3 spielen unter GDF-15 keine Rolle (Heger et al., 2010). Eine Inhibierung der Konformationsänderung von G-Proteinen durch eine vermehrte Expression von RGS2 durch YB-1 kann im GDF-15-Signalweg also keine Rolle spielen. Dies könnte das Fehlen eines anti-hypertrophen Effektes einer YB-1-Überexpression auf die durch GDF-15 induzierte Hypertrophie erklären. Zudem inhibiert RGS2 die Phospholipase β (Takimoto et al., 2009), deren Aktivierung unter GDF-15 bislang nicht beschrieben wurde. Dies könnte außerdem die selektive anti-hypertrophe Wirkung einer YB-1-Überexpression auf eine durch PE induzierte Hypertrophie erklären.

Die Aktivierung von SMAD1 spielt unter GDF-15-Induktion eine wichtige Rolle (Heger et al., 2010). Dies ist ein weiterer Unterschied zur α -adrenerg induzierten Hypertrophie durch Phenylephrin, bei der pro-hypertrophe SMAD-Proteine keine Rolle spielen (Schneiders et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expressionssteigerung der RNA und des Proteins von SMAD4 gezeigt werden. Auch in H9c2-Zellen kam es nach YB-1-Überexpression zu einer erhöhten SMAD4-

Protein-Expression. Die Wirkung von SMAD4 auf das Wachstum der Kardiomyozyten wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. In Mäusen, deren SMAD4-Proteine herzspezifisch deletiert sind, kommt es zu einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Wang et al., 2005). Während eine Reduktion von SMAD4 zur Hypertrophie führt, hemmt eine Überexpression von SMAD4 das Zellwachstum. So nimmt SMAD4 auch einen negativen Einfluss auf die durch PE induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. Heger et al. zeigten im Jahre 2009, dass eine Überexpression von SMAD4 in adulten Kardiomyozyten eine durch PE induzierte Hypertrophie hemmt. Die vermehrte SMAD4-Expression unter AdYB-1 stellt somit einen weiteren möglichen Einflussfaktor von YB-1 auf Hypertrophie-Vorgänge im Herzen dar. Es sind weitere Untersuchungen der SMAD4-Expression unter AdYB-1 nötig, um die Expressionsverhältnisse unter PE-Stimulation zu analysieren. Es ist bislang nicht beschrieben, dass SMAD4 unter GDF-15-Stimulation eine Rolle spielt. Da es sich bei SMAD4 jedoch um ein Co-SMAD-Protein handelt, und dieses auch mit SMAD1 interagieren kann, ist eine Beteiligung von SMAD4 am GDF-15-Signalweg nicht auszuschließen. Es ist davon auszugehen, dass SMAD4 allein unter GDF15 nicht entscheidend ist und mit weiteren Transkriptionsfaktoren, jedoch nicht mit AP-1, interagiert.

6.3.2 Beeinflussung von AP-1-Untereinheiten durch YB-1

Die pro-hypertrophe Wirkung von PE wird auch über den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt (Taimor et al., 2004). Eine Beteiligung von AP-1 an der durch GDF-15 induzierten Hypertrophie ist bislang nicht beschrieben worden. Möglicherweise ist es der fehlende AP-1-Stimulus, durch den die anti-apoptotische Wirkung von YB-1 in einer durch GDF-15 induzierten Hypertrophie ausbleibt. Es wurde gezeigt, dass eine YB-1-Überexpression zu einer starken Erhöhung der JunD-mRNA-Expression führt. In seiner pro-hypertrophen Funktion ist AP-1 aus den Untereinheiten c-Jun, JunB, c-Fos und FosB zusammengesetzt (Taimor et al., 2004). Die AP-1-Untereinheit JunD inhibiert eine durch PE induzierte Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten, indem JunD die transkriptionelle Aktivität von AP-1 herunterreguliert (Hilfiker-Kleiner et al., 2005). Die durch AdYB-1 induzierte erhöhte JunD-mRNA-Expression könnte somit einen Anteil an der anti-hypertrophen Wirkung von YB-1 besitzen. Es sollten weitere Analysen dieses Moleküls auf Protein-Ebene sowie unter PE-Induktion erfolgen.

6.3.3 Subzelluläre Lokalisation von YB-1 unter Phenylephrin

YB-1 war in der vorliegenden Studie unter PE-Induktion in H9c2-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vorhanden. Es war eine im Verhältnis zum Zytoplasma größere Menge an YB-1 im Nukleus zu finden. Es bestand kein Unterschied in der Verteilung von YB-1 zur unbehandelten Kontrolle, im Gegensatz zu TGF- β Stimulation, wo YB-1 vom Kern in das Zytoplasma translozierte. Hier besteht somit ein Unterschied, der die spezifische Interaktion von YB-1 bei Apoptose-Prozessen und bei Hypertrophie erklären könnte. Shen et al. zeigten im Jahre 2011, dass eine Aktivierung des MAPK / ERK-Signalweges in Daudi-Zellen (Burkitt Lymphom-Zelllinie) zu einer Translokation von YB-1 in den Nukleus führt. Eine Inhibierung der MAPK-Kaskade führte in diesen Zellen zu einer Inhibition der Translokation von YB-1 in den Nukleus. Auch unter PE-Induktion wird die MAPK-Kaskade aktiviert. Die ERK ist ein Bestandteil der MAPK-Kaskade und kann sowohl AP-1 als auch YB-1 phosphorylieren (Coles et al., 2005). Es ist denkbar, dass YB-1 nach einer Aktivierung durch die ERK in den Nukleus transloziert, um dort die Transkription anti-hypertropher Gene zu fördern, bzw. die Transkription prohypertropher Gene zu inhibieren.

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass YB-1 kein generelles anti-hypertrophes Molekül in Kardiomyozyten der Ratte ist. Es hemmt gezielt eine α -adrenerg induzierte Hypertrophie, hat jedoch keinen Einfluss auf eine durch GDF-15 induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. Die anti-hypertrophe Wirkung von YB-1 könnte über eine Heraufregulation von RGS2 vermittelt werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um die genauen Wirkmechanismen von YB-1 unter PE-Induktion zu analysieren.

6.4 YB-1: Therapeutischer Nutzen

Das Protein YB-1 findet in wissenschaftlichen Untersuchungen bisher seine größte Beachtung in der Krebsforschung. YB-1 hemmt die durch TGF- β_1 induzierte Apoptose in adulten Kardiomyozyten. Die vermehrte Expression von YB-1 hemmt auch in stark proliferierenden Zellen Apoptose-Vorgänge und korreliert mit einer schlechten Prognose bei Krebs-Erkrankungen (Jurchott et al., 2003). Dagegen führt eine Suppression von YB-1 in Melanom-Zellen zu einer erhöhten Apoptose-Rate (Schittek et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nun für YB-1 eine anti-apoptotische Wirkung in adulten Kardiomyozyten gezeigt werden.

Eine vermehrte Expression von YB-1 ist für viele Krebszellarten beschrieben worden (Humanes Osteosarkom (Oda et al., 1998), malignes Melanom (Hipfel et al., 2000), Nicht-Kleinzelliger Lungentumor (Shibahara et al., 2001). YB-1 wird auch in entartetem Gewebe von Brustkrebspatienten vermehrt exprimiert (Xie et al., 2011) und fördert dort bei nukleärer Lokalisation die Expression des Multi-Drug-Resistance-1-Proteins (Bargou et al., 1997). YB-1 ist deshalb ein vielversprechendes Molekül zur Früheinschätzung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika (Matsumoto et al., 2005). YB-1 spielt jedoch als Marker-Protein in Kardiomyozyten bislang keine Rolle.

