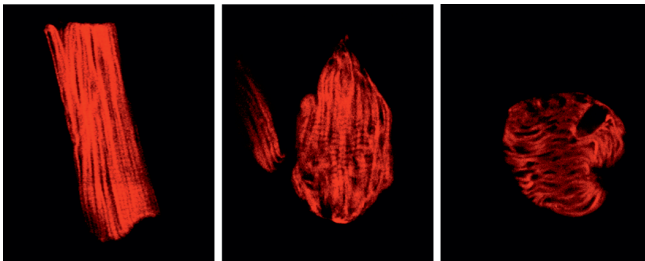


ANTONIA PETERSEN

Optimierung kardiomyozytärer Umbauprozesse
durch Aktivierung gezielter Signalkaskaden



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2020

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Optimierung kardiomyozytärer Umbauprozesse
durch Aktivierung gezielter Signalkaskaden**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Antonia Petersen, geb. Heß

aus Nürnberg

Gießen 2019

Aus dem Institut für Physiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Schulz,
der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

2. Gutachter: PD Dr. Stefan Rupp

Tag der Disputation: 29. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Kardiomyozytäre Hypertrophie und Dedifferenzierung im Rahmen des kardialen Remodellings</i>	1
1.2 <i>Isolierte adulte ventrikuläre Kardiomyozyten als Modell</i>	1
1.3 <i>Aktivierung des Proteasoms im Zuge kardiomyozytärer Hypertrophie</i>	3
1.4 <i>Mediatoren kardialer Hypertrophie</i>	4
1.4.1 <i>α-1-adrenerge Rezeptor-Agonisten</i>	4
1.4.2 <i>Angiotensin II</i>	6
1.4.3 <i>p38-MAPK</i>	6
1.5 <i>Kardiomyozytäre Entwicklung</i>	8
1.6 <i>Zusammenfassung und Fragestellung</i>	9
2 Material und Methoden	11
2.1 <i>Material</i>	11
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	11
2.1.2 <i>Primer</i>	14
2.1.3 <i>Antikörper</i>	14
2.1.4 <i>Laborgeräte</i>	15
2.2 <i>Methoden</i>	19
2.2.1 <i>Isolation und Kultivierung adulter Kardiomyozyten</i>	19
2.2.2 <i>Fluoreszenzmikroskopie: Apoptose-/Nekrose-Färbung mit HOECHST/Propidiumiodid</i>	22
2.2.3 <i>Konfokalmikroskopie: Darstellung der F-Aktin-Filamente mittels Phalloidin-Tetramethylrhodamin-Färbung</i>	22
2.2.4 <i>Quantitative Real-Time PCR: Bestimmung der relativen Genexpression</i>	24
2.2.5 <i>SDS-PAGE, Western Blot und Immunomarkierung: Bestimmung der relativen Proteinexpression</i>	29
2.2.6 <i>Statistik</i>	32
3 Ergebnisse	34
3.1 <i>Kulturen adulter Kardiomyozyten an Tag 0 in Kultur</i>	34
3.1.1 <i>Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid</i>	34
3.1.2 <i>Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin</i>	35
3.1.3 <i>Einfluss von Lebensalter und Gewicht der Versuchstiere auf das Volumen der Kardiomyozyten</i>	36
3.1.4 <i>Zusammenfassung zu 3.1</i>	36
3.2 <i>Kulturen adulter Kardiomyozyten unter FCS-haltigen Kulturbedingungen</i>	37
3.2.1 <i>Beobachtung nach 2 Tagen in Kultur</i>	37

3.2.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid	37
3.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	38
3.2.1.3 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin	39
3.2.2 Beobachtungen nach 5 Tagen in Kultur	41
3.2.3 Einfluss des Lebensalters auf die Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	43
3.2.3.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid	43
3.2.3.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	44
3.2.4 Zusammenfassung zu 3.2	44
3.3 <i>Effekte von Phenylephrin und Angiotensin II auf Kulturen adulter Kardiomyozyten</i>	45
3.3.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur	45
3.3.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid	45
3.3.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	47
3.3.1.3 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin	48
3.3.2 Zusammenfassung zu 3.3	48
3.4 <i>Effekt des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 auf FCS-haltige Kulturen adulter Kardiomyozyten</i>	49
3.4.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur	49
3.4.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid	49
3.4.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	50
3.4.2 Zusammenfassung zu 3.4	50
3.5 <i>Effekte der Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen und des p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 auf die relative Genexpression von PSMB9 in Kulturen adulter Kardiomyozyten</i>	51
3.5.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur	51
3.5.2 Zusammenfassung zu 3.5	52
3.6 <i>Effekte der Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen und des p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 auf die relative Proteinexpression von LMP2 in Kulturen adulter Kardiomyozyten</i>	52
3.6.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur	52
3.6.2 Zusammenfassung zu 3.6	53
3.7 <i>Auswirkungen der Inhibition des Proteasoms auf FCS-haltige Kulturen adulter Kardiomyozyten</i>	54
3.7.1 Effekt des Proteasomen-Inhibitors MG-132 auf FCS-haltige Kulturen	54
3.7.2 Effekt der PSMB9 siRNA auf FCS-haltige Kulturen	55
3.7.2.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur	55
3.7.2.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid	55

3.7.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden	56
3.7.2.2 Zusammenfassung zu 3.7	57
3.8 <i>Die relative Genexpression von PSMB9 in spontan hypertensiven Ratten</i>	57
3.8.1 Beobachtungen über den Verlauf von 7,5 Monaten	57
3.8.2 Zusammenfassung zu 3.8	58
4 Diskussion	59
4.1 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	59
4.2 <i>Diskussion der Ergebnisse</i>	60
4.2.1 Das Abrunden der Kardiomyozyten erfordert die Anwesenheit von FCS	60
4.2.2 Phenylephrin, nicht jedoch Angiotensin II, kann FCS als Trigger für das Abrunden der Kardiomyozyten ersetzen	61
4.2.3 Das Abrunden der Kardiomyozyten erfordert die verstärkte Synthese von LMP2	62
4.2.4 Die p38-MAPK ist entscheidend an der verstärkten Synthese von LMP2 und dem Abrunden der Kardiomyozyten beteiligt	63
4.2.5 Einkernige Kardiomyozyten runden zu einem höheren Prozentsatz ab als mehrkernige Kardiomyozyten	63
4.3 <i>Schlussfolgerungen</i>	64
5 Anhang	66
5.1 <i>Abbildungen</i>	66
5.2 <i>Zusammenfassung</i>	74
5.3 <i>Summary</i>	75
5.4 <i>Literaturverzeichnis</i>	76
5.5 <i>Publikationsverzeichnis</i>	85
5.6 <i>Erklärung zur Dissertation</i>	86
5.7 <i>Danksagung</i>	87
5.8 <i>Lebenslauf</i>	88

1 Einleitung

1.1 Kardiomyozytäre Hypertrophie und Dedifferenzierung im Rahmen des kardialen Remodellings

Die kardiale Hypertrophie stellt eine Reaktion des Herzens auf erhöhte hämodynamische Belastung dar (Levy et al., 1992). Als pathophysiologische Trigger hierfür gelten u.a. Bluthochdruck oder eine ischämische Schädigung des Herzens durch einen Herzinfarkt. In beiden Fällen geht die kardiale Hypertrophie mit weitreichenden Veränderungen der zellulären Funktionsweise einher, welche unter dem Begriff kardiales Remodelling zusammengefasst werden und langfristig zu einer Verminderung der kardialen Leistungsfähigkeit und damit zur Herzinsuffizienz führen (Schlüter, 2016 a). Aus der Framingham Heart Study geht hervor, dass das Lebenszeitrisiko an Herzinsuffizienz zu erkranken für beide Geschlechter bei 20 % liegt (Lloyd-Jones et al., 2002). Immer noch versterben 50 % der Patienten innerhalb von fünf Jahre nach der Diagnosestellung (Mozzafarian et al., 2016).

Das kardiale Remodelling zeichnet sich durch die genetische Reprogrammierung der Herzmuskelzellen aus. Fetale Gene, wie *α -skeletal actin* und *β -myosin heavy chain* (Izumo et al., 1988), werden reexprimiert und der kontraktile Apparat umstrukturiert (Lorell und Carabello, 2000). Dieses Vermögen zur „Dedifferenzierung als Anpassungsprinzip“ (Szibor et al., 2014) stellt in Frage, inwiefern adulte Kardiomyozyten als terminal differenzierte Zellen anzusehen sind, denen jede Form der Plastizität abgeht (Leri et al., 2011). Weiterhin gilt es zu klären, wie die Fähigkeit der Herzmuskelzellen zur Dedifferenzierung in die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge der Herzinsuffizienz einzuordnen ist (Szibor et al., 2014; Leri et al., 2015).

1.2 Isolierte adulte ventrikuläre Kardiomyozyten als Modell

Die Isolierung adulter Ratten-Kardiomyozyten und ihre Kultivierung unter physiologischen Bedingungen gelingen seit den 1980er Jahren. Sie gestatten Experimente mit Herzmuskelzellen unter kontrollierten Bedingungen (Jacobson und Piper, 1986). Adulte Kardiomyozyten unterscheiden sich in mehrererlei Hinsicht von fetalen Kardiomyozyten. In den hier vorgestellten Experimenten werden adulte Kardiomyozyten isoliert und kultiviert, da Einsichten über die Pathologie des erwachsenen Herzens gewonnen werden

sollen (Schlüter, 1998). Erkenntnisse aus Untersuchungen an isolierten adulten Ratten-Kardiomyozyten lassen sich in Kulturen mit isolierten Kardiomyozyten größerer Säugetiere reproduzieren (Decker et al., 1991; LoRusso et al., 1997).

Unter *fetal calf serum* (FCS)-haltigen Kulturbedingungen durchlaufen die isolierten Kardiomyozyten einen mehrtägigen Prozess der De- und Redifferenzierung, der als Anpassung an die Kulturbedingungen verstanden werden kann und den Kardiomyozyten das Überleben in Kultur über einen langen Zeitraum hinweg ermöglicht (Bugaisky und Zak, 1989; Nippert et al., 2016). Dabei verlieren die Kardiomyozyten innerhalb der ersten 48 Stunden in Kultur ihr stäbchenförmiges Aussehen und runden sich ab. Dieser Vorgang ist gekennzeichnet durch die Degradation ihres kontraktile Apparats. In den darauffolgenden Tagen kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien, Zell-Zell-Kontakten und spontanen Kontraktionen. Die Neo-Sarkomerogenese erfolgt zunächst perinukleär und entlang von sogenannter Aktin-Stress-Fasern. Begleitet wird die strukturelle Neuorganisation von der Expression fetaler Gene, wie β -*myosin heavy chain* und α -*smooth muscle actin*, und einer daraus resultierenden veränderten Zusammensetzung des kontraktile Apparats (Schwarzfeld und Jacobson, 1981; Eppenberger et al., 1988; Eppenberger-Eberhardt et al., 1990). Nachdem die Kardiomyozyten den Anpassungsprozess vollständig durchlaufen haben, weisen sie Charakteristika embryonaler, fetaler und adulter Kardiomyozyten auf (Schlüter, 2016 b). Unter Serum-freien Kulturbedingungen sterben die isolierten Kardiomyozyten innerhalb weniger Tage ab (Volz et al., 1991).

Die unter FCS-haltigen Kulturbedingungen beobachteten Anpassungsvorgänge isolierter adulter Ratten-Kardiomyozyten erscheinen in einem hohen Maße vergleichbar mit den kardiomyozytären Anpassungsvorgängen im Rahmen des kardialen Remodellings (siehe 1.1.). Isolierte adulte Ratten-Kardiomyozyten stellen somit wohl ein geeignetes Modell dar, um die hypertrophe Adaptation im Rahmen des kardialen Remodellings zu untersuchen (Kubin et al., 2011).

Ausgehend von den genannten Beobachtungen in Kultur lässt sich die hypertrophe Anpassung als ein komplexer Prozess von De- und Redifferenzierung interpretieren, in dem die Dedifferenzierung den initialen Schritt darstellt und mit einer Degradation des kontraktile Apparats einhergeht (Nippert, et al., 2016).

Die hier vorgelegte Untersuchung konzentriert sich auf die Vorgänge innerhalb der ersten 48 Stunden in Kultur unter FCS-haltigen Bedingungen.

1.3 Aktivierung des Proteasoms im Zuge kardiomyozytärer Hypertrophie

Das Ubiquitin-Proteasom-System – zuständig für die Degradation zahlreicher zellulärer Proteine – spielt eine entscheidende Rolle für die Homöostase eukaryotischer Zellen (Pagan et al., 2013). Das Proteasom zerlegt ubiquitinierte Proteine in Peptide (Thrower et al., 2000). Hierzu zählen Strukturproteine, Proteine des kontraktile Apparats und Signalproteine (Rock et al., 1994; Eble et al., 1999; Fielitz et al., 2007). Proteasomale Dysfunktion trägt zur Pathogenese sowie dem Progress kardialer Erkrankungen bei (Su und Wang, 2009; Willis und Patterson, 2013; Gilda und Gomes, 2017).

Das Proteasom besteht aus zahlreichen Untereinheiten, die in ihrer Zusammensetzung variieren (Dahlmann et al., 2000). Grundsätzlich setzt sich das Proteasom aus der proteolytischen 20S und bis zu zwei regulatorischen 19S Einheiten zusammen. Weitere regulatorisch wirkende Einheiten können darüber hinaus hinzukommen. Die regulatorischen Einheiten übernehmen u.a. ATP-abhängig die Erkennung und Entfaltung der ubiquitinierten Proteine. Die Proteolyse erfolgt ATP-unabhängig im 20S Proteasom, welches bei oxidativem Stress außerdem zur Ubiquitin-unabhängigen Proteindegradation in der Lage ist. Es besteht aus vier übereinander liegenden Ringen, die aus jeweils sieben Untereinheiten bestehen. Jeweils zwei Ringe entsprechen sich in ihrer Zusammensetzung, die beiden zentral aneinander liegenden β -Ringe werden dabei von zwei α -Ringen flankiert (Drews et al., 2007 b; Drews, 2016).

Jeweils drei der sieben β -Untereinheiten sind proteolytisch aktiv. $\beta 1$ verfügt dabei über Kaspase-ähnliche, $\beta 2$ über Trypsin-ähnliche und $\beta 5$ über Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Rivett, 1989; Groll et al., 1999). Diese Untereinheiten können durch sog. induzierbare Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ ersetzt werden (Unno et al., 2002; Huber et al., 2012), wodurch die Kaspase-ähnliche-Aktivität zugunsten der Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität reduziert wird (Gaczynska et al., 1994). Sie finden sich zu jeder Zeit in Kardiomyozyten, wenn auch in geringerer Menge als ihre nicht-induzierbaren Pendanten (Gomes et al., 2006). Mit ihrer Inkorporation beschleunigt sich die Degradationsrate polyubiquitinerter Proteine durch das Proteasom. Dies konnte u.a. an defekten ribosomalen und weiteren Proteinen gezeigt werden (Ebstein et al., 2012).

Die verstärkte kardiale Expression der induzierbaren Untereinheiten wurde zunächst bei Mäusen mit virus-induzierter Myokarditis beschrieben und das auf diese Weise formierte Proteasom als Immunoproteasom bezeichnet (Szalay, 2006). Sie wurde jedoch auch im

Rahmen Isoprenalin-induzierter Myokardhypertrophie festgestellt und postuliert, dass in Abhängigkeit von der jeweiligen Zusammensetzung verschiedene Proteasomen-Subpopulationen im Herz existierten (Drews et al., 2007 a; Drews et al., 2010). Die Abwesenheit der induzierbaren Untereinheit $\beta 1i$ im Herzen von Mäusen resultiert in einer kontraktile Dysfunktion des Myokards (Zu et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob isolierte adulte Kardiomyozyten die Zusammensetzung ihres Proteasoms zugunsten der induzierbaren Untereinheiten im Rahmen der hier betrachteten Anpassungsvorgänge in Kultur verändern. Exemplarisch geschieht dies anhand von $\beta 1i$. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse wird *in vivo* an spontan hypertensiven Ratten überprüft. Bei diesen Tieren wurde in der Vergangenheit bei uneingeschränkter Herzleistung eine erhöhte proteasomale Aktivität im Herzen nachgewiesen (Campos et al., 2014).

Die Untereinheit $\beta 1i$ wird im Folgenden als LMP2 bezeichnet, der Name des dazugehörigen Gens lautet *proteasome subunit beta 9* (PSMB9) und befindet sich auf Chromosom 6 in der MHC Klasse II Region. LMP steht für *low molecular weight protein*. Diese Bezeichnung wurde von Monaco und McDevitt in der Erstbeschreibung gewählt, um die LMP-Antigene von den anderen MHC-Antigenen zu differenzieren (1982).

1.4 Mediatoren kardialer Hypertrophie

1.4.1 α -1-adrenerge Rezeptor-Agonisten

Neurotransmitter und Hormone, insbesondere solche, die dem Sympathikus und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zuzuordnen sind, spielen in der Entwicklung der Hypertrophie im Rahmen der Herzinsuffizienz eine wesentliche Rolle. Bedingungen, die zur Hypertrophie im Rahmen der Herzinsuffizienz (siehe 1.1) führen, sind von erhöhten Katecholaminspiegeln gekennzeichnet (Morgan und Baker, 1991).

Die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin entfalten ihre Wirkung über die Bindung an adrenerge Rezeptoren, wobei α - (α -1, α -2) von β -adrenergen (β -1, β -2, β -3) Rezeptoren unterschieden werden (Jensen et al., 2014). Im Herzen existieren drei α -1-adrenerge Rezeptor-Subtypen, α -1A, α -1B sowie α -1D. Im Gegensatz zu α -1A und α -1B finden sich die α -1D-adrenergen Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der Koronararterien (Jensen et al., 2009 a).

Bei den α -1-adrenergen Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Signalweiterleitung erfolgt durch $G\alpha_{q11}$ u.a. über die Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerin, wodurch die translationale Effektivität gesteigert wird. Die gesamte Signalweiterleitung ist bereits umfassend beschrieben (Cotecchia et al., 2015).

Die Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren steigert die Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten und resultiert, wie in zahlreichen Untersuchungen gezeigt, in einer Herzhypertrophie. Beispielhaft seien die folgenden Veröffentlichungen aufgeführt: die Aktivierung α -1A-adrenerger Rezeptoren durch Noradrenalin sorgt in isolierten adulten Ratten-Kardiomyozyten für eine gesteigerte Proteinsynthese (Pönicke et al., 2001); *in vivo* führen Noradrenalin-Infusionen bei Nagern über α -adrenerge Rezeptoren zur Herzhypertrophie (Zierhut und Zimmer, 1989); Phenylephrin-haltiges Kulturmedium (10 μ M) kann bei isolierten adulten Ratten-Kardiomyozyten die Ausbildung von Pseudopodien provozieren und das Überleben verlängern; Phenylephrin als α -1-adrenerger Rezeptoragonist wurde dabei am dritten Tag in Kultur dem FCS-freien Kulturmedium beigelegt (Volz et al., 1991).

Auch wird über die Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren Zelltod verhindert, werden positiv inotrope und weitere positive Effekte vermittelt (Jensen et al., 2014). Im Gegensatz zu β -adrenergen Rezeptoren (Bristow et al., 1982) bleiben α -adrenerge Rezeptoren bei dauerhaft erhöhten Katecholaminspiegeln in ihrer Anzahl konstant, desensibilisieren nicht und büßen damit ihre Funktionalität nicht ein (Böhm et al., 1988). Im Rahmen der Herzinsuffizienz wird ihnen damit eine protektive Funktion zugeschrieben (Jensen et al., 2009 b; Jensen et al., 2014). Nicht zuletzt der Ausgang der ALLHAT-Studie deutet darauf hin. Die Verabreichung des unselektiven α -1-adrenergen Rezeptorblockers Doxazosin an hypertensive Patienten wurde vorzeitig gestoppt, nachdem die Inzidenz der Herzinsuffizienz in dieser Versuchsgruppe doppelt so hoch ausfiel wie in den anderen Versuchsgruppen (Davis, 2000).

Zur Untersuchung der α -adrenergen Rezeptorwirkung kann Phenylephrin als α -1-adrenerger Rezeptoragonist eingesetzt werden. Von den Katecholaminen weist Noradrenalin die höhere Affinität zu den α -adrenergen Rezeptoren auf (Schlüter, 2016 a).

1.4.2 Angiotensin II

Angiotensin II entsteht aus Angiotensin I, katalysiert durch das *angiotensin converting enzyme* (ACE). Angiotensin I entsteht wiederum aus Angiotensinogen, vermittelt durch Renin. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und damit die Ausschüttung von Renin erfolgt entweder konstitutiv durch die Niere (als Pro-Renin) oder stimuliert durch den Sympathikus als Renin (Mehta und Griendling, 2007). Angiotensin II kann über verschiedene Rezeptoren (AT₁ und AT₂) wirken, wobei der AT₂-Rezeptor im adulten Herzen von untergeordneter Bedeutung ist, nachdem er sich vornehmlich in fetalem Gewebe findet (Unger et al., 1996).

Angiotensin II kann die Proteinsynthese in isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten steigern. Die Signalweiterleitung erfolgt dabei über die *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) und p70^{s6k} (Ritchie et al., 1999). Im Vergleich zur Steigerung der Proteinsynthese vermittelt durch α -adrenerger Rezeptorstimulation fällt der pro-hypertrophe Effekt jedoch gering aus (Ruf et al., 2002). Knockout-Mäuse ohne AT₁-Rezeptoren reagieren im selben Maße mit Herzmuskelhypertrophie auf Druckbelastung wie die entsprechende Kontrollgruppe (Hamawaki et al., 1998). Der direkten prohypertrophen Wirkung von Angiotensin II über AT₁-Rezeptoren im Rahmen der Herzinsuffizienz wird daher nur eine geringe Bedeutung beigemessen (Reudelhuber et al., 2007).

Dennoch kann Angiotensin II über die Inhibition der Signalweiterleitung bzw. die Verstärkung der Effekte anderer Mediatoren Einfluss auf kardiales Wachstum, Zellfunktion und Zelltod nehmen. Insofern ist Angiotensin II dennoch von hoher Relevanz für das kardiale Remodelling (Schlüter und Wenzel, 2008).

Unter der Annahme, dass die in Kultur beobachtbaren Anpassungsvorgänge als Modell für das kardiomyozytäre Remodelling dienen können, stellt sich die Frage, ob sich auch unter Phenylephrin- bzw. Angiotensin II-haltigen Kulturbedingungen eine Adaptation der Kardiomyozyten wie unter FCS-haltigen Kulturbedingungen beobachten lässt.

1.4.3 p38-MAPK

Die p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) stellen neben den *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2 bzw. ERK5) und den c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) eine Unterfamilie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen dar (Marber et al., 2011).

Dabei werden p38-MAPK und JNK auch als stress-aktivierte Kinasen bezeichnet, da sie durch physikalische, chemische und physiologische Stressfaktoren aktiviert werden können (Kyriakis und Avruch, 2001). Es existieren vier Isoformen der p38-MAPK, nämlich α , β , γ und δ , wobei allen voran die p38- α -MAPK ubiquitär exprimiert wird. Die Aktivierung der p38-MAPK erfolgt vornehmlich über die Phosphorylierung ihres konservierten Threonin-Glycin-Tyrosin-Motivs als letzten Schritt einer mehrstufigen Phosphorylierungskaskade. Aktivatoren wie auch Substrate der p38-MAPK sind zahlreich. Apoptose, Zellüberleben, Zellwachstum, Zellmigration und die Regulation des Zellzyklus gehören zu den biologischen Prozessen, in denen die p38-MAPK eine Rolle spielt (Yokota und Wang, 2016). In der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten kommt der p38-MAPK entscheidende Bedeutung zu (Aouadi et al., 2006; Hernández-Torres et al., 2007; Wu et al., 2010).

Die Herzen von Menschen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz weisen eine verstärkte Aktivität der p38-MAPK auf (Haq et al., 2001). Wie relevant die p38-MAPK dabei im Hinblick auf die Entwicklung kardiomyozytärer Hypertrophie ist, wird seit Jahren kontrovers diskutiert (Rose et al., 2010). Während man sich über die pro-hypertrophe Wirkung der p38-MAPK *in vitro* weitgehend einig ist, sind die Ergebnisse der Versuche *in vivo* widersprüchlich. Dies könnte an der mangelnden Übertragbarkeit der Versuche, die an isolierten neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt wurden, liegen (Liang und Molkenkin, 2003). Möglicherweise ist die Diskrepanz aber auch durch die unterschiedliche Wirkungsweise der einzelnen p38-MAPK-Isoformen zu erklären (Yokota und Wang, 2015). p38 α -Knockout-Mäuse sind genauso wie die Wildtyp-Mäuse ihrer Kontrollgruppe zur Ausbildung einer Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie in der Lage. Während die Herzfunktion der Wildtyp-Mäuse dabei aber zunächst unbeeinträchtigt bleibt, kommt es bei den p38 α -Knockout-Mäusen zusätzlich zu einer Reduktion der Herzfunktion und einer erhöhten Absterberate (Nishida et al., 2004).

Innerhalb der ersten 48 Stunden unter FCS-haltigen Kulturbedingungen steigt die Proteinexpression der p38-MAPK signifikant an (Wenzel et al., 2005). Insofern ist es von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der p38-MAPK und dem innerhalb dieses Zeitraums beobachtbaren kardiomyozytären Abrunden besteht. Dies soll mit Hilfe des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 untersucht werden. SB-202190 entfaltet seine Wirkung unter anderem dadurch, dass es die Translokation der p38-MAPK in den Kern und die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren verhindert (Ren et al., 2007).

1.5 Kardiomyozytäre Entwicklung

Untersuchungen an neugeborenen Ratten haben gezeigt, dass Kardiomyozyten wenige Tage nach der Geburt ihre Proliferationsfähigkeit einbüßen. Im Anschluss daran sind Kardiomyozyten für eine gewisse Zeit zur Karyokinese ohne anschließende Zytokinese fähig – mehrkernige Kardiomyozyten entstehen demnach aus einkernigen Kardiomyozyten. Das weitere myokardiale Wachstum erfolgt durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten (Clubb und Bishop, 1984).

Solange die Kardiomyozyten noch proliferieren ändert sich ihr Volumen hingegen nicht. Die Vergrößerung des kardiomyozytären Volumens beginnt zeitgleich mit dem Erscheinen von binukleären Kardiomyozyten (Li et al., 1996). Zweikernige Kardiomyozyten sind i.d.R. doppelt so groß wie einkernige Kardiomyozyten, was einem konstanten Volumen/Kern-Verhältnis entspricht (Bishop und Drummond, 1979).

Während bei Nagern die zweikernigen Kardiomyozyten prozentual dominieren (Brodsky et al., 1985; Katzberg et al., 1977), liegt beim Menschen der Anteil ventrikulärer Kardiomyozyten mit einem Kern im adulten Herzen bei $74,0 \pm 8,0$ % und der der zweikernigen Kardiomyozyten bei $25,5 \pm 8,0$ %. Nur zirka 0,5 % der Kardiomyozyten besitzen drei bzw. vier Kerne (Olivetti et al., 1996). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied besteht nicht. Polyploidisierung lässt den DNA-Gehalt der Zellkerne mit zunehmendem Alter ansteigen (Bergmann et al., 2015).

Ob überhaupt, in welcher Art und Weise und in welchem Ausmaß sich Kardiomyozyten auch noch im adulten Herzen neu bilden können, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Leri et al., 2015; Heallen et al., 2019). Mengenbestimmungen der in der myozytären DNA enthaltenen ^{14}C -Isotope lassen Rückschlüsse auf die Neubildungsraten von Kardiomyozyten zu. Diesbezügliche Untersuchungen am menschlichen Herzen ergaben, dass eine jährliche Neubildungsrate von etwa 1 % im Alter von 20 Jahren anzunehmen ist, die mit zunehmendem Alter abnimmt (Bergmann et al., 2009).

Vor dem Hintergrund, dass mehrkernige Kardiomyozyten aus einkernigen Kardiomyozyten hervorgehen, stellt sich die Frage, ob sich das Adaptationsvermögen der Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Anzahl ihrer Kerne unterscheidet. Die zu prüfende Hypothese lautet: mehrkernige Kardiomyozyten sind ob ihrer Entstehung weiter differenziert und damit weniger anpassungsfähig als einkernige Kardiomyozyten.

1.6 Zusammenfassung und Fragestellung

Kardiomyozyten verlieren im Verlauf ihrer Maturation die Fähigkeit, sich zu teilen, wodurch ihre Regenerationsfähigkeit limitiert ist. Dafür sind sie in der Lage, sich an sich verändernde äußere Bedingungen anzupassen. Steigenden hämodynamischen Anforderungen begegnen sie mit Hypertrophie. Unter Bedingungen anhaltender Überbelastung geht die Hypertrophie mit weitreichenden Veränderungen der zellulären Funktionsweise einher. Bei anhaltend pathologisch veränderter hämodynamischer Belastung kann das in Dysfunktion und organellem Versagen münden. Die hohe Mortalitätsrate herzinsuffizienter Patienten zeugt davon.

Das kardiomyozytäre Remodelling kann als ein komplexer Prozess von De- und Redifferenzierung verstanden werden. Isolierte adulte ventrikuläre Kardiomyozyten scheinen unter FCS-haltigen Kulturbedingungen dazu geeignet, diese Anpassungsvorgänge als Untersuchungsmodell abzubilden. Innerhalb der ersten 48 Stunden in Kultur lässt sich dabei ein Abrunden der Kardiomyozyten, einhergehend mit der Degradation ihres kontraktile Apparats, beobachten.

Vor diesem Hintergrund sollen die folgenden Aspekte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- Handelt es sich beim Abrunden der isolierten Kardiomyozyten um einen FCS-getriggerten Prozess oder ist es der fehlenden elektrischen Erregung und mechanischen Entlastung geschuldet?
- Die katecholaminerge Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren als auch Angiotensin II sind von Relevanz für das kardiomyozytäre Remodelling. Lassen sich auch unter Phenylephrin- (α -1-adrenerger Rezeptoragonist) und Angiotensin II-haltigen Kulturbedingungen abgerundete Kardiomyozyten beobachten?
- Die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-System kann durch die Inkorporation induzierbarer Untereinheiten, wie LMP2, gesteigert werden. Wird das Abrunden der Kardiomyozyten von einer Veränderung der proteasomalen Zusammensetzung begleitet?

- Die Proteinexpression der p38-MAP-Kinase steigt innerhalb der ersten drei Tage unter FCS-haltigen Kulturbedingungen signifikant an. Wie wirkt sich die Inhibition der p38-MAPK auf das Abrunden der Kardiomyozyten aus?
- Unterscheiden sich ein- und mehrkernige Kardiomyozyten in ihrem Anpassungsvermögen und wie verändert es sich mit zunehmendem Alter?

Ziel der Untersuchung ist es, zu einem tieferen Verständnis (patho-)physiologischer Zusammenhänge beizutragen. Die Hoffnung auf neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung herzinsuffizienter Patienten gründet nicht zuletzt darauf.

Die Experimente werden an Kulturen isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten von Herzen adulter Ratten durchgeführt und Schlüsselbefunde an spontan hypertensiven Ratten *in vivo* überprüft. Neben quantitativen und morphologischen Untersuchungen unter dem Fluoreszenz- und Konfokalmikroskop werden Veränderungen der Gen- bzw. Proteinexpression mittels quantitativer Real-time PCR, SDS-Page, Western Blot und Immunomarkierung bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

5X First-Strand Puffer	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Aqua bidest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Benzonase Nuclease	Merck KGaA, Darmstadt
bisBenzimide H33342 trihydrochloride, HOECHST	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Carbogen, 95 % O ₂ , 5 % CO ₂	Linde AG, München
Carnitin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Chloroform, CHCl ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Cytosin-β-D-arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
DAKO Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Dithiothreitol, DTT	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTP	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Ethanol, C ₂ H ₆ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Fetal Calf Serum, FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hs_PSMB9_4 FlexiTube siRNA	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
iQ SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Isofluran	Baxter International, Inc., Deerfield, Illinois, Vereinigte Staaten
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Isoprenalin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kaliumchlorid, KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Kalziumchlorid, CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, Vereinigte Staaten
Kreatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Medium 199, 500ml	Biochrom GmbH, Berlin
Magnesiumphosphat, MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol, CH ₄ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MG-132	Calbiochem, Darmstadt
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Natriumchlorid, NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
NuPAGE Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Oligo-dT-Nukleotide	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phosphate-buffered Saline, PBS	Bioline, London, Vereinigtes Königreich
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
peqGOLD TriFast	VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Phalloidin-Tetramethylrhodamin Konjugat	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, Vereinigte Staaten
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
RNase-ExitusPlus	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, Vereinigte Staaten
SB-202190	Calbiochem, Darmstadt

Sodium Dodecyl Sulfate, SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Luminol/Enhancer Solution, Stable Peroxide Solution)	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tris-buffered Saline, TBS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.2 Primer

B2M, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Annealing-Temperatur: 63,5 °C

Forward: (5' zu 3') GCC GTC GTG CTT GCC ATT C

Reverse: (5' zu 3') CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C

PSMB9, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Annealing-Temperatur: 60 °C

Forward: (5' zu 3'): CTT TGC AAT CGG TGG TTC CG

Reverse: (5' zu 3'): CGG TTC ATG GCC AGA GTG AT

2.1.3 Antikörper

GAPDH-Antikörper: rabbit, 6,2 mg/ml, 1:4000 in 1x TBS + 5 % BSA + 0,1 % Tween, 37 kDa, Calbiochem, Darmstadt

Goat-Anti-Mouse-HRP: goat, polyklonaler IgG, 1 mg/ml, 1:2000 in 1x TBS + 5 % BSA + 0,1 % Tween, Affinity Biologicals, Inc., Ancaster, Kanada