Zusätzlich zu seiner anti-apoptotischen Funktion in stark proliferierenden Zellen, ist YB-1 in der Literatur als Vermittler von anti-fibrotischen Effekten beschrieben worden. Inagaki et al. (2005) zeigten, dass eine in der Leber selektive YB-1-Expression die Progression einer hepatischen Fibrose unterdrückt. Zudem ist YB-1 ein wichtiger Mediator des antifibrotischen Interferon- γ -Effekts in hämatopoetischen Stammzellen (Dooley et al., 2006). YB-1 überexprimierende hämatopoetische Stammzellen könnten in fibrotischen Veränderungen in Geweben, wie zum Beispiel in der Leber, eingesetzt werden, um anti-fibrotische Effekte zu vermitteln. Auch im Herzen wäre ein Einsatz dieser Zellen denkbar, um eine langfristige Inhibition des TGF- β_1 -Signalwegs zu erreichen und fibrotische Vorgänge zu unterdrücken.

Es besteht also je nach Therapieansatz das Bestreben, YB-1 in bestimmten Geweben zu hemmen oder vermehrt zu exprimieren. Um einen Nutzen für das Herz zu erreichen, sollte YB-1 im Herzen vermehrt exprimiert werden. Im gesunden Gewebe des adulten Herzens ist YB-1 kaum nachweisbar (Kamalov et al., 2005). YB-1 zeigt in Überexpression eine anti-apoptotische Funktion unter TGF- β_1 -Stimulation und eine

anti-hypertrophe Eigenschaft unter Phenylephrin. Um diese Funktionen von YB-1 im Herzen therapeutisch nutzen zu können, muss ein Weg gefunden werden, um YB-1 ausschließlich in Herzmuskelzellen zu exprimieren. Der Nachteil des in der vorliegenden Arbeit genutzten Adenovirus-Vektor-Systems ist eine unspezifische Expression von YB-1 in allen infizierten Zellen. Eine in-vivo Administration des AdYB-1-Virus hätte fatale Folgen, wie multiple Tumoren sowie artherosklerotische Veränderungen.

Inagaki et al. beschrieben im Jahre 2005 ein System, das es möglich macht, YB-1 ausschließlich in fibrotischen Leberzellen zu exprimieren. Mit Hilfe des Cre/lox-Systems in Kombination einer gewebespezifischen COL1A2-Enhancer-Sequenz wurde ein rekombinantes Adenovirus erzeugt. Durch diese Methode können spezifische Zellarten genetisch modifiziert werden, während andere Gewebe intakt bleiben (Sato et al., 1998). Ein regulatorisches rekombinantes Adenovirus (rAd) exprimiert die Rekombinase Cre unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. In Kardiomyozyten wäre der Promotor der schweren Myosin-Kette denkbar. Das regulatorische rekombinante Adenovirus (rAd) wird zusammen mit dem Ziel-Adenovirus, das eine durch Cre aktivierte Expressionseinheit (loxP) enthält, administriert. Im Ziel-Adenovirus kommt es nun zu einer Expression des loxP nachgeschalteten Ziel-Gens. Das Ziel-Gen YB-1 wurde bereits erfolgreich mit dem für das Hepatokarzinom spezifischen Promotor des Alpha-Fetoproteins kombiniert (Sato et al., 1998). Dies ist ein Ansatz, der durch die Kombination eines herzspezifischen Promotors und des Zielgens YB-1, eine Perspektive zur selektiven therapeutischen Nutzung der anti-apoptotischen und anti-hypertrophen Funktion von YB-1 im Herzen bietet.

In den meisten nicht entarteten Zellen ist YB-1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. In Tumorzellen weist die nukleäre Translokation von YB-1 auf eine schlechte Prognose hin (Bargou et al., 1997; Oda et al., 1998; Shibahara et al., 2001). Eine selektive Überexpression von YB-1 im Zytoplasma ist ein weiterer Ansatz für den therapeutischen Nutzen von YB-1. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die Komponente HSc025 die nukleäre Translokation von YB-1 stimuliert, indem sie direkt an YB-1 bindet und seine zytoplasmatische Verankerung mit dem Protein PABP zerstört (Higashi et al., 2011). Es sind weitere Untersuchungen nötig, um einen Inhibitor von HSc025 zu erforschen, der die Translokation von YB-1 in den Nukleus und somit seine pro-karzinogenen Eigenschaften unterbinden könnte. YB-1 war in

dieser Arbeit unter TGF- β_1 hauptsächlich im Zytoplasma von H9c2-Zellen lokalisiert und scheint hier seine anti-apoptotische Funktion zu vermitteln. Unter Phenylephrin war YB-1 hingegen hauptsächlich im Nukleus von H9c2-Zellen lokalisiert. Da die Hypertrophie-Entwicklung im Herzen durchaus eine physiologische Situation darstellt, wäre eine selektive zytoplasmatische Expression in Kardiomyozyten ein wichtiger Schritt zur Weitererforschung von YB-1 als anti-apoptotisches Molekül unter TGF- β_1 .

6.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die hier durchgeführten Experimente sind H9c2-Zellen als Modell für eine adenovirale Überexpression von YB-1 sowie für die Untersuchung von durch TGF- β_1 induzierten Apoptose-Prozessen etabliert worden.

Es wurden mögliche YB-1-Signalwege zur Hemmung einer TGF- β_1 induzierten Apoptose aufgezeigt. Wie Abbildung 49 zeigt, hemmt YB-1 die Expression des SMAD4-Moleküls sowie der JunB- und JunD-Proteine unter TGF- β_1 -Einfluss. YB-1 erhöht die langfristige SMAD7-Expression in adulten Kardiomyozyten. Die unter kombinierter TGF- β_1 -Gabe und YB-1-Überexpression vornehmlich zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 in H9c2-Zellen macht eine Beteiligung von YB-1 an translationalen Vorgängen sowie an Interaktionen zu TGF- β_1 -Signalmolekülen wie SMAD-Molekülen und AP-1-Untereinheiten wahrscheinlich.

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie mögliche YB-1-Signalwege zur Hemmung einer durch PE induzierten Hypertrophie aufgezeigt. Wie in Abbildung 49 zu sehen ist, steigert YB-1 die Expression von Hypertrophie-Inhibitoren wie RGS2, JunD und SMAD4. Die Beeinflussung einer durch GDF-15 induzierten Hypertrophie durch YB-1 wurde in Kardiomyozyten der adulten Ratte ausgeschlossen. Eine durch GDF-15 vermittelte Hypertrophie ist weder über G-Proteine vermittelt, noch spielt AP-1 hier eine Rolle (siehe Abbildung 49).

Somit konnte für YB-1 ein deutlicher protektiver Effekt in Kardiomyozyten gezeigt werden. Sowohl Apoptose- als auch Hypertrophie-Prozesse spielen in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine große Rolle. Nach weiteren Untersuchungen

kann YB-1 möglicherweise als protektives Molekül in der Herzinsuffizienz-Medikation eingesetzt werden.