LMP2-Antikörper: mouse, 200µg/ml PBS, 1:200 in 1x TBS + 5 % BSA + 0,1 % Tween, 21 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, Vereinigte Staaten

Sheep-anti-Rabbit-HRP: sheep, polyklonaler IgG, 1 mg/ml, 1:2000 in 1x TBS + 5 % BSA + 0,1 % Tween, Affinity Biologicals Inc., Ancaster, Kanada

2.1.4 Laborgeräte

Allgemein:

Fluoreszenzmikroskop Biozero	Keyence Corporation, Osaka, Japan
Konfokalmikroskop LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kühlgeräte (4 °C, -20 °C)	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Kühlgerät (-80 °C)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Inkubator BBD6220, befeuchtet	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Abzug Airflow Control	Köttermann GmbH + Co. KG, Uetze-Hänigsen
Dampfsterilisator Typ DSL	Holzner GmbH, Nußloch
Eismaschine Icematic	CastelMac SpA, Castelfranco Veneto, Italien
Isolierboxen	neoLab, Heidelberg
Zentrifugen verschiedener Größe, teils temperierbar	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Vortexer in verschiedenen Ausführungen	IKA Werke GmbH + Co. KG, Staufen im Breisgau
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Schüttler Vortex Genius 3	IKA Werke GmbH + Co. KG, Staufen im Breisgau
Präzisionswaage Acculab	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten (0,5 µl–5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH, Zizers, Schweiz

Spritzen mit Kanülen B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Kardiomyozyten-Isolation:

Langendorff-Apparatur Eigenbau des Physiologischen Instituts Gießen

Heizung Langendorff-Apparatur Lauda, Lauda-Königshofen

Pumpe Langendorff-Apparatur Ismatec, Wertheim

Begasungsanlage Langendorff-Apparatur Eigenbau des Physiologischen Instituts Gießen

Wärmebecken Langendorff-Apparatur C6 Lauda Lauda, Lauda-Königshofen

Gewebe-Chopper Mc Ilwain Tissue Chopper The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Guilford, Vereinigtes Königreich

Büchner-Trichter mit 200 µm Netz VWR Laborartikel, neoLab, Heidelberg

Scheren Aesculap, Tuttlingen

Pinzetten Eikemeyer GmbH, Ranstadt

Skalpelle Feather, Osaka, Japan

Absaugsystem Vacusafe comfort Integra Biosciences GmbH, Zizers, Schweiz

RNA-Isolierung, Bestimmung des RNA-Gehalts, cDNA-Synthese, Quantitative Real-time PCR:

Pellet Pestle Motor Gerresheimer AG, Düsseldorf

UV-Bestrahlungsgerät UV Stratalinker 2400 Stratagene GmbH, Heidelberg

NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 Peqlab, VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten

Thermal Cycler Techne, Bibby Scientific Limited, Stone, Vereinigtes Königreich

MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System inkl. iCycler Thermal Cycler BioRad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

PCR-Reaktionsgefäß mit Deckel PP natur 0,2 ml Nerbe Plus GmbH, Winsen (Luhe)

SDS-PAGE, Western-Blot, Immunomarkierung:

Heizblock Dri-Block, DB-20	Techne, Bibby Scientific Limited, Stone, Vereinigtes Königreich
Gelkammer Novel Mini Cell, XCell SureLock, Electrophoresis Cell mit XCell II Blot Module	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
NuPAGE Novex 10 % Bis-Tris-Protein Gel, 15 Wells	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Netzgerät PS 608 Electrophoresis Power Supply	BLD Apelex, Massy, Frankreich
Protran Transfermembranen Nitrocellulose, Porengröße: 0,45µm	Whatman GmbH, Dassel
Filterpapiere	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
Schwämme	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Spritze zum Befüllen der Taschen	Hamilton Germany GmbH, Höchst
Dunkelkammer mit Kamera	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell

Verbrauchsmaterialien:

Zellkulturschalen (35 mm x 10 mm, 60 mm x 15 mm)	BD GmbH, Heidelberg
Silikonringe flexiPERM disc, Fassungsvermögen 1 ml, wiederverwertbar	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Konische Röhrenchen (50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Konische Röhrenchen (15 ml)	BD GmbH, Heidelberg
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml-2 ml)	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (0,5 µl-5000 µl)	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 ml)	BD GmbH, Heidelberg
Pipettenspitzen für den Pipetboy comfort (10 ml)	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Aufsätze für den Pellet Pestle Motor	Kimble/Kontes, Vineland, New Jersey, Vereinigte Staaten

Zellschaber	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Batavia, Illinois, Vereinigte Staaten
Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Deckgläser, rund	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Handschuhe, Nitra Tex, Micro Touch	Ansell, Melbourne, Australien
Rasierklingen	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
<i>Software:</i>	
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
SPSS Statistics	IBM, Armonk, New York, Vereinigte Staaten
BZ observation and image analysis application	Keyence Corporation, Osaka, Japan
LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
ND-1000	Peqlab, VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
iCycler iQ optical system software	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Chemicapt-5000	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Quantity 1	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
<i>Versuchstiere:</i>	
Typ Wistar	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
Spontan hypertensive Ratten	Eigenzucht aus dem Tierstall des Physiologischen Instituts Gießen

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Kultivierung adulter Kardiomyozyten

Die beschriebene Vorgehensweise (Nippert et al., 2017) orientiert sich an der von Piper (1985) vorgestellten Methode zur Isolation adulter Kardiomyozyten.

Als Versuchstiere dienen, sofern keine gesonderten Angaben gemacht werden, männliche Ratten Typ Wistar im Alter von 8-12 Wochen und einem Gewicht von 200-400 g.

Mit einem Vorlauf von mehreren Stunden/über Nacht werden die Kulturschalen mit Vorplattiermedium befüllt, um die Anheftung der Kardiomyozyten im Anschluss an den Isolationsvorgang an den Boden der Kulturschalen zu ermöglichen. Die auf 37 °C erwärmte Langendorff-Perfusionsanlage wird vorbereitend mit 80 ml Powell-Medium luftblasenfrei befüllt und das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Die Versuchstiere werden nach Betäubung mit Isofluran durch Genickbruch getötet. Das Herz-Lungen-Paket wird entnommen und zur Minimierung des Energiebedarfs in kardiopleger Lösung (0,9 % NaCl-Lösung, 4 °C) weiterverarbeitet: Lungenflügel und Thymusgewebe werden entfernt, der Aortenbogen freipräpariert sowie auf die erforderliche Länge von wenigen Millimetern gekürzt. Die Perfusion wird in Gang gesetzt und auf eine Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt, das entnommene Herz an der Aorta in der Langendorff-Anlage aufgehängt und befestigt. Blutreste werden mit Hilfe des Powell-Mediums aus dem Herzen gespült. Um eine ausreichende Perfusion des Myokards über die Koronararterien zu garantieren, wird dabei darauf geachtet, mit der entsprechenden Kanüle, die Mitralklappe nicht zu durchstoßen.

Bei einer verbleibenden Menge von 45 ml Powell-Medium im System wird der Perfusionskreislauf geschlossen und das Powell-Medium mit 25 mg Kollagenase und 12,5 µl CaCl₂ (100 mM), das in 5 ml Powell-Medium gelöst wurde, versetzt. Dient die Kollagenase hierbei der sukzessiven Auflösung des Bindegewebes, so stellt die geringe Menge an CaCl₂ einen Kompromiss dahingehend dar, dass die Auflösung der Verbindung zwischen den Kardiomyozyten über die Glanzstreifen einen Kalziumentzug zwar erfordert, man andererseits kalziumtolerante Kardiomyozyten nur isolieren kann, wenn eine gewisse Menge an Kalzium im Verlauf des Isolationsprozesses weiterhin zur Verfügung steht. Die retrograde Perfusion erfolgt nun über zirka 25 min, bis das Herzgewebe ausreichend erweicht erscheint. Abhängig von der verwendeter Charge an Kollagenase können

die benötigte Menge wie auch die Perfusionsdauer variieren. Werden Kardiomyozyten weiblicher oder älterer Tiere isoliert, so muss die Perfusionsdauer u.U. verlängert werden.

Unter Zuhilfenahme einer Schere wird das Herzgewebe unterhalb der Ventilebene abgetrennt und die Ventrikel mit jeweils einem Schnitt in Richtung Herzspitze so eröffnet, dass sich das Myokard auffächern und flach ausbreiten lässt. Der Gewebe-Chopper übernimmt die mechanische Zerkleinerung des Gewebes, die gewählte Einstellung beträgt dabei einen Schnitt pro 0,7 Millimeter. Ein zweiter Schneidedurchlauf im rechten Winkel zum ersten erfolgt. Die entstandenen Gewebestückchen werden mit Hilfe von zwei Skalpellenspitzen weiter vereinzelt.

Im sog. Nachverdau wird das zerkleinerte Gewebe dann fünf Minuten mit 12 ml erwärmtem und begaster Perfusionslösung inkubiert, Gewebe und Perfusionslösung dabei minutlich mit Hilfe einer Pipette vermischt. Unverdaute Myokardbestandteile werden bei der anschließenden Filtration durch ein Netz mit einem Porendurchmesser von 0,2 mm im Büchner Trichter zurückgehalten. Die Trennung von Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten geschieht durch Zentrifugation (400 Umdrehungen pro Minute für 3 min) und Abpipettieren des Überstands, da sich die Kardiomyozyten als Pellet zuunterst absetzen. Zuletzt erfolgt in mehreren Schritten die Rückführung der Kalzium-Konzentration hin zu physiologischen Werten: Zugabe von 6 ml erwärmtem und begastem Powell-Medium, versetzt mit 12,5 μl CaCl_2 (100 mM), Aufschütteln des Zellpellets zur Durchmischung. Erneute Zentrifugation (400 UpM für 2 min) und Abpipettieren des Überstands. Zugabe von 6 ml erwärmtem und begastem Powell-Medium, versetzt mit 25 μl CaCl_2 (100 mM), Aufschütteln des Zellpellets zur Durchmischung. Zugabe von 12 ml erwärmtem und begastem Powell-Medium, versetzt mit 120 μl CaCl_2 (100 mM), Aufschütteln des Zellpellets zur Durchmischung. Zentrifugation (300 UpM für 1 min) und Abpipettieren des Überstands.

Unter der Sterilbank werden die isolierten Kardiomyozyten mit dem Ausplattiermedium in Suspension gebracht und nach Verwerfen des Vorplattiermediums in die vorbereiteten Kulturschalen pipettiert. Eine Kulturschale der Größe 35 mm x 10 mm fasst dabei 1 ml Kulturmedium. Nach einer Stunde wird das Ausplattiermedium abgesaugt und durch das Waschmedium ersetzt, nicht anhaftende Kardiomyozyten werden dabei entfernt. Auf diese Weise können pro Isolationsvorgang bis zu 24 Kulturschalen mit Kardiomyozyten gewonnen werden. Die isolierten Kardiomyozyten werden bei 37 °C und 95 % relativer

Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Waschmedium bedarf über den gesamten Zeitraum der Kultivierung keines Austauschs.

Powell-Medium zum Befüllen der Langendorff-Perfusionsanlage:

(Angaben für 1 l Medium)

1 l Aqua bidest.

6,43 g NaCl (110 mM)

0,19 g KCl (2,5 mM)

0,16 g KH₂PO₄ (1,2 mM)

0,30 g MgSO₄ (1,2 mM)

5,96 g Hepes (25,0 mM)

1,98 g D-(+)-Glucose-Monohydrat (10,0 mM)

pH mit NaOH (2 M) auf 7,4 einstellen, Sterilfiltration

CCT-Medium als Grundlage der Zellkulturmedien:

(Angaben für 10 l Medium)

10 l Aqua bidest.

2 Pack M199

36,00 g Hepes (151,0 mM)

6,56 g Kreatin (5,0 mM)

3,95 g Carnitin (2,0 mM)

6,26 g Taurin (5,0 mM)

10 mg Cytosin-β-D-arabinofuranosid (10,0 μM)

pH mit NaOH (2 M) auf 7,4 einstellen, Sterilfiltration

Vorplattiermedium: CCT-Medium, 2 % Penicillin-Streptomycin-Lsg., 4 % FCS

Ausplattiermedium: CCT-Medium, 2 % Penicillin-Streptomycin-Lsg.

Waschmedium: CCT-Medium, 2 % Penicillin-Streptomycin-Lsg. + ggf. gewünschte Zusätze

2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie: Apoptose-/Nekrose-Färbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Die Apoptose-/Nekrose-Färbung erfolgt durch Zugabe von jeweils 5 µl HOECHST (1,2 mg/ml) und Propidiumiodid (20 µg/ml) pro Kulturschale direkt in das Waschmedium. Durch langsames, ausgiebiges Schwenken wird der Farbstoff im Medium verteilt, die sich anschließende Inkubationszeit beträgt 10 min.

Die Aufnahmen der angefärbten Kardiomyozyten werden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Biozero und der unterstützenden Software BZ observation application angefertigt. Pro Kulturschale werden bei zehnfacher Vergrößerung jeweils 10 Sehfelder in dreifacher Ausführung fotografiert, nämlich im „Hellfeld“-Modus sowie mit den entsprechenden beiden Filtern für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Bearbeitung der Bilder geschieht unter Zuhilfenahme des Programms BZ image analysis application, wobei die drei deckungsgleichen Aufnahmen eines Sehfelds zu einem Gesamtbild übereinandergelegt und Helligkeit sowie Kontrast optimiert werden.

HOECHST bindet an Chromatin und dient der Identifikation apoptotischer Kardiomyozyten. Die Kondensation des Chromatins lässt ihre Kerne hell aufleuchten. Propidiumiodid färbt das Zytoplasma nekrotische Kardiomyozyten rot. Es kann die Zellmembran nur überwinden, wenn diese bereits Schaden genommen hat (Kabakov und Gabai, 2018).

2.2.3 Konfokalmikroskopie: Darstellung der F-Aktin-Filamente mittels Phalloidin-Tetramethylrhodamin-Färbung

Um die Kardiomyozyten unter dem Mikroskop betrachten zu können, müssen sie auf Objektträger aufgebracht werden, weshalb das Protokoll zur Isolation der Kardiomyozyten geringfügig modifiziert wird. Vorbereitend wird jeweils ein Deckglas auf den Boden der Kulturschalen gelegt und mit 10 µl Laminin überschichtet. Daraufhin wird das Vorplattiermedium hinzugefügt, das in diesem Fall frei von FCS bleibt. Nach dem Absaugen des Vorplattiermediums werden nun Silikonringe auf den Deckgläsern platziert, die mit je 1 ml des die Kardiomyozyten enthaltenden Ausplattiermediums befüllt werden. Vor der Zugabe des Waschmediums können die Silikonringe entfernt werden, da die Kardiomyozyten bereits auf dem Deckglas anhaften.

Zum Färben mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin werden die Kardiomyozyten zunächst fixiert. Dazu wird das Waschmedium entfernt, jede Kulturschale mit 2 ml auf 37 °C erwärmter Paraformaldehyd-Lösung befüllt und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten Schritt werden die Kardiomyozyten zwei Mal für 5 min mit PBS gewaschen, dann mit 1 ml PBS + 0,1 % Triton pro Schale überzogen. Die Inkubation mit dem Detergens erfolgt für 10 min bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschgängen mit PBS wird nun pro Schale 0,1 ml Phalloidin-Tetramethylrhodamin in einer Verdünnung von 1:100 über die Kardiomyozyten gegeben und die Kulturen für eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Dabei bindet das Phalloidin-Tetramethylrhodamin an das filamentäre Aktin. Es folgen noch einmal drei fünfminütige Waschgänge mit PBS.

Die Deckgläser mit den gefärbten Kardiomyozyten können nun mit Hilfe des DAKO Mounting Mediums (jeweils 0,015 ml) auf die Objektträger aufgebracht werden.

Die Erstellung der Bilder erfolgt mit Hilfe des konfokalen LSM 510 Laser Scanning Microscops sowie der dazugehörigen Software bei 635-facher Vergrößerung. Das Phalloidin-Tetramethylrhodamin wird bei einer Wellenlänge von 546 nm angeregt und emittiert Licht von einer Wellenlänge von 575 nm.

Sheppard und Choudhury prägen im Jahr 1977 in ihrer Abhandlung der theoretischen optischen Grundlagen den Begriff der konfokalen Mikroskopie (Sheppard und Choudhury, 1977). Sie ermöglicht eine besonders scharfe und kontrastreiche Darstellung auch von dickeren Objekten. Das kann gelingen, weil das punktförmige Licht des Lasers mit Hilfe eines Objektivs in einer Ebene des Objekts fokussiert wird. Das reflektierte Licht wird dann durch das Objektiv und eine Linse im Tubus geleitet, deren Brennpunkt in der Ebene einer Lochblende liegt. Der Durchmesser des sog. Pinhole entscheidet hierbei über den Grad der Konfokalität. Als konfokal wird ein Strahlengang bezeichnet, bei dem Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt aufeinanderliegen (Müller et al.). Dies sorgt dafür, dass kein Streulicht von außerhalb der fokussierten Objektebene den dahinterliegenden Detektor erreicht. Ein als Strahlteiler zwischengeschalteter dichroitischer Spiegel dient dazu, das einfallende vom emittierten Licht zu trennen. Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photomultiplier, der das eingefangene Licht in ein elektrisches Signal umwandelt. Das Objekt wird in der gewünschten Ebene Punkt für Punkt gescannt, die dazugehörige Software errechnet das Gesamtbild. (ZEISS, 2002).

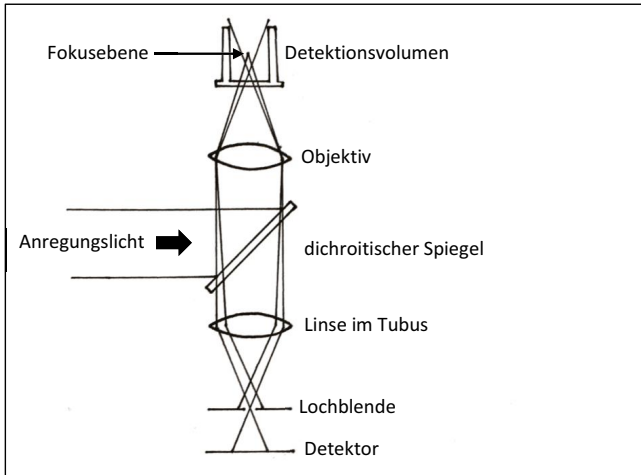


Abb. Kap. 2. (1): Strahlengang Konfokalmikroskop (eigene Darstellung in Anlehnung an ZEISS, 2002)

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR: Bestimmung der relativen Genexpression

Die Vorbereitung der isolierten Kardiomyozyten umfasst neben der RNA-Isolation und dem Bestimmen des RNA-Gehalts der gewonnenen Proben die Herstellung der dazugehörigen cDNA.

Zunächst werden die Kardiomyozyten, wie unter 2.1. beschrieben, isoliert und abweichend vom Protokoll in größeren, 2 ml Waschmedium fassenden Kulturschalen (65 mm x 15 mm) kultiviert. Beim Erntevorgang werden dann die Kardiomyozyten aus jeweils vier Kulturschalen zusammengeführt, um später eine ausreichende RNA-Menge für den Extraktionsvorgang zur Verfügung zu haben.

Das Waschmedium wird dabei verworfen und in der ersten von vier Kulturschalen durch 600 µl PBS ersetzt. Die Kardiomyozyten werden mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst und die 600 µl Zellsuspension in die zweite Schale überführt. Mit dieser Schale wird in gleicher Weise verfahren wie mit der ersten Kulturschale. So werden die Kardiomyozyten aus vier Kulturschalen miteinander vereinigt, die gewonnene Zellsuspension zuletzt in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Der Vorgang wird ein zweites Mal

wiederholt, um möglichst wenige Kardiomyozyten auf dem Schalenboden zurückzulassen. Die 1,2 ml Zellsuspension werden abschließend zentrifugiert (3500 UpM für 5 min) und der Überstand abgeschüttet. Anschließend kann das Zellpellet bei -80 °C aufbewahrt werden.

Das Protokoll zur RNA-Isolation orientiert sich an der Ein-Schritt-Methode zur RNA-Extraktion mittels eines Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemischs (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Die Gewebeproben werden während der Prozedur auf Eis gelagert, zum Schutz des Ausführenden wird unter dem Abzug gearbeitet. Die Behandlung aller relevanten Oberflächen mit RNase-ExitusPlus soll eine RNase-freie Umgebung garantieren.

Mit dem Ziel der Zelllyse und Protein-Degradation werden zunächst 500 µl peqGOLD TriFast in jedes Mikroreaktionsgefäß zu dem Kardiomyozyten-Pellet hinzugefügt, das Pellet mit dem Pellet Pestle Motor gelöst und mit Hilfe des Schüttlers eine homogene Suspension erzeugt. Die Zugabe von 200 µl Chloroform pro Mikroreaktionsgerät sorgt für die Auftrennung der Suspension in drei Phasen, wobei sich die zu extrahierende RNA in der oberen, wässrigen Phase befindet. Hierzu wird die mit Chloroform versetzte Suspension zunächst gevortext, bis sie ein milchiges Aussehen angenommen hat und nach fünfminütiger Wartezeit zentrifugiert (12500 UpM für 15 min bei 4 °C). Die wässrige Phase wird nun in die mit dem UV-Stratalinker vorbehandelten Mikroreaktionsgefäße überführt und die RNA durch Zugabe von Isopropanol in der entsprechenden Menge gefällt. Die Inkubationszeit beträgt dabei mindestens 30 min bei -20 °C. Im Anschluss wird die gefällte RNA durch Zentrifugation (12500 UpM für 15 min bei 4 °C) auf den Boden des Mikroreaktionsgefäßes gebracht. Der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet zum Waschen mit 1 ml Ethanol (70 %) versetzt. Vortexen und Zentrifugieren folgt erneut, wie oben beschrieben. Der Überstand wird abermals verworfen und die Mikroreaktionsgefäße mit der isolierten RNA für eine Stunde getrocknet, anschließend mit jeweils 13 µl Aqua bidest. versetzt. Sie kann nun bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts der einzelnen Proben erfolgt durch photometrische Messung mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers ND-1000 und der dazugehörigen Software. Während der Prozedur werden die Proben auf Eis gelagert und vor der Messung gevortext.

Mit der folgenden Formel wird die Menge an Aqua bidest. berechnet, die zu jeder Probe noch hinzugefügt werden muss, um den RNA-Gehalt aller Proben anzugleichen:

$1000/\text{im Spektrrophotometer gemessener Wert} = x$
 $5 \mu\text{l} - x = \text{Menge des zuzugebenden Aqua bidest.}$

Für die Herstellung der cDNA gilt es zunächst, die Sekundärstruktur der Proben-RNA aufzulösen, weshalb die Proben im Thermal Cycler für 15 min auf 60 °C erhitzt werden. Anschließend kann der vorbereitete Mix zur Herstellung der cDNA im Mengenverhältnis 1:1 zu den Proben pipettiert werden. Die cDNA-Synthese erfolgt während der folgenden Stunde im Thermocycler bei 37 °C. Beendet wird die Reaktion durch die Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 95 °C für 5 min. Es folgt die Abkühlung der Proben auf 5 °C. Im letzten Schritt werden die Proben noch im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und können dann bei -20 °C eingefroren werden.

Die cDNA-Synthese aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP's) geschieht durch die Reverse Transkriptase des Murinen Leukämievirus (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) und unter Verwendung von Oligo-dT-Nukleotiden, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und als Primer für die RNA-abhängige-DNA-Polymerase dienen.

Mix zur Herstellung der cDNA:

(Angaben für 5 ml Mix)

2 ml 5X First-Strand Puffer

1 ml Oligo-dT-Nukleotide

1 ml dNTP's (im Verhältnis 1:6 mit Aqua bidest. gemischt)

0,5 ml DTT

0,2 ml RNasin Ribonuclease Inhibitor

0,3 ml Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

Nachdem alle vorbereitenden Schritte durchgeführt sind, kann die cDNA mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR analysiert werden. Die Proben werden dabei weiterhin auf Eis gelagert und vor der Verwendung gevortext. Das gilt ebenso für die verwendeten

Primer und den iQ SYBR Green Supermix. Der iCycler wird frühzeitig angeschaltet, damit er rechtzeitig seine Betriebstemperatur erreicht, die verwendeten Mikroreaktionsgefäße mit dem Strata-Linker vorbehandelt.

Für die Analyse mit dem iCycler werden in ein PCR-Reaktionsgefäß 3 µl einer Probe und 17 µl des PCR-Mix pipettiert, der den gewünschten Primer sowie den iQ SYBR Green Supermix enthält. Auf diese Weise wird mit allen zu analysierenden Proben verfahren. Daraufhin werden die PCR-Reaktionsgefäße verschlossen und im iCycler deponiert. Nach dem Aufrufen des entsprechenden Programm-Ablaufs mit Hilfe der iCycler iQ optical system software für den jeweiligen Primer wird die Analyse gestartet.

PCR-Mix:

(Angabe orientiert sich an der Anzahl der zu analysierenden PCR-Reaktionsgefäße)

Die für den PCR-Mix verwendeten Primer werden nach Herstellerangaben gelöst und dann im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt, wobei sich der Primer-Anteil dabei im Verhältnis 1:1 aus dem Forward- sowie dem Reverse-Primer zusammensetzt.

iQ SYBR Green Supermix in µl: $10 \cdot \text{Anzahl der zu analysierenden PCR-Reaktionsgefäße}$

Primer in µl: $0,6 \cdot \text{Anzahl der zu analysierenden PCR-Reaktionsgefäße}$

Aqua bidest. µl: $6,4 \cdot \text{Anzahl der zu analysierenden PCR-Reaktionsgefäße}$

Die Proben-DNA wird im iCycler, dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion folgend, exponentiell vervielfältigt. Dazu wiederholen sich die drei Phasen der Polymerase-Kettenreaktion, die Denaturierung bei 95 °C, das Annealing der die zu vervielfältigende DNA-Sequenz flankierenden Primer sowie die Vervollständigung der DNA zum Doppelstrang durch die Taq-Polymerase bei 72 °C, zyklisch. Das im Primer-Mix enthaltene SYBR Green bindet an die DNA-Doppelstränge und beginnt daraufhin zu fluoreszieren. Ist durch die Polymerase-Kettenreaktion eine ausreichende Menge an DNA gebildet worden, überschreitet das Fluoreszenzsignal einen zuvor definierten Schwellenwert. Der PCR-Zyklus, in dem dies geschieht, wird als Cycle Threshold (C_T -Wert) bezeichnet. Je größer die Ausgangsmenge der DNA ist, desto früher wird der Schwellenwert erreicht.

Im Gegensatz zu anderen Methoden, bei denen erst im Anschluss an die Vervielfältigung der DNA die entstandene DNA-Menge quantifiziert wird, geschieht das im Falle der quantitativen Real-Time PCR bereits während der exponentiellen Anreicherungsphase, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse durch Substratlimitation gegen Ende der Reaktion ausgeschlossen wird. Nachdem das SYBR-Green auch an Primer-Primer-Dimere binden kann, dient die anschließende Schmelzkurvenanalyse dazu, die Spezifität der SYBR-Green Bindung an die DNA-Sequenzen von Interesse zu analysieren. Dazu wird die Temperatur im iCycler schrittweise erhöht und die doppelsträngige DNA – u.a. in Abhängigkeit von ihrer Länge – denaturiert, was zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals führt. Grafisch wird in der Schmelzkurvenanalyse die Fluoreszenzveränderung pro Zeiteinheit als Funktion der Temperatur dargestellt. Hat das SYBR-Green spezifisch gebunden, verringert sich das Fluoreszenzsignal auf einmal bei einer bestimmten Temperatur, was sich grafisch als einzelner Peak in der Schmelzkurve zeigt. Hat das SYBR-Green unspezifisch gebunden, kommt es zum Abfall des Fluoreszenzsignals bei verschiedenen Temperaturstufen und damit zu mehreren Peaks in der Schmelzkurve (Kubista et al., 2006).

In einem PCR-Lauf können maximal 47 unterschiedliche Proben gleichzeitig untersucht werden. Jede Probe wird doppelt analysiert und der Mittelwert der Ergebnisse der Doppelbestimmung in der weiteren Berechnung verwendet. Proben, bei denen sich das Ergebnis der Doppelbestimmung/ C_T -Wert um mehr als 0,5 unterscheidet, werden nicht gewertet. Zwei PCR-Reaktionsgefäße mit Aqua bidest. werden pro Lauf des iCyclers mitgeführt, um dokumentieren zu können, dass die Proben während der Vorbereitung nicht verunreinigt wurden. Als Housekeeping-Gen dient β -2-Mikroglobulin.

Die relative Quantifizierung wird unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode vorgenommen (Livak und Schmittgen, 2001). Die Berechnung erfolgt demnach nach folgender Formel:

$$\Delta\Delta C_T =$$

$$(C_{T, \text{ zu untersuchendes Gen}} - C_{T, \text{ Kontrollgen}})_{\text{Zeitpunkt von Interesse}} - (C_{T, \text{ zu untersuchendes Gen}} - C_{T, \text{ Kontrollgen}})_{\text{Kontrollzeitpunkt}}$$

$$\text{Relative Genexpression: } 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

2.2.5 SDS-PAGE, Western Blot und Immunomarkierung: Bestimmung der relativen Proteinexpression

Das Protokoll der Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe orientiert sich an der von Laemmli (1970) vorgestellten Methode. Zur Verwendung kommen dabei NuPAGE Bis-Tris Mini Gels mit 10 % Polyacrylamid in der XCell SureLock Electrophoresis Cell, außerdem die dazugehörigen Produkte NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x und NuPAGE Antioxidant.

Zunächst werden die Kardiomyozyten, wie unter 2.1. beschrieben, isoliert. Zur Ernte der Kardiomyozyten wird das Waschmedium verworfen, dann die anhaftenden Kardiomyozyten mit 100 µl Lysepuffer pro Kulturschale überdeckt. Die Beladung der kardiomyozytären Proteine mit negativ-geladenem Natriumdodecylsulfat ermöglicht die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld, die Auftrennung nach ihrer Größe wird durch die Membranstruktur gewährleistet, die größere Proteine eher als kleine Proteine zurückhält. Nach 15 min auf dem Plattformschüttler werden noch 15 µl Benzonase Nuclease in einer Verdünnung von 1:30 hinzugefügt und die Kulturschalen für weitere 10 min auf dem Plattformschüttler belassen. Mit einem Zellschaber werden noch anhaftende Zellreste vom Schalenboden gelöst, abschließend wird die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

Lysepuffer:

(Angaben für 1 ml)

100 µl DTT (500 mM)

10 µl Protease-Inhibitoren

5 µl Phosphatase-Inhibitoren

885 µl Tris/HCl (50 mM) + 2 % SDS (pH auf 6,7 einstellen)

Maximal zwei Fertiggele werden ordnungsgemäß in die Gelkammer eingesetzt und durch Spannen des Klemmkeils in Position gebracht. Um eine optimale Verwendung zu ermöglichen, werden die Fertiggele zuvor mit Aqua bidest. sowie Laufpuffer gereinigt. Die untere Kammer wird dann mit 600 ml reinem Laufpuffer, die obere Kammer mit 180 ml mit

Antioxidant versetztem Laufpuffer befüllt, die Taschen nochmals gesondert mit Laufpuffer gespült.

Die Färbung der aufgetauten Proben zur Sichtbarmachung der Proteinlauffront geschieht mittels Bromphenolblau. 100 ml Probe werden hierzu mit 20 µl Farbstoff versetzt. Vor der weiteren Verwendung werden die Proben zum Zweck der Denaturierung bei 95 °C zudem für 5 min gekocht. Das Kondenswasser wird mit Hilfe der Zentrifuge in die Probe zurückgeführt, die Proben außerdem gevortext.

Die Taschen werden nun unter Zuhilfenahme einer Spritze mit jeweils 10 µl Probe befüllt, der Marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder kommt dabei in die erste Tasche. Die Gelkammer wird nun verschlossen. Die Proteinauftrennung dauert bei einer angelegten Spannung von 200 Volt zirka 50 min, dabei wandern die negativ-geladenen Proteine in Richtung der Anode.

Laufpuffer:

(Angaben für 1 l Puffer)

950 ml Aqua bidest.

50 ml 20x MOPS SDS Running Buffer

Laufpuffer mit Antioxidant:

(Angaben für 200 ml Puffer)

200 ml Laufpuffer

500 µl NuPAGE Antioxidant

Farbstoff für die Proben: Aqua bidest., 20 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Für den Western Blot kommen der NuPAGE Transfer Puffer sowie das XCell II Blot Module zum Einsatz. Die aufgetrennten Proteine werden dabei vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und im Anschluss mittels indirekter Immunmarkierung quantifiziert (Towbin et al., 1979). Dabei bindet zunächst ein Erstantikörper an das Protein von Interesse. Der an Meerrettichperoxidase gekoppelte Zweitantikörper

bindet im zweiten Schritt an den Erstantikörper. Durch Zugabe des entsprechenden Substrats kommt es zur Chemilumineszenz. Sie kann detektiert und somit eine Quantifizierung der Proteinmenge vorgenommen werden.

Filterpapiere, Schwämme und Transfermembranen werden vor der Verwendung in Transferpuffer eingeweicht, die Fertiggele aus ihrem Plastikrahmen gebrochen. Zum Blotten müssen die Fertiggele zusammen mit den Transfermembranen in die Blotkammer eingebracht werden, beginnend mit der zur Kathode hinweisenden Seite wird dabei die folgende Reihenfolge eingehalten: 2 Schwämme, 1 Filterpapier, 1. Gel, Transfermembran, 1 Filterpapier, 1 Schwamm, 1 Filterpapier, 2. Gel, Transfermembran, 1 Filterpapier, 2 Schwämme. Die einzelnen Elemente müssen luftblasenfrei aufeinander zum Liegen kommen, die Blotkammer kann dann verschlossen und in die Gelkammer eingesetzt werden. Die obere Kammer wird mit Transferpuffer, die untere Kammer zur Kühlung mit Aqua bidest. befüllt. Das Überführen der Proteine auf die Transfermembran dauert bei einer angelegten Spannung von 30 Volt zirka 60 min, das angelegte Spannungsfeld befindet sich in diesem Fall im rechten Winkel zur Gel- bzw. Transfermembranfläche.