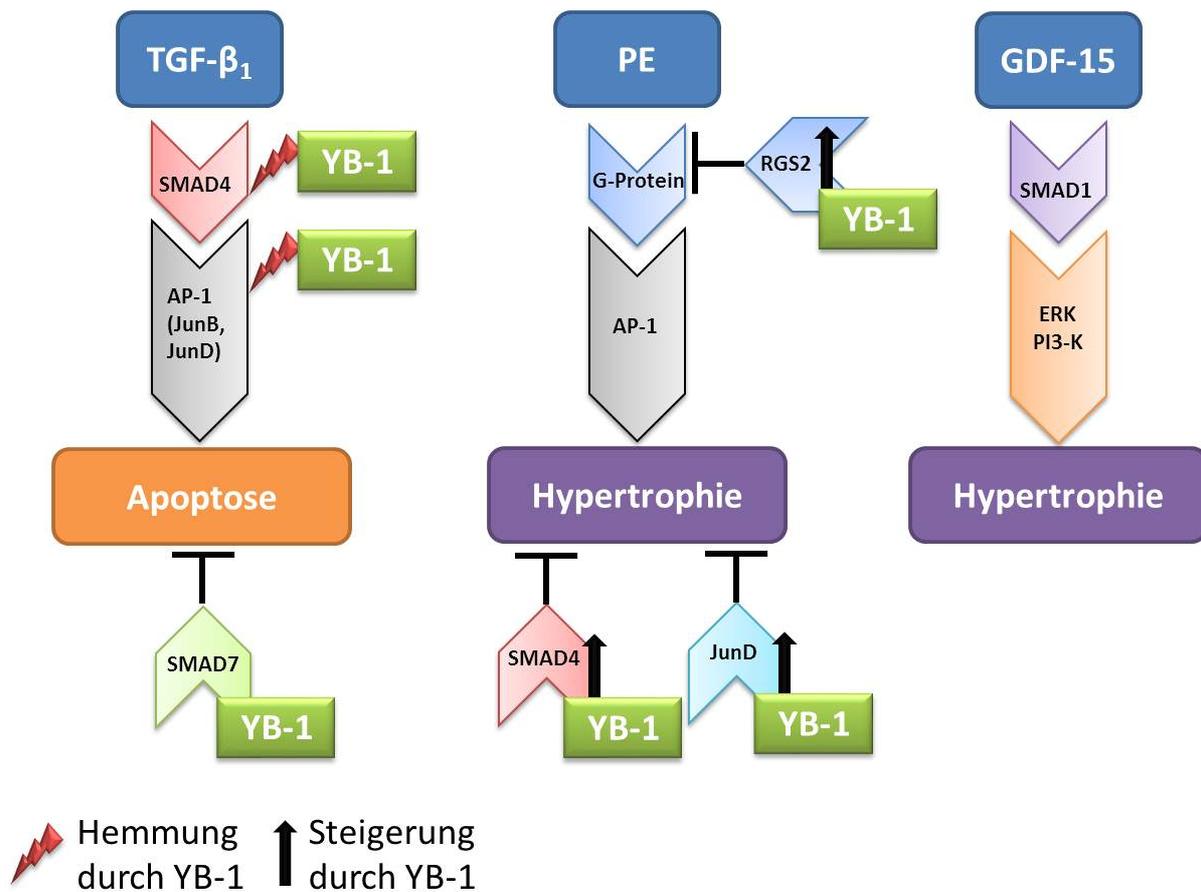


Abbildung 49: YB-1 hemmt eine durch TGF- β_1 induzierte Apoptose und eine durch PE induzierte Hypertrophie durch hemmende und steigernde Einflüsse auf beteiligte Signalmoleküle.

Die anti-apoptotischen und anti-hypertrophen Wirkungsweisen von YB-1 in Herzmuskelzellen bedürfen weiterer Studien. Es sollten Protein-Expressionen von SMAD-Molekülen sowie AP-1-Untereinheiten, die unter TGF- β_1 -, aber auch unter Phenylephrin-Induktion eine Rolle spielen, weiterführend untersucht werden. Ebenso sollte eine Interaktion von YB-1 mit TGF- β_1 , SMAD-Molekülen, AP-1-Untereinheiten sowie RGS2 unter TGF- β_1 -, bzw. PE-Gabe analysiert werden. Eine herzspezifische Überexpression von YB-1 ist als ein wichtiger Schritt zu einer bevorstehenden in-vivo-Applikation zu bewerten. Die kardiale YB-1-Überexpression sollte im Zytoplasma erfolgen, da YB-1 unter TGF- β_1 -Stimulation hauptsächlich im Zytoplasma zu finden ist und hier seine anti-apoptotischen Funktionen vermittelt.

7. Zusammenfassung

Infolge einer längeren Druckbelastung des Herzens kommt es zu einem Übergang des adaptiven, hypertrophen Wachstums zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Diese geht unter anderem mit einer erhöhten TGF β ₁-Expression sowie mit einer Apoptose-Induktion einher. Während dieser Prozesse wird im Herzen eine Aktivierung von SMAD- und AP-1-Transkriptionsfaktoren gefunden, die Einfluss auf Hypertrophie- und Apoptose-Prozesse haben. Der Transkriptionsfaktor YB-1 kann sowohl mit SMADs als auch mit AP-1 interagieren und somit Gene regulieren, die für diese Prozesse verantwortlich sind. Da eine Überexpression von YB-1 in Kardiomyozyten der adulten Ratte einen hemmenden Einfluss auf eine durch TGF- β ₁ induzierte Apoptose sowie auf eine α -adrenerg induzierte Hypertrophie hat, war es Ziel dieser Arbeit, die Funktion von YB-1 bei Apoptose- und Hypertrophie-Vorgängen in Herzmuskelzellen zu untersuchen. Ergänzend zu adulten Kardiomyozyten sollten H9c2-Zellen als Modell für eine YB-1 Überexpression etabliert und der TGF- β -Signalweg in dieser Zelllinie analysiert werden.

Eine Infektion von H9c2-Zellen mit AdYB-1 (500 MOI) erhöhte die relative YB-1-mRNA-Expression nach 24 h und die relative YB-1-Protein-Expression nach 24 h, 36 h und 48 h signifikant. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz wurde eine vorrangig nukleäre Lokalisation von YB-1 in H9c2-Zellen nachgewiesen. Eine einstündige TGF- β ₁-Stimulation (1 ng / ml) führte in H9c2-Zellen zu einer Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 und zu einer Komplexbildung von P-SMAD2 mit P-SMAD3. Nach 24 Stunden TGF- β ₁-Stimulation konnte eine signifikante Steigerung der Expression des SMAD7-Target-Gens beobachtet werden. Eine TGF- β ₁-Stimulation führte in H9c2-Zellen zu Apoptose-Induktion.

In adulten Kardiomyozyten induzierte eine TGF- β ₁-Stimulation in YB-1 überexprimierenden Zellen eine signifikante Verringerung der SMAD4-, JunB- und JunD-mRNA-Expression. Die SMAD7-Expression wurde unter YB-1-Überexpression auf mRNA- und Protein-Ebene signifikant gesteigert. Die Veränderungen der SMAD- und Jun-Expressionen sind hier ein wahrscheinlicher Mechanismus für die anti-apoptotische Wirkung von YB-1 in adulten Kardiomyozyten. Die kombinierte TGF- β ₁-Gabe und YB-1-Überexpression führte weiterhin zu einer signifikant vermehrten zytoplasmatischen Lokalisation von YB-1 in H9c2-Zellen.