Transferpuffer:

(Angaben für 500 ml)

375 ml Aqua bidest.

25 ml 20x NuPAGE Transferpuffer

500 µl NuPAGE Antioxidant

100 ml Methanol (20 %)

Im Anschluss werden die Transfermembranen aus der Kammer geholt und für 1 min in Aqua bidest. gewässert. Das Blocken erfolgt durch Zugabe von 5 ml 1x TBS + 5 % BSA pro Transfermembran und Inkubation auf dem Plattformschüttler für 60 min mit dem Ziel, unerwünschten Bindungen der Antikörper durch Absättigung vorzubeugen. Zuletzt werden die Transfermembranen nochmals in Aqua bidest. geschwenkt und können dann zwischen zwei Filterpapieren im Kühlschrank gelagert werden.

Zur indirekten Immunmarkierung werden getrocknete Membranen mit Aqua bidest. vorbereitend befeuchtet, dann kann der gelöste Erstantikörper (jeweils 5 ml Lsg.) über die

Membran gegeben werden. Die Inkubationsdauer beträgt zwei Stunden. Vor der Zugabe des Zweitantikörpers wird die Membran drei Mal für jeweils 10 min mit 1x TBS + 0,1 % Tween gewaschen und anschließend der gelöste Zweitantikörper über die Membran gegossen. Nach der Inkubationszeit von 60 min schließen sich abermals drei Waschgänge mit 1x TBS + 0,1 % Tween an, wobei beim dritten Mal auf das Tween verzichtet wird. Während sämtlicher Inkubationszeiten wird die Membran auf den Plattformschüttler gestellt, um eine optimale Verteilung der Lösungen über die Membran zu gewährleisten.

Jede Membran wird mit 3 ml SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate überdeckt, welches sich zu gleichen Teilen aus den Einzellösungen Luminol/Enhancer und Stable Peroxid Solution zusammensetzt. Die Inkubation über 2 min erfolgt in Dunkelheit. Die Wellenlänge des emittierten Lichts beträgt 425 nm. Die gewünschten Bilder werden in der Dunkelkammer mit Kamera aufgenommen, nötige Einstellungen wie Blendenöffnung und Bildschärfe erfolgen manuell. Die dazugehörige Software Chemicapt-500 hilft die optimale Belichtungszeit zu ermitteln. Die anschließende Bearbeitung der Bilder wird mit dem Programm Quantity 1 durchgeführt. Auch die Helligkeit der Banden kann hiermit quantifiziert werden.

Als Referenzprotein auf jeder Membran zur Berechnung der relativen Proteinexpression dient GAPDH. Die gemessenen Helligkeitswerte des Zielproteins werden zu den Werten des Referenzproteins ins Verhältnis gesetzt. Die auf diese Weise errechneten Quotienten vom Zeitpunkt von Interesse werden dann durch den entsprechenden Wert vom Kontrollzeitpunkt geteilt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

2.2.6 Statistik

Zunächst werden Ausreißer und Extremwerte durch Boxplot-Analyse ermittelt und von der weiteren Berechnung ausgeschlossen, wobei hierzu alle Werte gerechnet werden, die weiter als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegen. Die Stichproben werden dann auf Normalverteilung getestet, bei gegebener Normalverteilung ein Test auf Varianzgleichheit durchgeführt und Gruppenunterschiede mittels einer einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Bei bestehender Varianzgleichheit wird als Post-Hoc-Test der Student-Newman-Keuls-Test verwendet, falls keine Varianzgleichheit besteht der Dunnett-T3-Test. Die PCR-Ergebnisse werden bei gegebener Normalverteilung mit dem T-

Test für gleiche bzw. ungleiche Varianzen ausgewertet. Ist keine Normalverteilung gegeben, kommt in allen Fällen der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. 0,05 wird als Signifikanzniveau für die Ablehnung der Nullhypothese akzeptiert.

3 Ergebnisse

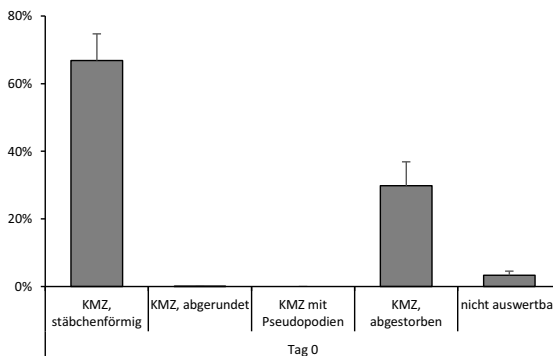
3.1 Kulturen adulter Kardiomyozyten an Tag 0 in Kultur

3.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Die Untersuchung der isolierten Kardiomyozyten an Tag 0 in Kultur geschah innerhalb eines Zeitraums von 2-5 Stunden im Anschluss an die Isolation. Anhand ihrer Morphologie und ihres Färbeverhaltens wurden die Kardiomyozyten unterschieden in intakte und abgestorbene Kardiomyozyten, wobei hierunter apoptotische und nekrotische Kardiomyozyten zusammengefasst wurden. Intakte Kardiomyozyten zeichneten sich durch ihre stäbchenartige Form und die Integrität ihrer Zellmembran aus. Ihr Zytoplasma konnte nicht durch Propidiumiodid angefärbt werden, wie es bei nekrotischen Kardiomyozyten der Fall war. Außerdem erschienen ihre Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop matt, was die Differenzierung von apoptotischen Kardiomyozyten ermöglichte, deren Kerne durch die Kondensation des Chromatins hell aufleuchteten. Die Färbung mit HOECHST gestattete zusätzlich die Bestimmung der Anzahl der vorhandenen Kerne in den einzelnen Kardiomyozyten. Nicht einwandfrei einzuordnende Kardiomyozyten wurden in die Kategorie „nicht auswertbar“ einsortiert. Trotz eventueller Zusätze zu ihren Waschmedien unterschieden sich die Versuchsgruppen zu diesem Zeitpunkt (Tag 0) nicht voneinander. Die dazugehörige Abb. Kap. 5. (I) findet sich unter 5.1 *Abbildungen*.

Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (I):

Abb. Kap. 3. (I):



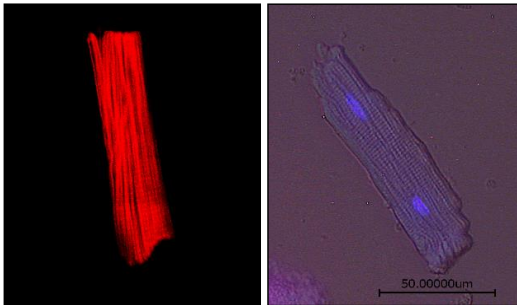
Zu Abb. Kap. 3. (I): Prozentuale Verteilung der Kardiomyozyten ermittelt anhand morphologischer Kriterien nach Färbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen bei einer durchschnittlichen Anzahl von 1143 ± 299 ausgewerteten Kardiomyozyten pro Kultur.

Während $4,4 \pm 1,4$ % der intakten Kardiomyozyten nur einen Kern besaßen, wiesen $95,6 \pm 1,4$ % der Kardiomyozyten zwei oder mehr Kerne auf. Die maximal beobachtete Kernanzahl betrug vier Kerne, Kardiomyozyten mit drei Kernen wurden nicht gesehen.

3.1.2 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin

Der kontraktile Apparat der Kardiomyozyten mit seiner dichten, regelmäßigen Filamentanordnung in den aufgereihten Sarkomeren der Myofibrillen und der daraus resultierenden charakteristischen Querstreifung konnte durch die Anfärbung der Aktin-Filamente mittels Phalloidin-Tetramethylrhodamin dargestellt und mit Hilfe der Konfokalmikroskopie aufgenommen werden.

Abb. Kap. 3. (II): Kardiomyozyten an Tag 0 in Kultur



Zu Abb. Kap. 3. (II): Stäbchenförmige Kardiomyozyten nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin im linken Bild. Zum Vergleich fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Herzmuskelzelle zum selben Zeitpunkt nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid im rechten Bild.

3.1.3 Einfluss von Lebensalter und Gewicht der Versuchstiere auf das Volumen der Kardiomyozyten

Es wurden insgesamt 210 ein- und zweikernige, stäbchenförmige Kardiomyozyten von Ratten im Alter von 6, 7 und 10 Wochen mit einem Gewicht von 220 g, 270g und 400g untersucht.

Das Volumen der Kardiomyozyten wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

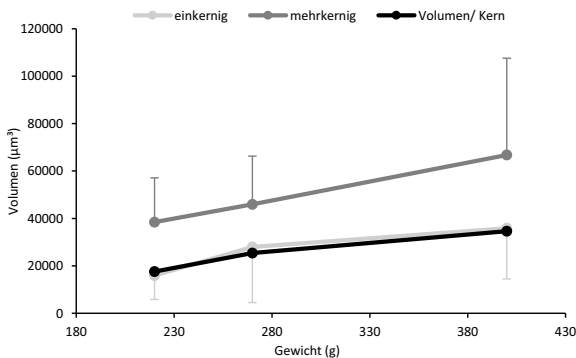
$$\pi \cdot (0,5 \cdot \text{Breite des Kardiomyozyten})^2 \cdot \text{Länge des Kardiomyozyten} (V = \pi \cdot r \cdot L).$$

Das durchschnittliche Volumen pro Kern der ein- und zweikernigen Kardiomyozyten jeder Gewichtsklasse folgendermaßen:

$$0,5 \cdot ((\text{durchschnittliches Volumen von } n \geq 2 \cdot 0,5) + \text{durchschnittliches Volumen von } n=1).$$

Das Ergebnis der Berechnungen wird in Abb. Kap. 3. (III) dargestellt:

Abb. Kap. 3. (III):



Zu Abb. Kap. 3. (III): Abhängigkeit des Volumens der Kardiomyozyten vom Gewicht der Versuchstiere. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 210 vermessenen Kardiomyozyten.

3.1.4 Zusammenfassung zu 3.1

Zwei Drittel der isolierten Kardiomyozyten auf der Kulturschale erschienen an Tag 0 in Kultur intakt und dabei stäbchenförmig. $4,4 \pm 1,4$ % der Kardiomyozyten hatten einen,

der Rest zwei bis maximal vier Kerne. Die kontraktilen Elemente der intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten füllten den gesamten Zelleib aus, ihre Anordnung erschien regelmäßig und dicht. Das durchschnittliche Volumen pro Kardiomyozyten stieg mit Alter und Gewicht der Versuchstiere an. Das Volumen der zweikernigen Kardiomyozyten war dabei im Schnitt doppelt so groß wie das Volumen der einkernigen Kardiomyozyten der jeweiligen Alters- bzw. Gewichtsklasse.

3.2 *Kulturen adulter Kardiomyozyten unter FCS-haltigen Kulturbedingungen*

3.2.1 Beobachtung nach 2 Tagen in Kultur

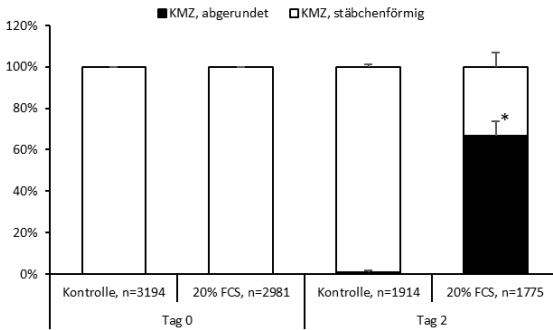
3.2.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Die Kultivierung der Kardiomyozyten in der Versuchsgruppe erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten desselben Herzens, die ohne Zugabe von FCS zum Waschmedium kultiviert wurden. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

Während sich die beiden Gruppen mit bzw. ohne 20 % FCS im Kulturmedium an Tag 0 glichen, wurden an Tag 2 morphologische Unterschiede zwischen den intakten Kardiomyozyten der beiden Gruppen deutlich. So hatten alle intakten Kardiomyozyten der Kontrollgruppe ihre stäbchenförmige Form behalten. Ein Großteil der intakten Kardiomyozyten aus der Versuchsgruppe erschien dagegen mehr oder weniger abgerundet bis kreisrund. Die charakteristische Querstreifung war in diesem Fall nicht mehr zu erkennen. Die dazugehörigen Abb. Kap. 5. (II a + b) finden sich unter 5.1 *Abbildungen*.

Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (IV):

Abb. Kap. 3. (IV):

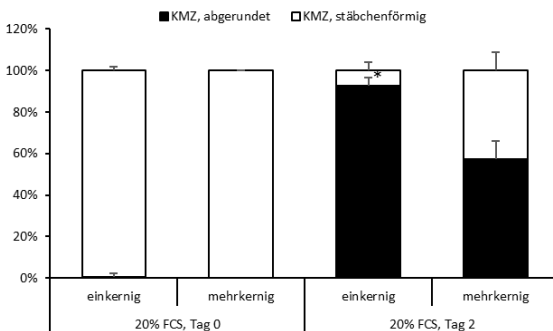


Zu Abb. Kap. 3. (IV): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. n entspricht der Anzahl der ausgewerteten Kardiomyozyten in der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, Kontrolle.

3.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

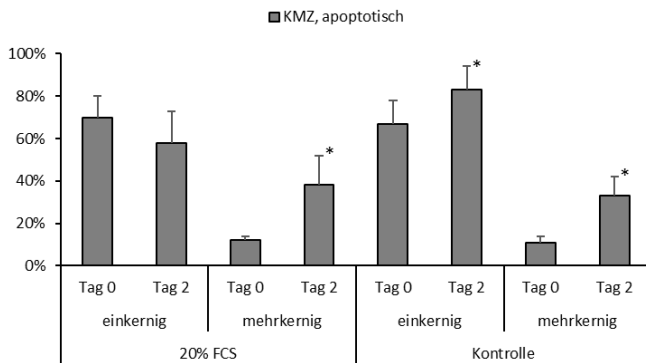
Intakte und apoptotische, ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden nun gesondert betrachtet. Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (V + VI) :

Abb. Kap. 3. (V):



Zu Abb. Kap. 3. (V): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, mehrkernig.

Abb. Kap. 3. (VI):



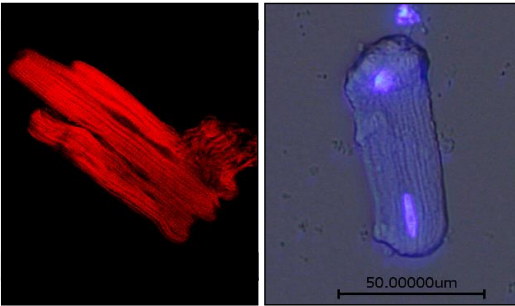
Zu Abb. Kap. 3. (VI): Prozentsatz der apoptotischen Kardiomyozyten in Bezug auf alle Kardiomyozyten mit derselben Anzahl an Kernen nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 0 und derselben Anzahl an Kernen in der jeweiligen Gruppe.

3.2.1.3 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin

Nach Anfärbung mittels Phalloidin-Tetramethylrhodamin zeigte sich die strenge Ordnung des filamentären Aktins der abgerundeten Kardiomyozyten unter dem konfokalen Mikroskop aufgelockert. Die charakteristische Querstreifung war ausgehend von den Zellpolen mit zunehmender Abrundung der Kardiomyozyten immer weniger bis gar nicht mehr auszumachen.

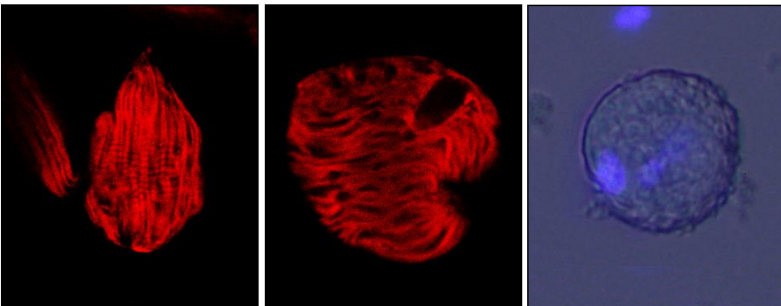
Abb. Kap. 3. (VII a + b): Kardiomyozyten an Tag 2 in Kultur

Abb. Kap. 3. (VII a): Kontrolle



Zu Abb. Kap. 3. (VII a): Stäbchenförmige Kardiomyozyten nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin im linken Bild. Zum Vergleich fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Herzmuskelzelle zum selben Zeitpunkt nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid im rechten Bild.

Abb. Kap. 3. (VII b): 20 % FCS



Zu Abb. Kap. 3. (VII b): Abgerundete Kardiomyozyten nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin in den zwei linken Bildern. Zum Vergleich fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Herzmuskelzelle zum selben Zeitpunkt nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid im rechten Bild.

3.2.2 Beobachtungen nach 5 Tagen in Kultur

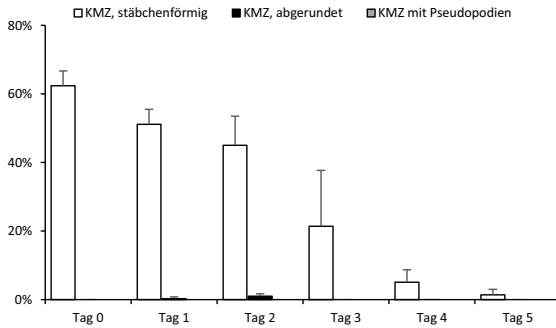
Die Kultivierung der Kardiomyozyten in der Versuchsgruppe erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten desselben Herzens, die ohne Zugabe von FCS zum Waschmedium kultiviert wurden. Die Untersuchung der Kardiomyozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte ohne Anfärbung. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden an den Tagen 0 bis 5 in Kultur untersucht.

Auch in den Tag 3 bis 5 in Kultur behielten die intakten Kardiomyozyten der Kontrollgruppe ihr stäbchenförmiges Aussehen. Die Anzahl der intakten Kardiomyozyten nahm jedoch von Anbeginn mit jedem weiteren Tag in Kultur ab, bis nach fünf Tagen kaum noch intakte Kardiomyozyten auf den Kulturschalen zu finden waren. Abgestorbene Kardiomyozyten zeichneten sich durch einen Verlust des stäbchenförmigen Aussehens sowie der charakteristischen Querstreifung aus. Ihr Sarkolemm erschien blasenförmig aufgetrieben, die Form variierte zwischen kommaförmig bis rundlich. Die Anhaftung an den Kulturschalenboden lies nach und die abgestorbenen Kardiomyozyten lösten sich nach und nach ab.

In der Versuchsgruppe konnten neben den stäbchenförmigen und den abgerundeten Kardiomyozyten ab dem dritten Tag in Kultur auch solche abgerundeten Kardiomyozyten beobachtet werden, die Pseudopodien ausgebildet hatten. Auch nach fünf Tagen in Kultur waren noch $22,1 \pm 6,3$ % der Kardiomyozyten am Leben, der Prozentsatz der Kardiomyozyten mit Pseudopodien erreichte am fünften Tag seinen Maximalwert. Die dazugehörigen Abb. Kap. 5. (III a + b + c) finden sich unter 5.1 *Abbildungen*.

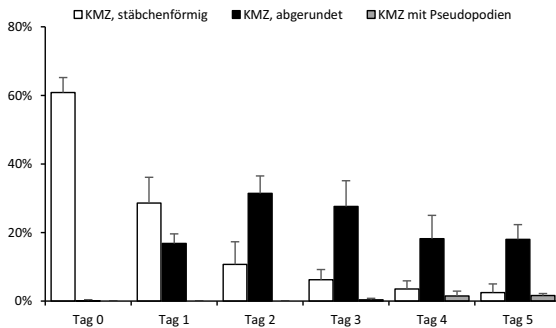
Die Darstellung der quantitativen Analyse der Kontrollgruppe erfolgt in Abb. Kap. 3. (VIII a), die der Versuchsgruppe mit FCS-haltigen Kulturbedingungen in Abb. Kap. 3. (VIII b):

Abb. Kap. 3. (VIII a):



Zu Abb. Kap. 3. (VIII a): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie bezogen auf die Gesamtheit der ausgewerteten Kardiomyozyten des jeweiligen Tages. Die Kultivierung der Kontrollgruppe erfolgte ohne weitere Zusätze zum Waschmedium. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Kulturen.

Abb. Kap. 3. (VIII b):



Zu Abb. Kap. 3. (VIII b): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie bezogen auf die Gesamtheit der ausgewerteten Kardiomyozyten des jeweiligen Tages. Die Kultivierung erfolgte unter Zusatz von 20 % FCS zum Waschmedium. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Kulturen

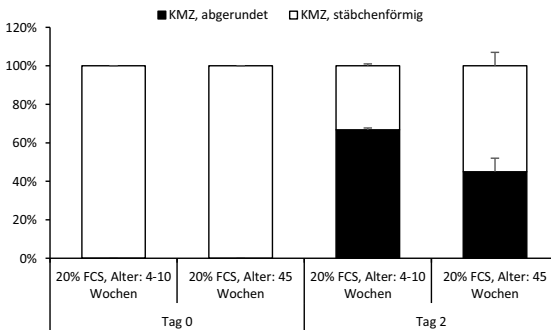
3.2.3 Einfluss des Lebensalters auf die Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

3.2.3.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Als Versuchsgruppe dienten die Herzen 45 Wochen alter, weiblicher Ratten. $5,1 \pm 2,1$ % der intakten Kardiomyozyten besaßen dabei einen Kern, $94,9 \pm 2,1$ % der Kardiomyozyten wiesen zwei oder mehr Kerne auf. Die Kultivierung der isolierten Kardiomyozyten erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (IX):

Abb. Kap. 3. (IX):

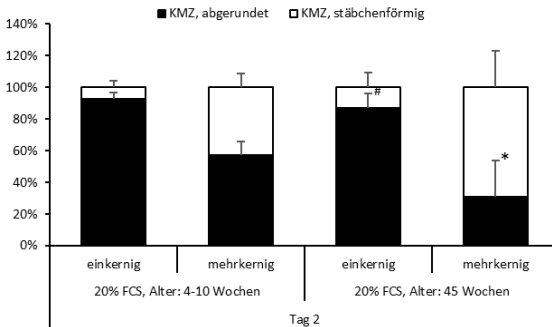


Zu Abb. Kap. 3. (IX): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen von männlichen Versuchstieren im Alter von 4-10 Wochen und 4 Kulturen von weiblichen Versuchstieren im Alter von 45 Wochen.

3.2.3.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden nun gesondert betrachtet. Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (X).

Abb. Kap. 3. (X):



Zu Abb. Kap. 3. (X): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 8 Kulturen von männlichen Versuchstieren im Alter von 4-10 Wochen und 4 Kulturen von weiblichen Versuchstieren im Alter von 45 Wochen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS, Alter: 4-10 Wochen, mehrkernig; #, vs. Tag 2, 20 % FCS, Alter: 45 Wochen, mehrkernig.

3.2.4 Zusammenfassung zu 3.2

Die Bereitstellung von 20 % FCS gestattete den Kardiomyozyten sich abzurunden und im weiteren zeitlichen Verlauf Pseudopodien auszubilden, was die Überlebensrate der Kardiomyozyten unter Kulturbedingungen über die Dauer von 2 Tagen hinaus verbesserte. Die relative Genexpression sarkolemmaler Strukturproteine, wie Troponin T und α/β -myosin heavy chain, war nach 2 Tagen in Kultur unter FCS-haltigen Bedingungen signifikant reduziert (Schlüter et al., 2017). Den abgerundeten Kardiomyozyten fehlten die charakteristischen lichtmikroskopischen Korrelate des kontraktilen Apparats. Einkernige

Kardiomyozyten waren in einem höheren Maße als mehrkernige Kardiomyozyten dazu befähigt sich abzurunden und auf diese Weise der Apoptose zu entgehen. Mit zunehmendem Alter verringerte sich die Fähigkeit der isolierten Kardiomyozyten sich abzurunden. Mehrkernige Kardiomyozyten waren davon in einem stärkeren Maße betroffen als einkernige Kardiomyozyten.

3.3 *Effekte von Phenylephrin und Angiotensin II auf Kulturen adulter Kardiomyozyten*

3.3.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur

3.3.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

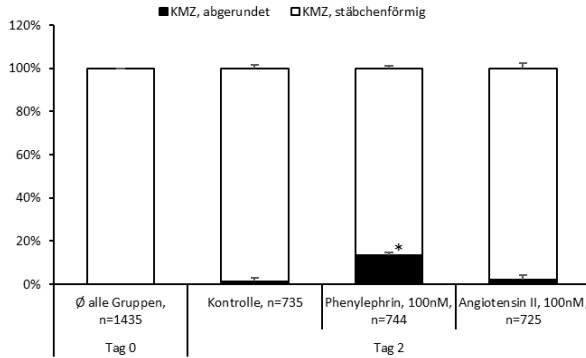
Die Kultivierung der Kardiomyozyten in den beiden Versuchsgruppen erfolgte entweder unter Zugabe von Phenylephrin oder unter der Zugabe von Angiotensin II in einer Konzentration von entweder 100 nM bzw. 1 μ M zum Waschmedium. Zum Vergleich wurden die unter 3.2.1 beschriebenen Kardiomyozyten-Kulturen ohne Zusatz von FCS zum Waschmedium herangezogen. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

An Tag 0 in Kultur bestanden keinerlei feststellbare morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Unabhängig von der verwendeten Konzentration glichen nach 2 Tagen die Kulturen versetzt mit Angiotensin II weiterhin der Kontrollgruppe ohne Zusätze im Waschmedium. Die intakten Kardiomyozyten erschienen hierbei durchgehend stäbchenförmig. Im Gegensatz dazu fanden sich in den Kulturen versetzt mit Phenylephrin abgerundete Kardiomyozyten, die sich morphologisch von den abgerundeten Kardiomyozyten, wie sie unter der Kultivierung mit 20 % FCS im Waschmedium auftauchten, nicht unterscheiden ließen. Die dazugehörigen Abb. Kap 5. (IV a + b) finden sich unter 5.1 *Abbildungen*.

Die Darstellung der quantitativen Analyse der Kulturen mit einer Konzentration von 100nM Phenylephrin bzw. Angiotensin II im Waschmedium erfolgt in Abb. Kap. 3. (XI

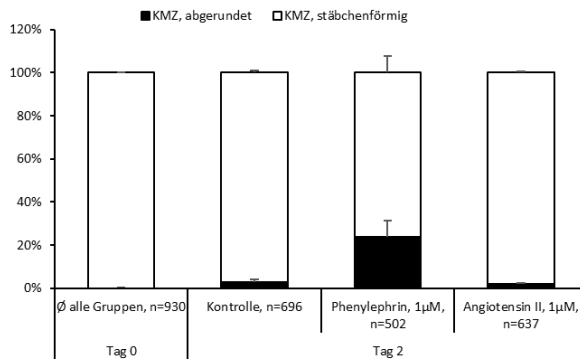
a), die der Kulturen mit einer Konzentration von 1 μM Phenylephrin bzw. Angiotensin II im Waschmedium erfolgt in Abb. Kap. 3. (XI b):

Abb. Kap. 3. (XI a):



Zu Abb. Kap. 3. (XI a): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Die Kultivierung erfolgte unter Zusatz von 100 nM Phenylephrin bzw. Angiotensin II zum Waschmedium. n entspricht der Anzahl der ausgewerteten Kardiomyozyten in der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, Angiotensin II; vs. Tag 2, Kontrolle.

Abb. Kap. 3. (XI b):

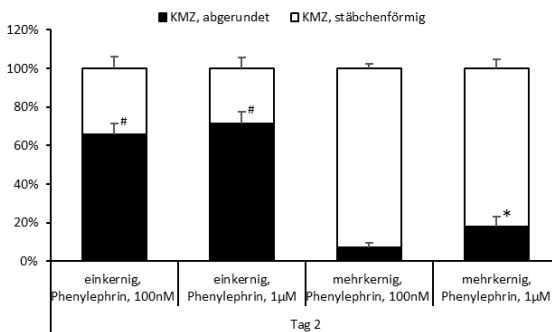


Zu Abb. Kap. 3. (XI b): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Die Kultivierung erfolgte unter Zusatz von 1 μM Phenylephrin bzw. Angiotensin II zum Waschmedium. n entspricht der Anzahl der ausgewerteten Kardiomyozyten in der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Kulturen.

3.3.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

Ein- und mehrkernigen Kardiomyozyten wurden nun gesondert betrachtet und die Beobachtungen unter den beiden verwendeten Konzentrationen miteinander verglichen. Das Ergebnis wird in Abb. Kap. 3. (XII) dargestellt:

Abb. Kap. 3. (XII):

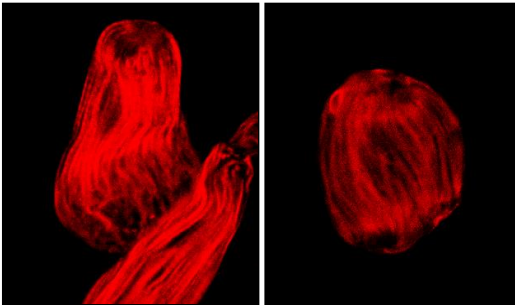


Zu Abb. Kap. 3. (XII): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Für die beiden verwendeten Konzentrationen sind Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils 3 Kulturen dargestellt. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, Phenylephrin, 100 nM, mehrkernig; #, vs. Tag 2, Phenylephrin in der jeweils entsprechenden Konzentration, mehrkernig.

3.3.1.3 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin

Die unter Zusatz von 1 μM Phenylephrin an Tag 2 beobachteten abgerundeten Kardiomyozyten glichen morphologisch den abgerundeten Kardiomyozyten aus FCS-haltigen Kulturbedingungen, wie sie unter 3.2.1.3 beschrieben wurden.

Abb. Kap. 3. (XIII): Kardiomyozyten an Tag 2 in Kultur unter Zusatz von 1 μM Phenylephrin



Zu Abb. Kap. 3. (XIII): Abgerundete Kardiomyozyten nach Anfärbung mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin.

3.3.2 Zusammenfassung zu 3.3

Abgerundete Kardiomyozyten ließen sich nach 2 Tagen unter Phenylephrin-haltigen Kulturbedingungen beobachten. Einkernige Kardiomyozyten waren in einem höheren Maße als mehrkernige Kardiomyozyten dazu befähigt sich abzurunden. Die Erhöhung der Phenylephrinkonzentration im Waschmedium vermochte die Rate an abgerundeten Kardiomyozyten zu steigern. Den abgerundeten Kardiomyozyten fehlten charakteristische lichtmikroskopische Korrelate des kontraktile Apparats. Unter Angiotensin II-haltigen Kulturbedingungen wurden keine abgerundeten Kardiomyozyten beobachtet.

3.4 Effekt des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 auf FCS-haltige Kulturen adulter Kardiomyozyten

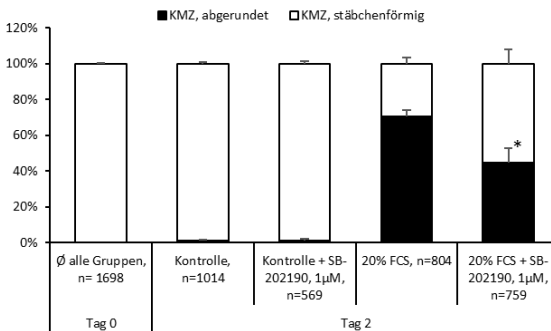
3.4.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur

3.4.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Die Kultivierung der Hälfte der isolierten Kardiomyozyten eines Herzens erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Die Kultivierung der anderen Hälfte geschah ohne den Zusatz von FCS. Die Zugabe des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 in das Waschmedium der Hälfte der Kulturschalen erfolgte im Anschluss an die Isolation mit einer Konzentration von 1 μM . SB202190 vermag die p38-MAPK in einer Konzentration von 1 μM ausreichend zu inhibieren (Wenzel et al., 2005). Die isolierten Kardiomyozyten eines Herzens wurden folglich in Waschmedium ohne weiteren Zusatz oder in Waschmedium versetzt mit SB-202190 oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS sowie SB-202190 kultiviert. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Fotografien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

Das Ergebnis der quantitativen Analyse wird in Abb. Kap. 3. (XIV) dargestellt:

Abb. Kap. 3. (XIV):

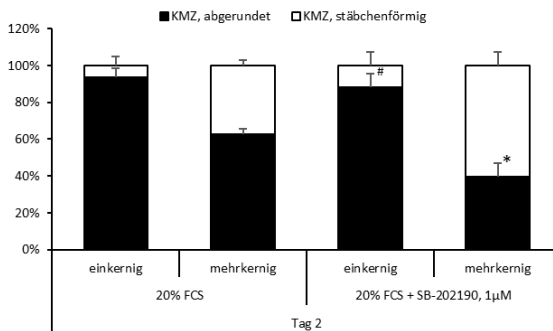


Zu Abb. Kap. 3. (XIV): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. *n* entspricht der Anzahl der ausgewerteten Kardiomyozyten in der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS.

3.4.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden nun gesondert betrachtet. Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (XV):

Abb. Kap. 3. (XV):



Zu Abb. Kap. 3. (XV): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS, mehrkernig; [#], vs. Tag 2, 20 % FCS + SB-202190, 1 μ M, mehrkernig.

3.4.2 Zusammenfassung zu 3.4

Unter dem Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 verringerte sich der Anteil der abgerundeten Kardiomyozyten über die Dauer von 2 Tagen in Kultur signifikant.

Mehrkernige Kardiomyozyten waren davon in einem stärkeren Maße betroffen als ein-kernige Kardiomyozyten.