Nach Stimulation mit dem pro-hypertrophen α -Adrenozeptoragonist Phenylephrin (10 μ M) kam es in adulten Kardiomyozyten sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der mit AdGFP (1000 MOI) infizierten Gruppe zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche sowie der relativen 14 C-Proteinbiosynthese-Rate. Eine YB-1-Überexpression hemmte die Hypertrophie-Induktion signifikant. Eine YB-1-Infektion erhöhte die relative RGS2-mRNA-Expression, einem Inhibitor der G-Protein-vermittelten Signalkaskade, in Kardiomyozyten unter gleichzeitiger PE-Induktion signifikant. Ebenso steigerte eine YB-1-Überexpression in H9c2-Zellen die relative RGS2-Protein-Expression unter gleichzeitiger PE-Induktion. Eine alleinige YB-1-Überexpression erhöhte die Protein-Expression des anti-hypertrophen SMAD4-Moleküls in Kardiomyozyten und H9c2-Zellen signifikant. Eine alleinige YB-1-Überexpression führte in adulten Kardiomyozyten zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression des JunD-Moleküls, das unter PE anti-hypertrophe Wirkungen vermittelt. Die PE-Gabe in YB-1 überexprimierenden H9c2-Zellen führte zu einer vornehmlich nukleären Lokalisation von YB-1. Diese anti-hypertrophen Mechanismen sind spezifisch für eine PE-Induktion. Im Gegensatz zu der Hemmung der α -adrenerg induzierten Hypertrophie, konnte eine YB-1-Überexpression eine GDF-15 (3 ng / ml) stimulierte Hypertrophie nicht verhindern. Nach Stimulation mit GDF-15 kam es sowohl in nicht-infizierten adulten Kardiomyozyten, als auch nach Infektion mit AdGFP (1000 MOI) und auch mit AdYB-1 (1000 MOI) zu einer signifikanten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche sowie der relativen 14 C-Proteinbiosynthese-Rate.

Schlussfolgerung: H9c2-Zellen eignen sich als Modell für eine adenovirale Überexpression von YB-1 sowie für die Untersuchung von durch TGF- β_1 induzierten Apoptose-Prozessen. Es wurden mögliche YB-1-Signalwege zur Hemmung einer durch TGF- β_1 induzierten Apoptose sowie einer durch PE induzierten Hypertrophie aufgezeigt. YB-1 zeigt einen deutlichen protektiven Effekt in Kardiomyozyten.

7.1. Summary

As a result of an enduring pressure overload in the heart, there is a transition of adaptive hypertrophic growth to a development of heart failure. This process goes along with an increased TGF- β_1 expression as well as an induction of apoptosis. During these proceedings an activation of SMAD and AP-1 transcription factors is found in the heart. Those factors have an influence on hypertrophy and apoptosis events.

The transcription factor YB-1 mediates inhibitory effects on genes associated with cell death and interacts with SMADs and AP-1. An adenoviral overexpression of YB-1 inhibits TGF β_1 -induced apoptosis and affects phenylephrine-induced hypertrophy. The aim of this study was to analyze the function of YB-1 in apoptosis and hypertrophy processes in cardiomyocytes. Moreover, H9c2-cells were to be established as a model for YB-1 overexpression and the analysis of TGF- β signaling pathway.

Infection of H9c2-cells with AdYB-1 (500 MOI) raised the relative YB-1-mRNA-expression after 24 h, and relative YB-1 protein expression increased after 24 h, 36 h and 48 h significantly. By means of immune fluorescence a preferential nuclear localization of YB-1 in H9c2-cells was proven. TGF- β_1 stimulation (1 ng / ml) led to phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 and finally to apoptosis induction in H9c2-cells. A complex of P-SMAD2 and P-SMAD3 was detected after TGF- β_1 stimulation in H9c2-cells. Stimulation with TGF- β_1 led to a significant increase in expression of the TGF- β target gene SMAD7.

In adult cardiomyocytes TGF- β_1 stimulation in YB-1 overexpressing cells resulted in a significant decrease of SMAD4-, JunB and JunD-mRNA expression. SMAD7 was significantly higher expressed on mRNA- and protein level in adult cardiomyocytes after YB-1 overexpression. The alteration in SMAD and Jun expression seems to a possible mechanism for the anti-apoptotic effect of YB-1 in adult cardiomyocytes. The addition of TGF- β_1 to YB-1 overexpressing cells led to a significant increased cytoplasmic localization of YB-1 in H9c2-cells, whereas YB-1 overexpression alone showed a localization of YB-1 in the nucleus of H9c2-cells.

After stimulation with the α -adrenoreceptor agonist phenylephrin (10 μ M), there was a significant increase in cross sectional area as well as in relative 14 C-proteinbiosynthesis rate in the control group and in the AdGFP (1000 MOI) infected

group. After overexpression of YB-1 (1000 MOI) this hypertrophic stimulus was blocked. In YB-1 overexpressing cells and induction by PE significantly increased the relative mRNA expression of RGS2, which is an inhibitor of G-protein mediated signaling, in cardiomyocytes. In H9c2-cells YB-1 overexpression increased the RGS2-protein expression significantly after PE induction as well as YB-1 overexpression led to a significant increase of the anti-hypertrophic SMAD4-protein expression in cardiomyocytes and H9c2-cells and resulted in a significant increase of mRNA expression of JunD, which mediates antihypertrophic effects under PE in cardiomyocytes. There was a preferential nuclear YB-1 localization in YB-1 overexpressing H9c2-cells under PE-stimulation. The anti-hypertrophic effect is specific for PE stimulation since in contrast to PE, stimulation of hypertrophy by GDF-15 (3 ng / ml) was not blocked in YB-1 overexpression adult cardiomyocytes.

Conclusion: H9c2-cells are suitable as a model for YB-1 overexpression as well as for investigations of TGF- β_1 -induced apoptosis. Different signaling pathways of YB-1 were shown to influence TGF- β_1 -induced apoptosis and PE-induced hypertrophy. YB-1 displays a strong protective effect in cardiomyocytes.

8. Literaturverzeichnis

- Ago, T.; Sadoshima, J. (2006): GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. In: *Circ. Res* 98 (3), S. 294–297.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. In: *Science* 281 (5381), S. 1305–1308.
- Auclair M C, Freyss-Beguïn M. (1980): Heart cells in culture: Methods and applications. In: *Biol Cell* (37), S. 95–208.
- Baker, K. M.; Booz, G. W.; Dostal, D. E. (1992): Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. In: *Annu. Rev. Physiol* 54, S. 227–241.
- Bargou, R. C.; Jürchott, K.; Wagener, C.; Bergmann, S.; Metzner, S.; Bommert, K. et al. (1997): Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. In: *Nat. Med* 3 (4), S. 447–450.
- Bengel, F. M.; Anton, M.; Avril, N.; Brill, T.; Nguyen, N.; Haubner, R. et al. (2000): Uptake of radiolabeled 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-1-beta-D-arabinofuranosyluracil in cardiac cells after adenoviral transfer of the herpesvirus thymidine kinase gene: the cellular basis for cardiac gene imaging. In: *Circulation* 102 (9), S. 948–950.
- Bootcov, M. R.; Bauskin, A. R.; Valenzuela, S. M.; Moore, A. G.; Bansal, M.; He, X. Y. et al. (1997): MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (21), S. 11514–11519.
- Brodde, O.-E.; Bruck, H.; Leineweber, K. (2006): Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. In: *J. Pharmacol. Sci* 100 (5), S. 323–337.
- Coles, L. S.; Lambrusco, L.; Burrows, J.; Hunter, J.; Diamond, P.; Bert, A. G. et al. (2005): Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. In: *FEBS Lett* 579 (24), S. 5372–5378.