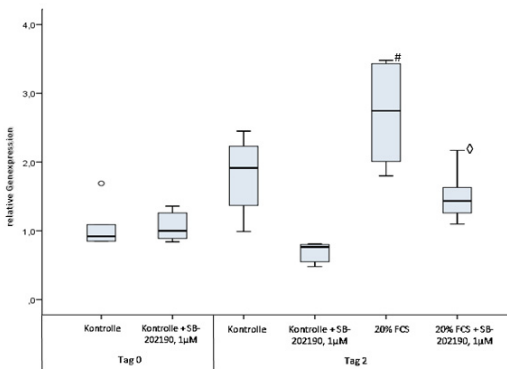
3.5 Effekte der Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen und des p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 auf die relative Genexpression von PSMB9 in Kulturen adulter Kardiomyozyten

3.5.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur

Die Kultivierung der Kardiomyozyten in der Versuchsgruppe erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten desselben Herzens, die ohne Zugabe von FCS zum Waschmedium kultiviert wurden. Die Ernte der Kardiomyozyten zur Isolation der RNA und aller sich daran anschließenden, wie unter 2.2.4 beschriebenen Schritte erfolgte an Tag 0 und Tag 2 in Kultur. Nach Umwandlung der isolierten RNA in cDNA und Durchführung der Quantitativen Real-time-PCR wurde die relative Genexpression von PSMB9 mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Als Kontrollgen diente dabei B2M, als Kontrollzeitpunkt Tag 0 und als Zeitpunkt von Interesse Tag 2. Mit einer weiteren Stichprobe wurde in gleicher Weise verfahren. Der Versuchsaufbau unterschied sich einzig in der Zugabe von 1 μM SB-202190 zum Waschmedium aller Kulturen im Anschluss an die Isolation.

Die Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. Kap. 3. (XVI):

Abb. Kap. 3. (XVI):



Zu Abb. Kap. 3. (XVI): Relative Genexpression von PSMB9 dargestellt als Boxplots (Box: Median \pm ein Quartil, Whisker = $1,5 \cdot$ Interquartilabstand, außerhalb: Ausreißer) von jeweils 6 untersuchten Kulturen. [#], $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, Kontrolle, [◇], $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS.

3.5.2 Zusammenfassung zu 3.5

Die Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen über die Dauer von 2 Tagen erhöhte die relative Genexpression von PSMB9 signifikant. Der p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 vermochte diesen Effekt zu verhindern.

3.6 Effekte der Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen und des p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 auf die relative Proteinexpression von LMP2 in Kulturen adulter Kardiomyozyten

3.6.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur

Die Kultivierung der Kardiomyozyten in der Versuchsgruppe erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten desselben Herzens, die ohne Zugabe von FCS zum Waschmedium kultiviert wurden. Die Ernte der Kardiomyozyten in Vorbereitung auf den Western Blot und die Immunomarkierung, wie unter 2.2.5 beschrieben, erfolgte an Tag 0 und Tag 2 in Kultur. Zur Berechnung der relativen Proteinexpression von LMP2 wurde GAPDH als Referenzprotein herangezogen. Der Quotient aus den gemessenen Helligkeitswerten von Ziel- und Referenzprotein an Tag 2 wurde dabei auf den entsprechenden Wert von Tag 0 bezogen. Die Stichprobe bestand aus 12 Kulturschalen.

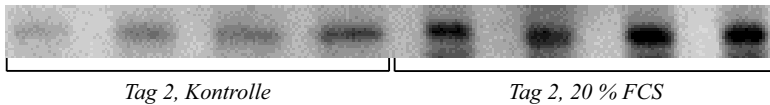
Mit einer weiteren Stichprobe bestehend aus 12 Kulturschalen wurde in gleicher Weise verfahren. Der Versuchsaufbau unterschied sich einzig in der Zugabe von $1 \mu\text{M}$ SB-202190 zum Waschmedium aller Kulturen im Anschluss an die Isolation.

Wurden die Kardiomyozyten in FCS-haltigem Medium kultiviert, so betrug die errechnete relative Proteinexpression an Tag 2 in Kultur das Doppelte der errechneten relativen Proteinexpression FCS-freier Kulturen (20 % FCS: $0,93 \pm 0,15$, Kontrolle: $0,46 \pm 0,16$). Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

Unter Zusatz von SB-202190 konnte kein signifikanter Gruppenunterschied mehr festgestellt werden (20 % FCS + SB-202190: $0,78 \pm 0,11$, Kontrolle + SB-202190: $1,04 \pm 0,23$). Die exemplarische Darstellung dazugehöriger Western Blots erfolgt in Abb. Kap. 3. (XVII a + b). Die hier dargestellten Banden wurden anhand der Höhe des Molekulargewichts als spezifisch angesehen und ausgewählt.

Abb. Kap. 3. (XVII a):

Proteinexpression von LMP2 FCS-haltiger Kulturen



Proteinexpression von GAPDH FCS-haltiger Kulturen

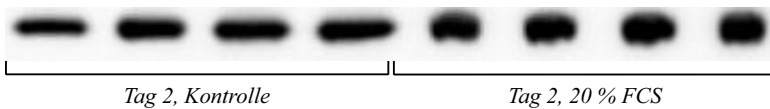
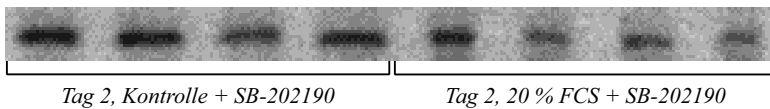
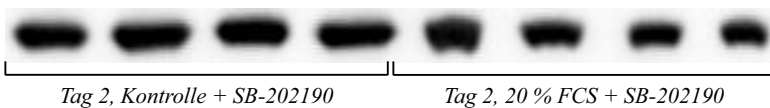


Abb. Kap. 3. (XVII b):

Proteinexpression von LMP2 FCS-haltiger Kulturen unter Zusatz von $1 \mu\text{M}$ SB-202190



Proteinexpression von GAPDH FCS-haltiger Kulturen unter Zusatz von $1 \mu\text{M}$ SB-202190



3.6.2 Zusammenfassung zu 3.6

Die Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen über die Dauer von zwei Tagen erhöhte die relative Proteinexpression von LMP2 signifikant. Der p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 vermochte diesen Effekt zu verhindern.

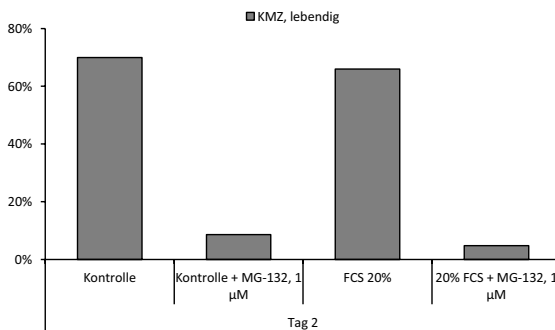
3.7 Auswirkungen der Inhibition des Proteasoms auf FCS-haltige Kulturen adulter Kardiomyozyten

3.7.1 Effekt des Proteasomen-Inhibitors MG-132 auf FCS-haltige Kulturen

Die Kultivierung der Hälfte der isolierten Kardiomyozyten eines Herzens erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Die Kultivierung der anderen Hälfte geschah ohne den Zusatz von FCS. Die Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG-132 erfolgte im Anschluss an die Isolation in das Waschmedium in der von der Literatur empfohlenen Konzentration von 1 μM in die Hälfte der Kulturschalen. Die isolierten Kardiomyozyten eines Herzens wurden demnach in Waschmedium ohne weiteren Zusatz oder in Waschmedium versetzt mit MG-132 oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS sowie MG-132 kultiviert. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

Unabhängig davon, ob das Waschmedium neben MG-132 noch 20 % FCS enthält, sorgte das im Waschmedium enthaltene MG-132 dafür, dass nahezu sämtliche Kardiomyozyten im Verlauf von 2 Tagen in Kultur abstarben. Aufgrund dieses unspezifischen Zelltods wurden keine weiteren Versuche nach diesem Schema durchgeführt.

Abb. Kap. 3. (XVIII):



Zu Abb. Kap. 3. (XVIII): Intakte Kardiomyozyten bezogen auf die Gesamtheit der ausgewerteten Kardiomyozyten des jeweiligen Tages. Dargestellt ist das Ergebnis einer einzigen Kultur.

3.7.2 Effekt der PSMB9 siRNA auf FCS-haltige Kulturen

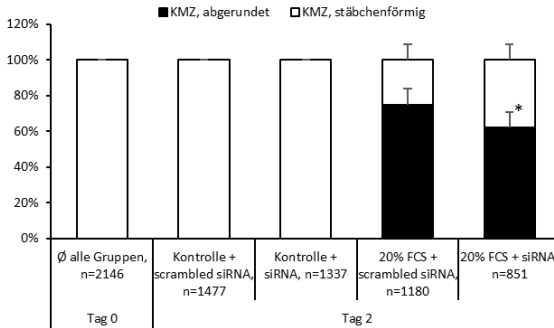
3.7.2.1 Beobachtungen nach 2 Tagen in Kultur

3.7.2.1.1 Morphologische Betrachtung nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Die Kultivierung der Hälfte der isolierten Kardiomyozyten eines Herzens erfolgte unter Zugabe von 20 % FCS zum Waschmedium. Die Kultivierung der anderen Hälfte geschah ohne den Zusatz von FCS. Die siRNA wurde im Anschluss an die Isolation dem Waschmedium zugefügt, die gewählte Konzentration der RNA betrug dabei 5 nM. Zum Einsatz kamen PSMB9 siRNA und scrambled siRNA, um unspezifische Effekte durch die Anwesenheit der zugefügten siRNA kontrollieren zu können. Die isolierten Kardiomyozyten eines Herzens wurden folglich in Waschmedium versetzt mit scrambled siRNA oder in Waschmedium versetzt mit siRNA oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS und scrambled siRNA oder in Waschmedium versetzt mit 20 % FCS sowie siRNA kultiviert. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Kardiomyozyten mit HOECHST/Propidiumiodid angefärbt. In der Auswertung der angefertigten Photographien wurden intakte von abgestorbenen Kardiomyozyten unterschieden (siehe 3.1.1) und die Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie kategorisiert. Die Kardiomyozyten beider Gruppen wurden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 in Kultur untersucht.

Das Ergebnis der quantitativen Analyse wird in Abb. Kap. 3. (XIX) dargestellt:

Abb. Kap. 3. (XIX):

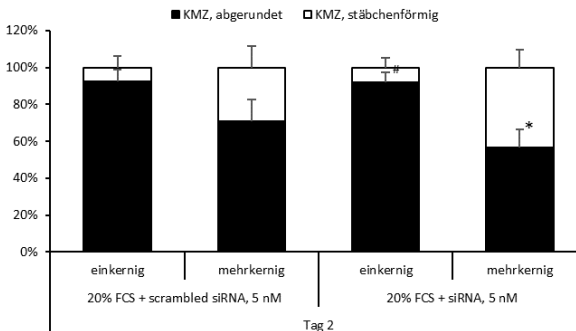


Zu Abb. Kap. 3. (XIX): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. n entspricht der Anzahl der ausgewerteten Kardiomyozyten in der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS + scrambled siRNA.

3.7.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden

Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden nun gesondert betrachtet. Die Darstellung der quantitativen Analyse erfolgt in Abb. Kap. 3. (XX):

Abb. Kap. 3. (XX):



Zu Abb. Kap. 3. (XX): Intakte Kardiomyozyten unterschieden hinsichtlich ihrer Morphologie nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid. Ein- und mehrkernige Kardiomyozyten wurden jeweils gesondert betrachtet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Kulturen. *, $p \leq 0.05$ vs. Tag 2, 20 % FCS + scrambled siRNA, 5 nM, mehrkernig; #, vs. Tag 2, 20 % FCS + siRNA, 5 nM, mehrkernig.

3.7.2.2 Zusammenfassung zu 3.7

Wurde die Translation der mRNA des proteasomalen Proteins LMP2 mit Hilfe der entsprechenden siRNA unterdrückt, so verringerte sich der Anteil der abgerundeten Kardiomyozyten über die Dauer von 2 Tagen in Kultur signifikant. Mehrkernige Kardiomyozyten waren davon in einem stärkeren Maße betroffen als einkernige Kardiomyozyten.

3.8 Die relative Genexpression von PSMB9 in spontan hypertensiven Ratten

3.8.1 Beobachtungen über den Verlauf von 7,5 Monaten

Das Herzgewebe spontan hypertensiver Ratten wurde untersucht, als die Tiere das Alter von drei, viereinhalb und siebeneinhalb Monaten erreicht hatten. Die RNA wurde aus dem Herzgewebe der Tiere isoliert und wie unter 2.2.4 beschrieben weiterverarbeitet. Die relative Genexpression wurde nach Durchführung der Qualitativen Real-time-PCR mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet. Als Kontrollgen diente dabei B2M, als Kontrollzeitpunkt das Alter von eineinhalb Monaten und als Zeitpunkt von Interesse das Alter von eineinhalb, drei, viereinhalb und siebeneinhalb Monaten. Ab dem Alter von 1,5 Monaten stand den Tieren ein Laufrad zum ständigen Gebrauch zur Verfügung.

Die ermittelte relative Expression von LMP2 der spontan hypertensiver Ratten verhielt sich dabei wie in Abb. Kap. 3. (XXI) dargestellt:

Abb. Kap. 3. (XXI):



Zu Abb. Kap. 3. (XXI): Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils 6-8 Versuchstieren pro Gruppe. *, $p \leq 0.05$ vs. Alter: 1,5 Monate, Alter: 3 Monate, Alter: 7,5 Monate; #, $p \leq 0.05$ vs. Alter: 1,5 Monate, Alter: 4,5 Monate, Alter: 7,5 Monate

3.8.2 Zusammenfassung zu 3.8

Die Expression von PSMB9 im Herzgewebe spontan hypertensiver Ratten stieg bis zum Alter von viereinhalb Monaten signifikant.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die vorliegende Untersuchung wurden adulte ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten isoliert und kultiviert. Das Hauptaugenmerk richtete sich auf Vorgänge innerhalb der ersten 48 Stunden in Kultur:

- Die Bereitstellung von 20 % FCS gestattete den isolierten Kardiomyozyten sich abzurunden. Den abgerundeten Kardiomyozyten fehlten die charakteristischen lichtmikroskopischen Korrelate des kontraktile Apparats. Die relative Genexpression sarkolemmaler Strukturproteine, wie Troponin T und *α/β -myosin heavy chain*, zeigte sich signifikant reduziert. Im weiteren zeitlichen Verlauf bildeten die abgerundeten Kardiomyozyten teilweise Pseudopodien aus. In der Kontrollgruppe ohne FCS im Kulturmedium wurden keine abgerundeten Kardiomyozyten und keine Pseudopodien gesehen. Nach 5 Tagen in Kultur waren beinahe sämtliche Kardiomyozyten der Kontrollgruppe abgestorben.
- Abgerundete Kardiomyozyten ließen sich auch nach 2 Tagen unter Phenylephrin-haltigen Kulturbedingungen beobachten. Unter Angiotensin II-haltigen Kulturbedingungen wurden keine abgerundeten Kardiomyozyten beobachtet.
- FCS-haltige Kulturbedingungen erhöhten sowohl die relative Genexpression von PSMB9 als auch die relative Proteinexpression von LMP2. Wurde die Translation der mRNA von LMP2 mit Hilfe einer entsprechenden siRNA unterdrückt, so verringerte sich der Anteil der abgerundeten Kardiomyozyten. Die Expression von PSMB9 im Herzgewebe spontan hypertensiver Ratten *in vivo* stieg bis zum Alter von viereinhalb Monaten an. Die Herzleistung der Tiere zeigte sich während dieses Zeitraums unbeeinträchtigt (Schreckenberget al., 2017).
- Die Steigerung der relativen Genexpression von PSMB9 sowie die Steigerung der relativen Proteinexpression von LMP2 konnte durch den p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 verhindert werden. Unter dem Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors SB-202190 verringerte sich auch der Anteil der abgerundeten Kardiomyozyten über die Dauer von 2 Tagen in Kultur unter FCS-haltigen Bedingungen.

- Einkernige Kardiomyozyten waren in allen Versuchsanordnungen in einem höheren Maße als mehrkernige Kardiomyozyten dazu befähigt sich abzurunden und auf diese Weise der Apoptose zu entgehen. Mit zunehmendem Tialter verringerte sich die Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Das Abrunden der Kardiomyozyten erfordert die Anwesenheit von FCS

Isolierte adulte Kardiomyozyten durchlaufen unter FCS-haltigen Kulturbedingungen einen Anpassungsprozess, der mit der Degradation des kontraktilen Apparats und dem Abrunden der Kardiomyozyten beginnt. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien und der Neuformation des kontraktilen Apparats (Nippert et al., 2016). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Frage nachgegangen, ob es sich beim Abrunden der Kardiomyozyten um einen aktiven Prozess handelt oder ob das Abrunden der ausbleibenden elektrischen Erregung und mechanischen Entlastung geschuldet ist.