Dennler, S.; Goumans, M.-J.; Dijke, P. (2002): Transforming growth factor beta signal transduction. In: *J. Leukoc. Biol* 71 (5), S. 731–740.

Derynck, R.; Zhang, Y. E. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. In: *Nature* 425 (6958), S. 577–584.

Deten, A.; Hölzl, A.; Leicht, M.; Barth, W.; Zimmer, H. G. (2001): Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. In: *J. Mol. Cell. Cardiol* 33 (6), S. 1191–1207.

Didier, D. K.; Schiffenbauer, J.; Woulfe, S. L.; Zacheis, M.; Schwartz, B. D. (1988): Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85 (19), S. 7322–7326.

Diwan, A.; Dorn, Gerald W. (2007): Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. In: *Physiology (Bethesda)* 22, S. 56–64.

Dooley, S.; Said, Harun M.; Gressner, A. M.; Floege, J.; En-Nia, A.; Mertens, P. R. (2006): Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. In: *J. Biol. Chem* 281 (3), S. 1784–1795.

Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicol Pathol* 35 (4), S. 495–516.

Euler-Taimor, G.; Heger, J. (2006): The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. In: *Cardiovasc. Res* 69 (1), S. 15–25.

Evdokimova, V. M.; Kovrigina, E. A.; Nashchekin, D. V.; Davydova, E. K.; Hershey, J. W.; Ovchinnikov, L. P. (1998): The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. In: *J. Biol. Chem* 273 (6), S. 3574–3581.

Evdokimova, V. M.; Wei, C. L.; Sitikov, A. S.; Simonenko, P. N.; Lazarev, O. A.; Vasilenko, K. S. et al. (1995): The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. In: *J. Biol. Chem* 270 (7), S. 3186–3192.

Foley, P. W. X.; Stegemann, B.; Ng, Kelvin; R., Sud; Proudler, A.; Frenneaux, M. P. et al. (2009): Growth differentiation factor-15 predicts mortality and morbidity after cardiac resynchronization therapy. In: *Eur. Heart J* 30 (22), S. 2749–2757.

-
- Frankel, P.; Aronheim, A.; Kavanagh, E.; Balda, M. S.; Matter, K.; Bunney, T. D.; Marshall, C. J. (2005): RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. In: *EMBO J* 24 (1), S. 54–62.
- Fraser, D. J.; Phillips, A. O.; Zhang, X.; van Roeyen, C. R.; Muehlenberg, P.; En-Nia, A.; Mertens, P. R. (2008): Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells. In: *Kidney Int* 73 (6), S. 724–732.
- Glockzin, G.; Mantwill, K.; Jurchott, K.; Bernshausen, A.; Ladhoff, A.; Royer, H.-D. et al. (2006): Characterization of the recombinant adenovirus vector AdYB-1: implications for oncolytic vector development. In: *J. Virol* 80 (8), S. 3904–3911.
- Graumann, P.; Marahiel, M. A. (1996): A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. In: *Bioessays* 18 (4), S. 309–315.
- Hammond, G. L.; Wieben, E.; Markert, C. L. (1979): Molecular signals for initiating protein synthesis in organ hypertrophy. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76 (5), S. 2455–2459.
- Hao, J.; Michalek, C.; Zhang, W.; Zhu, M.; Xu, X.; Mende, U. (2006): Regulation of cardiomyocyte signaling by RGS proteins: differential selectivity towards G proteins and susceptibility to regulation. In: *J. Mol. Cell. Cardiol* 41 (1), S. 51–61.
- Hao, J.; Ju, H.; Zhao, S.; Junaid, A.; Scammell-La Fleur, T.; Dixon, I. M. (1999): Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. In: *J. Mol. Cell. Cardiol* 31 (3), S. 667–678.
- Heger, J.; Warga, B.; Meyering, B.; Abdallah, Y.; Schlüter, K.-D.; Piper, H. M.; Euler, G. (2011): TGFβ receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. In: *J. Cell. Physiol* 226 (10), S. 2683–2690.
- Heger, J.; Schiegnitz, E.; Waldthausen, D. von; Anwar, M. M.; Piper, H. M.; Euler, G. (2010): Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. In: *J. Cell. Physiol* 224 (1), S. 120–126.
- Heger, J.; Peters, S. C.; Piper, H.-M.; Euler, G. (2009): SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. In: *J. Cell. Physiol* 220 (2), S. 515–523.
- Hendriks-Balk, M. C.; Peters, S. L. M.; Michel, M. C.; Alewijnse, A. E. (2008): Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular

system and regulator of G protein signalling proteins. In: *Eur. J. Pharmacol* 585 (2-3), S. 278–291.

Hescheler, J.; Meyer, R.; Plant, S.; Krautwurst, D.; Rosenthal, W.; Schultz, G. (1991): Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. In: *Circ. Res* 69 (6), S. 1476–1486.

Higashi, K.; Tomigahara, Y.; Shiraki, H.; Miyata, K.; Mikami, T.; Kimura, T. et al. (2011): A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice. In: *J. Biol. Chem* 286 (6), S. 4485–4492.

Higashi, K.; Inagaki, Y.; Fujimori, K.; Nakao, A.; Kaneko, H.; Nakatsuka, I. (2003): Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. In: *J. Biol. Chem* 278 (44), S. 43470–43479.

Higashi, K.; Inagaki, Y.; Suzuki, N.; Mitsui, S.; Mauviel, A.; Kaneko, H.; Nakatsuka, I. (2003): Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. In: *J. Biol. Chem* 278 (7), S. 5156–5162.

Hilfiker-Kleiner, D.; Hilfiker, A.; Castellazzi, M.; Wollert, K. C.; Trautwein, C.; Schunkert, H.; Drexler, H. (2006): JunD attenuates phenylephrine-mediated cardiomyocyte hypertrophy by negatively regulating AP-1 transcriptional activity. In: *Cardiovasc. Res* 71 (1), S. 108–117.

Hipfel, R.; Schittek, B.; Bodingbauer, Y.; Garbe, C. (2000): Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. In: *Br. J. Cancer* 82 (6), S. 1149–1157.

Homer, C.; Knight, D. A.; Hananeia, L.; Sheard, P.; Risk, J.; Lasham, A. et al. (2005): Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. In: *Oncogene* 24 (56), S. 8314–8325.

Horvitz, H. R. (1999): Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Cancer Res* 59 (7 Suppl), S. 1701s-1706s.

Igney, F. H.; Krammer, P. H. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (4), S. 277–288.

Inagaki, Y.; Kushida M.; Higashi K.; Itoh J.; Higashiyama R.; Hong Y. Y. et al. (2005): Cell type-specific intervention of transforming growth factor beta/Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. In: *Gastroenterology* 129 (1), S. 259–268.

Ito, H.; Hirata, Y.; Adachi, S.; Tanaka, M.; Tsujino, M.; Koike, A. et al. (1993): Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. In: *J. Clin. Invest* 92 (1), S. 398–403.

Izumi, H.; Imamura, T.; Nagatani, G.; Ise, T.; Murakami, T.; Uramoto, H. et al. (2001): Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'–5' exonuclease activity. In: *Nucleic Acids Res* 29 (5), S. 1200–1207.

Izumi, M.; Fujio, Y.; Kunisada, K.; Negoro, S.; Tone, E.; Funamoto, M. et al. (2001): Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. In: *J. Biol. Chem* 276 (33), S. 31133–31141.

Jenkins, R. H.; Bennagi, R.; Martin, J.; Phillips, A. O.; Redman, J. E.; Fraser, D. J. (2010): A conserved stem loop motif in the 5'untranslated region regulates transforming growth factor- β (1) translation. In: *PLoS ONE* 5 (8), S. e12283.

Jurchott, K.; Bergmann, S.; Stein, U.; Walther, W.; Janz, M.; Manni, I. et al. (2003): YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. In: *J. Biol. Chem* 278 (30), S. 27988–27996.

Kamalov, G.; Varma, B. R.; Lu, L.; Sun, Y.; Weber, K. T.; Guntaka, R. V. (2005): Expression of the multifunctional Y-box protein, YB-1, in myofibroblasts of the infarcted rat heart. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 334 (1), S. 239–244.

Kaminska, B.; Pyrzynska, B.; Ciechomska, I.; Wisniewska, M. (2000): Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. In: *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60 (3), S. 395–402.

Kempf, T. Björklund, E.; Olofsson, S.; Lindahl, B.; Allhoff, T.; Peter, T. et al. (2007): Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction. In: *Eur. Heart J* 28 (23), S. 2858–2865.

Kempf, T.; Eden, M.; Strelau, J.; Naguib, M.; Willenbockel, C.; Tongers, J. et al. (2006): The transforming growth factor-beta superfamily member growth-

differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. In: *Circ. Res* 98 (3), S. 351–360.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br. J. Cancer* 26 (4), S. 239–257.

Kimes, B. W.; Brandt, B. L. (1976): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. In: *Exp. Cell Res* 98 (2), S. 367–381.

Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: *EMBO J* 14 (22), S. 5579–5588.

Kohno, K.; Izumi, H.; Uchiumi, T.; Ashizuka, M.; Kuwano, M. (2003): The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. In: *Bioessays* 25 (7), S. 691–698.

Kohno, K.; Sato, S.; Uchiumi, T.; Takano, H.; Tanimura, H.; Miyazaki, M. et al. (1992): Activation of the human multidrug resistance-1 (mdr1) gene promoter in response to inhibitors of DNA topoisomerases. In: *Int. J. Oncol* 1 (1), S. 73–77.

Koike, K.; Uchiumi, T.; Ohga, T.; Toh, S.; Wada, M.; Kohno, K.; Kuwano, M. (1997): Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. In: *FEBS Lett* 417 (3), S. 390–394.

Komuro, I.; Katoh, Y.; Kaida, T.; Shibasaki, Y.; Kurabayashi, M.; Hoh, E. et al. (1991): Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. In: *J. Biol. Chem* 266 (2), S. 1265–1268.

Kurosaka, K.; Takahashi, M.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y. (2003): Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. In: *J. Immunol* 171 (9), S. 4672–4679.

Kyuho J., Hayeong K.: Modulation of the caveolin-3 localization to caveolae and STAT3 to mitochondria by catecholamine-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cardiomyoblasts.

Ladomery, M.; Sommerville, J. (1995): A role for Y-box proteins in cell proliferation. In: *Bioessays* 17 (1), S. 9–11.

-
- Lagna, G.; Hata, A.; Hemmati-Brivanlou, A.; Massagué, J. (1996): Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. In: *Nature* 383 (6603), S. 832–836.
- Lasham, A.; Moloney, S.; Hale, T.; Homer, C.; Zhang, Y. F.; Murison, J. G. et al. (2003): The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. In: *J. Biol. Chem* 278 (37), S. 35516–35523.
- Lasham, A.; Lindridge, E.; Rudert, F.; Onrust, R.; Watson, J. (2000): Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. In: *Gene* 252 (1-2), S. 1–13.
- Lee, K.-H.; Bae, J.-S.; Lee, S.-C.; Paik, J.-Y.; Matsui, T.; Jung, K.-H. et al. (2006): Evidence that myocardial Na/I symporter gene imaging does not perturb cardiac function. In: *J. Nucl. Med* 47 (11), S. 1851–1857.
- Li, R. C.; Ping, P.; Zhang, J.; Wead, W. B.; Cao, X.; Gao, J. et al. (2000): PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 279 (4), S. H1679-89.
- Liberati, N. T.; Datto, M. B.; Frederick, J. P.; Shen, X.; Wong, C.; Rougier-Chapman, E. M.; Wang, X. F. (1999): Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 (9), S. 4844–4849.
- Liu, F.; Pouponnot, C.; Massagué, J. (1997): Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. In: *Genes Dev* 11 (23), S. 3157–3167.
- Marenstein, D. R.; Ocampo, M. T.; Chan, M. K.; Altamirano, A.; Basu, A. K.; Boorstein, R. J. et al. (2001): Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. In: *J. Biol. Chem* 276 (24), S. 21242–21249.
- Massagué, J.; Blain, S. W.; Lo, R. S. (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. In: *Cell* 103 (2), S. 295–309.
- Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annu. Rev. Biochem* 67, S. 753–791.
- Matsumoto, K.; Bay, B.-H. (2005): Significance of the Y-box proteins in human cancers. In: *J Mol Genet Med* 1 (1), S. 11–17.

- Matsumoto, K.; Wolffe, A. P. (1998): Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. In: *Trends Cell Biol* 8 (8), S. 318–323.
- Ménard, C.; Pupier, S.; Mornet, D.; Kitzmann, M.; Nargeot, J.; Lory, P. (1999): Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. In: *J. Biol. Chem* 274 (41), S. 29063–29070.
- Mertens, P. R.; Alfonso-Jaume, M. A.; Steinmann, K.; Lovett, D. H. (1998): A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. In: *J. Biol. Chem* 273 (49), S. 32957–32965.
- Miwa, A.; Higuchi, T.; Kobayashi, S. (2006): Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (11), S. 1675–1681.
- Nakao, A.; Afrakhte, M.; Morén, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R. et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. In: *Nature* 389 (6651), S. 631–635.
- Nekrasov, M. P.; Ivshina, M. P.; Chernov, K. G.; Kovrigina, E. A.; Evdokimova, V. M.; Thomas, Adri A. M. et al. (2003): The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. In: *J. Biol. Chem* 278 (16), S. 13936–13943.
- Nelson, R. W.; Couto, C. G. (2006): *Innere Medizin der Kleintiere*. 1. Aufl. München u.a: Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://media.obvsg.at/AC04996004-4001>.
- Noble, J. E.; Bailey, Marc J. A. (2009): Quantitation of protein. In: *Meth. Enzymol* 463, S. 73–95.
- Norbury, C. J.; Hickson, I. D. (2001): Cellular responses to DNA damage. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 41, S. 367–401.
- Oda, Y.; Sakamoto, A.; Shinohara, N.; Ohga, T.; Uchiumi, T.; Kohno, K. et al. (1998): Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. In: *Clin. Cancer Res* 4 (9), S. 2273–2277.
- Okamoto, T.; Izumi, H.; Imamura, T.; Takano, H.; Ise, T.; Uchiumi, T. et al. (2000): Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. In: *Oncogene* 19 (54), S. 6194–6202.

-
- Park, S. H. (2005): Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. In: *J. Biochem. Mol. Biol* 38 (1), S. 9–16.
- Partsch, S. (2009): Einfluss einer adenoviralen Überexpression des SMAD-Inhibitors YB-1 auf die Hypertrophie- und Apoptose-Entwicklung in isolierten adulten Herzmuskelzellen der Ratte. Dissertationsschrift. Justus-Liebig Universität, Gießen.
- Pfaffl, M. W. (2010): The ongoing evolution of qPCR. In: *Methods* 50 (4), S. 215–216.
- Pönicke, K.; Schlüter, K. D.; Heinroth-Hoffmann, I.; Seyfarth, T.; Goldberg, M.; Osten, B. et al. (2001): Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only alpha1A-adrenoceptors. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 364 (5), S. 444–453.
- Rajamani, U.; Essop, M. F. (2010): Hyperglycemia-mediated activation of the hexosamine biosynthetic pathway results in myocardial apoptosis. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 299 (1), S. C139-47.
- Ruiter, N. D. de; Wolthuis, R. M.; van Dam, H.; Burgering, B. M.; Bos, J. L. (2000): Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. In: *Mol. Cell. Biol* 20 (22), S. 8480–8488.
- Saelens, X.; Festjens, N.; Vande W. L.; van Gorp, M.; van Loo, G.; Vandenabeele, P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. In: *Oncogene* 23 (16), S. 2861–2874.
- Samuel, S.; Twizere, J.-C.; Bernstein, L. R. (2005): YB-1 represses AP1-dependent gene transactivation and interacts with an AP-1 DNA sequence. In: *Biochem. J* 388 (Pt 3), S. 921–928.
- Sato, Y.; Tanaka, K.; Lee, G.; Kanegae, Y.; Sakai, Y.; Kaneko, S. et al. (1998): Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 244 (2), S. 455–462.
- Schitteck, B.; Psenner, K.; Sauer, B.; Meier, F.; Iftner, T.; Garbe, C. (2007): The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. In: *Int. J. Cancer* 120 (10), S. 2110–2118.

Schlüter, K.-D.; Piper, H. M.; Wenzel S. (2007): The Role of Adrenoreceptors in Mechanotransduction. Cardiac Mechonotransduction. In: Springer Science+Business Media, LLC.

Schlüter, K.-D.; Schreiber, D. (2005): Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. In: *Methods Mol. Biol* 290, S. 305–314.

Schlüter, K.-D.; Piper, H. M. (1992): Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. In: *Am. J. Physiol* 263 (6 Pt 2), S. H1739-46.

Schneiders, D.; Heger, J.; Best, P.; Piper, H. M.; Taimor, G. (2005): SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. In: *Cardiovasc. Res* 67 (1), S. 87–96.

Shen, H.; Xu, W.; Luo, W.; Zhou, L.; Yong, W.; Chen, F. et al. (2011): Upregulation of *mdr1* gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. In: *Exp. Hematol* 39 (5), S. 558–569.

Shibahara, K.; Sugio, K.; Osaki, T.; Uchiumi, T.; Maehara, Y.; Kohno, K. et al. (2001): Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. In: *Clin. Cancer Res* 7 (10), S. 3151–3155.

Shiota, M.; Izumi, H.; Tanimoto, A.; Takahashi, M.; Miyamoto, N.; Kashiwagi, E. et al. (2009): Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth. In: *Cancer Res* 69 (7), S. 3148–3156.

Shiota, M.; Izumi, H.; Onitsuka, T.; Miyamoto, N.; Kashiwagi, E.; Kidani, A. et al. (2008): Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. In: *Oncogene* 27 (42), S. 5543–5553.

Stein, U.; Jürchott, K.; Walther, W.; Bergmann, S.; Schlag, P. M.; Royer, H. D. (2001): Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. In: *J. Biol. Chem* 276 (30), S. 28562–28569.

Stenina, O. I.; Poptic, E. J.; DiCorleto, P. E. (2000): Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. In: *J. Clin. Invest* 106 (4), S. 579–587.

Stickeler, E.; Fraser, S. D.; Honig, A.; Chen, A. L.; Berget, S. M.; Cooper, T. A. (2001): The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. In: *EMBO J* 20 (14), S. 3821–3830.

Taimor, G.; Schlüter, K-D; Best, P.; Helmig, S.; Piper, H. M. (2004): Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 286 (6), S. H2369-75.

Taimor, G.; Rakow, A.; Piper, H. M. (2001): Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. In: *FASEB J* 15 (13), S. 2518–2520.

Takimoto, E.; Koitabashi, N.; Hsu, S.; Ketner, E. A.; Zhang, M.; Nagayama, T. et al. (2009): Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. In: *J. Clin. Invest* 119 (2), S. 408–420.

Tan, M.; Wang, Y.; Guan, K.; Sun, Y. (2000): PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (1), S. 109–114.

Tsang, S.; Woo, A. Y.-H.; Zhu, W.; Xiao, R.-P. (2010): Deregulation of RGS2 in cardiovascular diseases. In: *Front Biosci (Schol Ed)* 2, S. 547–557.

Ulloa, L.; Doody, J.; Massagué, J. (1999): Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. In: *Nature* 397 (6721), S. 710–713.

Uría, J. A.; Jiménez, M. G.; Balbín, M.; Freije, J. M.; López-Otín, C. (1998): Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. In: *J. Biol. Chem* 273 (16), S. 9769–9777.

van Geest, R. J.; Klaassen, I.; Vogels, I. M. C.; van Noorden, C. J. F.; Schlingemann, R. O. (2010): Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy? In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 51 (4), S. 1857–1865.

Virolle, T.; Monthouel, M. N.; Djabari, Z.; Ortonne, J. P.; Meneguzzi, G.; Aberdam, D. (1998): Three activator protein-1-binding sites bound by the Fra-2/JunD complex

cooperate for the regulation of murine laminin alpha3A (lama3A) promoter activity by transforming growth factor-beta. In: *J. Biol. Chem* 273 (28), S. 17318–17325.

Wang, J.; Xu, N.; Feng, X.; Hou, N.; Zhang, J.; Cheng, X. et al. (2005): Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Circ. Res* 97 (8), S. 821–828.

Wang, B.; Hao, J.; Jones, S. C.; Yee, M.-S.; Roth, J. C.; Dixon, Ian M. C. (2002): Decreased Smad 7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 282 (5), S. H1685-96.

Pschyrembel, W.: *Klinisches Wörterbuch*, Pschyrembel. 261. Auflage.

Wilusz CJ, Wormington M. Peltz S. W.: The cap-to-tail guide to mRNA turnover. In: *Nat Rev Mol Cell Biology* 2001.

Wolffe, A. P.; Tafuri, S.; Ranjan, M.; Familari, M. (1992): The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. In: *New Biol* 4 (4), S. 290–298.

Wollert, K. C.; Kempf, T.; Peter, T.; Olofsson, S.; James, S.; Johnston, N. et al. (2007): Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. In: *Circulation* 115 (8), S. 962–971.

Wu, J. W.; Hu, M.; Chai, J.; Seoane, J.; Huse, M.; Li, C. et al. (2001): Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. In: *Mol. Cell* 8 (6), S. 1277–1289.

Xie, W.; Yang, J.; Cao, Y.; Peng, C.; Ning, H.; Zhang, F.; You, J. (2011): Expression of Y-Box-binding protein 1 in Chinese patients with breast cancer. In: *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.

Xu, J.; Kimball, T. R.; Lorenz, J. N.; Brown, D. A.; Bauskin, A. R.; Klevitsky, R. et al. (2006): GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. In: *Circ. Res* 98 (3), S. 342–350.

-
- Yamamura, Y.; Hua, X.; Bergelson, S.; Lodish, H. F. (2000): Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis. In: *J. Biol. Chem* 275 (46), S. 36295–36302.
- Yang, Y.-F.; Wu, C.-C.; Chen, W.-P.; Su, M.-J. (2009): Transforming growth factor-beta type I receptor/ALK5 contributes to doxazosin-induced apoptosis in H9C2 cells. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 380 (6), S. 561–567.
- Yue, J.; Mulder, K. M. (2000): Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. In: *J. Biol. Chem* 275 (40), S. 30765–30773.
- Zhang, M.; Fraser, D.; Phillips, A. (2006): ERK, p38, and Smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor-beta1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells. In: *Am. J. Pathol* 169 (4), S. 1282–1293.
- Zhang, W.; Anger, T.; Su, J.; Hao, J.; Xu, X.; Zhu, M. et al. (2006): Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy. In: *J. Biol. Chem* 281 (9), S. 5811–5820.
- Zhang, Y. F.; Homer, C.; Edwards, S. J.; Hananeia, L.; Lasham, A.; Royds, J. et al. (2003): Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. In: *Oncogene* 22 (18), S. 2782–2794.
- Zhang, Y.; Feng, X. H.; Derynck, R. (1998): Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. In: *Nature* 394 (6696), S. 909–913.
- Zhu, H.-L.; Wei, X.; Qu, S.-L.; Zhang, C.; Zuo, X.-X; Feng, Y.-S. et al. (2011): Ischemic postconditioning protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by inducing MIP2. In: *Exp. Mol. Med* 43 (8), S. 437–445.
- Zou, M.-X.; Roy, A. A.; Zhao, Q.; Kirshenbaum, L. A.; Karmazyn, M.; Chidiac, P. (2006): RGS2 is upregulated by and attenuates the hypertrophic effect of alpha1-adrenergic activation in cultured ventricular myocytes. In: *Cell. Signal* 18 (10), S. 1655–1663.
- Zou, Y.; Chien, K. R. (1995): EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. In: *Mol. Cell. Biol* 15 (6), S. 2972–2982.

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Gerhild Euler des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, für die Bereitstellung des Themas sowie für ihre absolute Zuverlässigkeit und stete Freundlichkeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Jacqueline Heger bedanken, die für mich jederzeit ein sehr wichtiger und äußerst zuverlässiger Ansprechpartner war. Ich bedanke mich für die außerordentliche fachliche Unterstützung, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

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

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit bedanke ich mich sehr herzlich beim internationalen Graduiertenkolleg „PROMISE“.

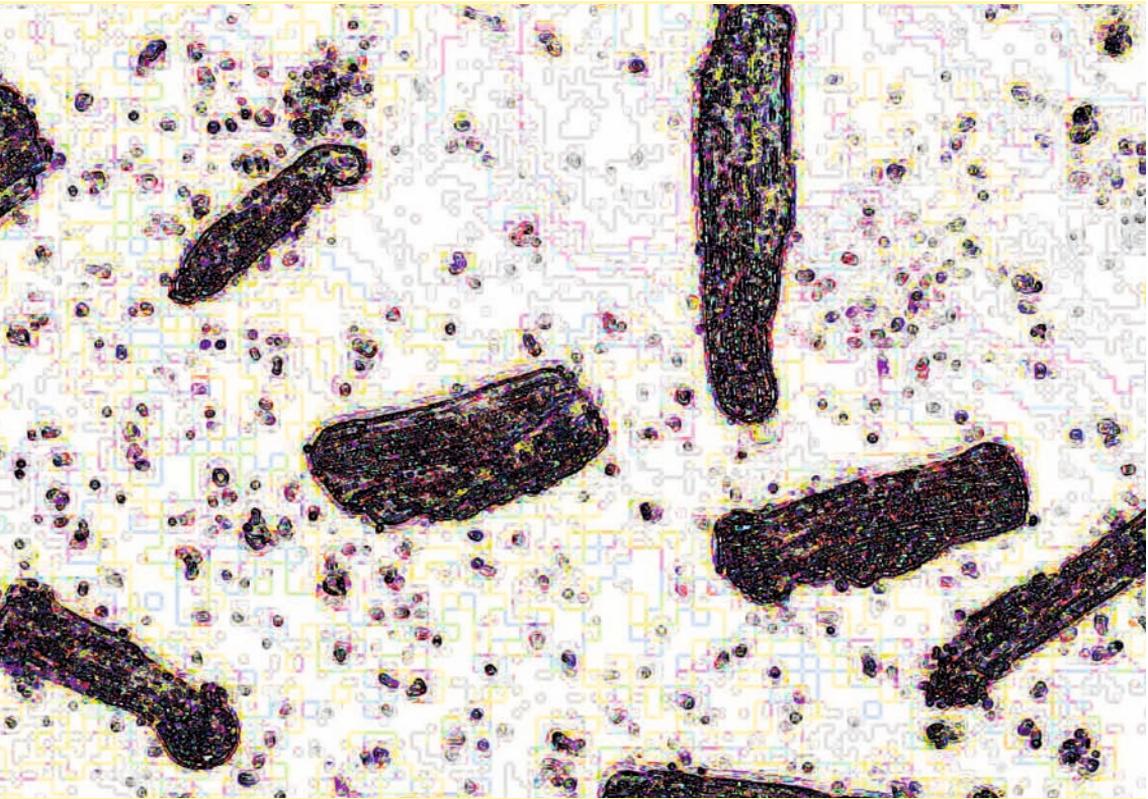
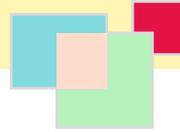
Ganz besonderen Dank richte ich an alle Technischen Assistenten für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft.

All meinen Kollegen im Physiologischen Institut möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonderer Dank gilt Mona Prieß, Dr. med. vet. Yvonne Osygus, Cornelia Sprejz, Dr. med. vet Pia Weber und den anderen Doktoranden des Instituts, die durch ein außergewöhnliches Arbeitsklima die Zeit am Institut und darüber hinaus wesentlich bereichert haben.

Mein persönlicher Dank gilt aber vor allem meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Großeltern und meinen Freunden, die mir die nötige Kraft gegeben und selbst in schwierigen Zeiten zu mir gestanden haben. Ayla danke ich für ihre stete Geduld und gute Laune in unserem Doktorandenzimmer.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5903-3



9 783835 1959033