Unter FCS-haltigen Kulturbedingungen zeigten sich nach 48 Stunden $33,3 \pm 6,9$ % der lebenden Kardiomyozyten abgerundet. Den abgerundeten Kardiomyozyten fehlte die charakteristische Querstreifung als Korrelat des kontraktilen Apparats. Die relative Genexpression sarkolemmaler Strukturproteine, wie Troponin T und *α/β -myosin heavy chain*, zeigte sich signifikant reduziert. Im weiteren zeitlichen Verlauf bildeten einige der abgerundeten Kardiomyozyten Pseudopodien aus. Unter FCS-freien Kulturbedingungen wurden keine abgerundeten Kardiomyozyten oder Pseudopodien gesehen. Nach 5 Tagen in Kultur waren unter FCS-haltigen Kulturbedingungen noch $22,1 \pm 6,3$ % der Kardiomyozyten am Leben, wohingegen unter FCS-freien Kulturbedingungen kaum noch lebende Kardiomyozyten zu finden waren.

Was aus vorangegangenen Arbeiten (Nippert et al., 2016) bereits bekannt war, bestätigte sich in der vorliegenden Untersuchung: Die Kultivierung unter FCS-haltigen Bedingungen provoziert einen Adaptationsprozess, der mit der Umstrukturierung des kontraktilen Apparats einhergeht und so die Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum in Kultur überleben lässt. Dafür könnten im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren verantwortlich sein (Schlüter et al., 2017). Nun konnte gezeigt werden, dass es sich bereits beim Abrunden der Kardiomyozyten um einen aktiven Prozess handelt, der die Anwesenheit von FCS

erfordert und nicht der mechanischen Entlastung geschuldet ist. Somit ist die Dedifferenzierung der Kardiomyozyten als Teil des Anpassungsprozesses und notwendiger initialer Schritt im Ablauf zu werten.

4.2.2 Phenylephrin, nicht jedoch Angiotensin II, kann FCS als Trigger für das Abrunden der Kardiomyozyten ersetzen

Die Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren steigert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die kardiomyozytäre Proteinsyntheserate und resultiert in kardialer Hypertrophie (Cotecchia et al., 2015). Phenylephrin wirkt als Agonist an α -1-adrenergen Rezeptoren (Schlüter et al., 2016 a). In Kultur kann Phenylephrin die Ausbildung von Pseudopodien isolierter adulter Kardiomyozyten provozieren (Volz et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Phenylephrin auch das Abrunden der Kardiomyozyten bewirken kann.

Dies bestätigte sich: Nach 48 Stunden unter FCS-freien, dafür Phenylephrin-haltigen Kulturbedingungen zeigten sich abgerundete Kardiomyozyten. Den abgerundeten Kardiomyozyten fehlte die charakteristische Querstreifung als Korrelat des kontraktile Apparats. Konzentrationsabhängig (100 nM und 1 μ M) konnte die Rate abgerundeter Kardiomyozyten gesteigert werden.

Angiotensin II wird allenfalls eine geringe direkte pro-hypertrophe Wirkung zugestanden (Reudelhuber et al., 2007) und seine Bedeutung für das kardiale Remodelling über indirekt wirkende Mechanismen erklärt (Schlüter und Wenzel, 2008). Mit dieser Anschauung in Einklang stehend wurden unter FCS-freien, dafür Angiotensin II-haltigen Kulturbedingungen keine abgerundeten Kardiomyozyten gesehen.

Zustände pathologisch gesteigerter hämodynamischer Belastung sind durch erhöhte Katecholaminspiegel gekennzeichnet. Katecholamine wirken u.a. als α -1-adrenerge Rezeptoragonisten. Phenylephrin kann als α -1-adrenerger Rezeptoragonist das Abrunden der isolierten Kardiomyozyten provozieren. Dies spricht dafür, dass die in Kultur zu beobachtenden kardiomyozytären Anpassungsvorgänge tatsächlich mit denen im Rahmen des kardialen Remodellings vergleichbar sind und es sich dabei um einen Prozess der initialen De- und anschließenden Redifferenzierung handelt (Nippert et al., 2016).

4.2.3 Das Abrunden der Kardiomyozyten erfordert die verstärkte Synthese von LMP2

Zelluläre Homöostase erfordert eine adäquate Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Proteasomale Insuffizienz gefährdet das zelluläre Überleben (Kostin et al., 2003). Kardiomyozytäre Atrophie wie auch Hypertrophie verändern die Proteinbilanz und erfordern eine Anpassung der proteasomalen Aktivität (Razeghi et al., 2006). Die Inkorporation induzierbarer Untereinheiten kann die proteasomale Aktivität steigern (Ebstein et al., 2012). Die induzierbare Untereinheit LMP2 wurde bereits mehrfach im Hinblick auf ihre Relevanz für die kardiale Hypertrophie untersucht (siehe 1.3). Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Abrunden der Kardiomyozyten und der Expression von LMP2 besteht. Das für LMP2 kodierende Gen trägt die Bezeichnung PSMB9.

An Tag 2 unter FCS-haltigen Kulturbedingungen zeigte sich sowohl die relative Genexpression von PSMB9 als auch die relative Proteinexpression von LMP2 erhöht. Die Zugabe von PSMB9 siRNA zum Waschmedium verringerte den Anteil abgerundeter Kardiomyozyten. *In vivo* wurde die relative Genexpression von PSMB9 spontan hypertensiver Ratten bis zu einem Alter von 4,5 Monaten gesteigert, um danach abzufallen.

Folglich bedarf das Abrunden der Kardiomyozyten der verstärkten Synthese von LMP2. Auf diese Weise erscheint die Degradation des kontraktilen Apparats möglich, ohne die Zellhomöostase in Gefahr zu bringen. Spontan hypertensive Ratten zeigen in den ersten Lebensmonaten eine verstärkte Synthese von LMP2. Während dieser Zeit steigt ihr Herzgewicht kontinuierlich an, ihre kardiale Leistungsfähigkeit ist nicht beeinträchtigt (Schreckenberg et al., 2017). Die Aktivierung des Proteasoms über induzierbare Untereinheiten erscheint also auch *in vivo* für eine erfolgreiche Kompensation unter pathologischen hämodynamischen Bedingungen unerlässlich.

Auch andere Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung einer gesteigerten proteasomalen Aktivität im Hinblick auf diesen Aspekt: Bei erhaltener Herzleistung ist die myokardiale Hypertrophie hypertensiver Hunde durch eine gesteigerte proteasomale Aktivität gekennzeichnet (Depre et al., 2006). Eine Verminderung der proteasomalen Aktivität lässt sich dagegen beim Übergang von einer kompensierten Herzinsuffizienz zum Herzversagen feststellen (Tsukamoto et al., 2006).

4.2.4 Die p38-MAPK ist entscheidend an der verstärkten Synthese von LMP2 und dem Abrunden der Kardiomyozyten beteiligt

Ausgehend von der Tatsache, dass die Proteinexpression der p38-MAPK adulter Kardiomyozyten innerhalb der ersten 48 Stunden unter FCS-haltigen Kulturbedingungen signifikant ansteigt (Wenzel et al., 2005), wurde in der vorliegenden Untersuchung der Versuch unternommen, durch die Inhibition der p38-MAPK mittels SB-202190 ihre Bedeutung für die kardiomyozytären Anpassungsvorgänge unter FCS-haltigen Kulturbedingungen im Allgemeinen und für die Aktivierung des Proteasoms über LMP2 im Speziellen näher zu definieren.

Es zeigte sich, dass sowohl die verstärkte Gen- als auch Proteinexpression von PSMB9/LMP2 während der ersten 48 Stunden unter FCS-haltigen Kulturbedingungen durch den p38-MAPK-Inhibitor SB-202190 (1 μ M) unterdrückt werden konnte. Der Anteil abgerundeter Kardiomyozyten nach 2 Tagen in Kultur verringerte sich darüber signifikant.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die p38-MAPK in der frühen Phase der kardiomyozytären Anpassungsvorgänge unter FCS-haltigen Kulturbedingungen eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung spielt und ihre Aktivierung auch für die verstärkte Expression von LMP2 von Relevanz ist.

Damit im Einklang stehend zeigen spontan hypertensive Ratten anfänglich eine Aktivierung der p38-MAPK, die im Zuge der kardialen Dekompensation verschwindet (Behr et al., 2001).

4.2.5 Einkernige Kardiomyozyten runden zu einem höheren Prozentsatz ab als mehrkernige Kardiomyozyten

Mehrkernige Kardiomyozyten entstehen aus einkernigen Kardiomyozyten durch Karyokinese ohne anschließende Zellteilung. Das weitere myokardiale Wachstum erfolgt durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten. Passend dazu betrug in der vorliegenden Untersuchung das Volumen der zweikernigen Kardiomyozyten im Vergleich zum Volumen der einkernigen Kardiomyozyten im Durchschnitt das Doppelte bei vergleichbarer Kern-Plasma-Relation.

Unterschiede hinsichtlich der elektrischen Aktivität und Kalziumdynamik in Abhängigkeit von der Anzahl der Kerne sind bekannt (Huang et al., 2012). In der vorliegenden

Untersuchung wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kerne und der Anpassungsfähigkeit der Kardiomyozyten besteht.

$4,4 \pm 1,4$ % der isolierten Kardiomyozyten hatten einen Kern, der Rest zwei bis maximal vier Kerne (analog zu Brodsky et al., 1985 und Katzberg et al., 1977). Sowohl ein- als auch mehrkernige Kardiomyozyten waren in der Lage sich abzurunden. Einkernige Kardiomyozyten waren jedoch zu einem signifikant höheren Prozentsatz dazu befähigt und entgingen auf diese Weise der Apoptose. Dies galt für alle durchgeführten Versuchsanordnungen. Mit zunehmendem Alter verringerte sich die Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden. Mehrkernige Kardiomyozyten waren davon in einem stärkeren Maße betroffen als einkernige Kardiomyozyten.

Es lässt sich also konstatieren, dass einkernige Kardiomyozyten über ein höheres Anpassungsvermögen verfügen als mehrkernige Kardiomyozyten. Man attestiert ihnen auch ein höheres regeneratives Potential (Jopling et al., 2010; Kimura et al., 2015): Adulte Mäuse mit einem höheren Prozentsatz an einkernigen diploiden Kardiomyozyten zeigen nach einem beigebrachten Infarkt ein besseres Outcome als solche mit einem geringeren Prozentsatz an mononukleären diploiden Kardiomyozyten (Patterson et al., 2017). Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass der DNA-Gehalt der Zellkerne in der vorliegenden Untersuchung keine Berücksichtigung fand. Diese Tatsache soll deshalb nicht unerwähnt bleiben, weil Polyploidisierung das Regenerationsvermögen von Kardiomyozyten negativ beeinflusst (González-Rosa et al., 2018; Heallen et al., 2019).

4.3 Schlussfolgerungen

- Das Abrunden der Kardiomyozyten, einhergehend mit der Degradation des kontraktilen Apparats, innerhalb der ersten 48 Stunden unter FCS-haltigen Kulturbedingungen kann als Dedifferenzierung der Kardiomyozyten verstanden werden. Es handelt sich dabei um einen aktiven Vorgang. Dieser ist Teil des kardiomyozytären Anpassungsprozesses an die Kulturbedingungen und als notwendiger initialer Schritt im Ablauf zu begreifen. Ohne Adaptation sterben die isolierten Kardiomyozyten innerhalb weniger Tage ab.
- Phenylephrin kann als α -1-adrenerger Rezeptoragonist, wie FCS, das Abrunden der Kardiomyozyten bewirken. Zustände pathologisch gesteigerter hämodynamischer

Belastung sind durch erhöhte Katecholaminspiegel gekennzeichnet. Die Stimulation kardialer α -1-adrenerger Rezeptoren resultiert *in vitro* als auch *in vivo* in kardiomyozytärer Hypertrophie. Dies spricht dafür, dass die kardiomyozytäre Hypertrophie unter pathologisch gesteigerter hämodynamischer Belastung mit Hilfe isolierter adulter Kardiomyozyten als Modell untersucht und als ein komplexer Vorgang, bestehend aus initialer De- und anschließender Redifferenzierung, aufgefasst werden kann.

- Das Abrunden der Kardiomyozyten bedarf der verstärkten Synthese der induzierbaren proteasomalen Untereinheit LMP2. Diese erscheint notwendig, um die Degradation des kontraktile Apparats unter Erhaltung der Zellhomöostase zu gewährleisten. Spontan hypertensive Ratten zeigen in den ersten Lebensmonaten eine verstärkte Synthese von LMP2. Während dieser Zeit steigt ihr Herzgewicht kontinuierlich an, ohne dass die kardiale Leistungsfähigkeit beeinträchtigt wäre. Die Aktivierung des Proteasoms über induzierbare Untereinheiten erscheint folglich auch *in vivo* für eine erfolgreiche Kompensation unerlässlich.
- Die Inhibition der p38-MAPK reduziert sowohl die Syntheserate der induzierbaren proteasomalen Untereinheit LMP2 als auch den Anteil abgerundeter isolierter Kardiomyozyten nach 48 Stunden. Folglich ist die Aktivierung der p38-MAPK von Relevanz für die Signalweiterleitung, die zur verstärkten Synthese von LMP2 und dem Abrunden der Kardiomyozyten führt.
- Einkernige Kardiomyozyten sind zu einem höheren Prozentsatz als mehrkernige Kardiomyozyten in der Lage, sich an die Kulturbedingungen anzupassen und auf diese Weise zu überleben. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass mehrkernige Kardiomyozyten aus einkernigen Kardiomyozyten hervorgehen und sie darüber einen Teil ihres Anpassungsvermögens verloren haben. Das adaptive Potential eines Herzens steckt folglich in seinen einkernigen Kardiomyozyten. Mit zunehmendem Tieralter verringert sich die Fähigkeit der Kardiomyozyten sich abzurunden. Diese Tatsache dürfte mitverantwortlich an der erhöhten kardialen Morbidität im fortgeschrittenen Alter sein.

5 Anhang

5.1 Abbildungen

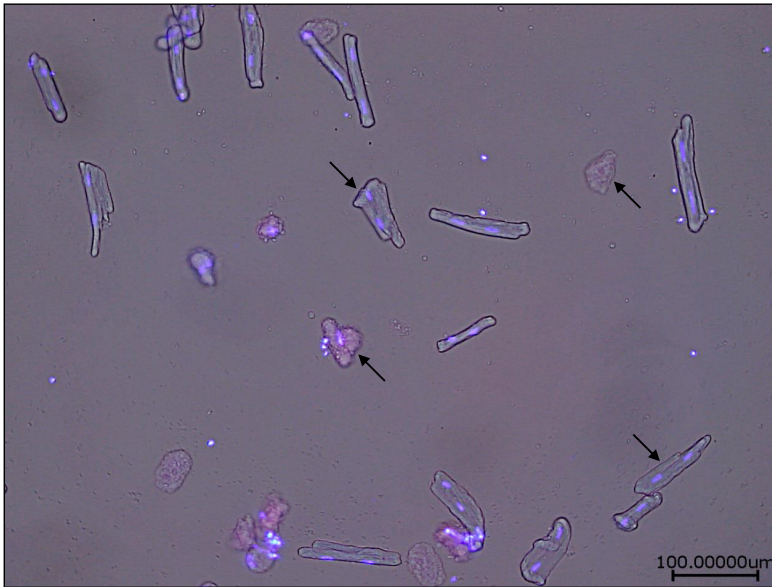
Abb. Kap. 5. (I): Kardiomyozyten an Tag 0 in Kultur nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid



Zu Abb. Kap. 5. (I): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, stäbchenförmige, ein- und zweikernige Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

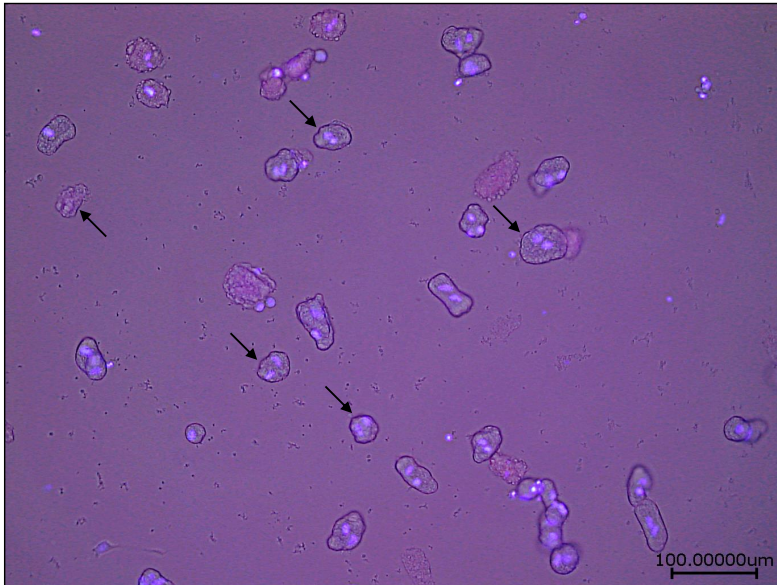
Abb. Kap. 5. (II a + b): Kardiomyozyten an Tag 2 in Kultur nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Abb. Kap. 5. (II a): Kontrolle



Zu Abb. Kap. 5. (II a): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, stäbchenförmige, zweikernige Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

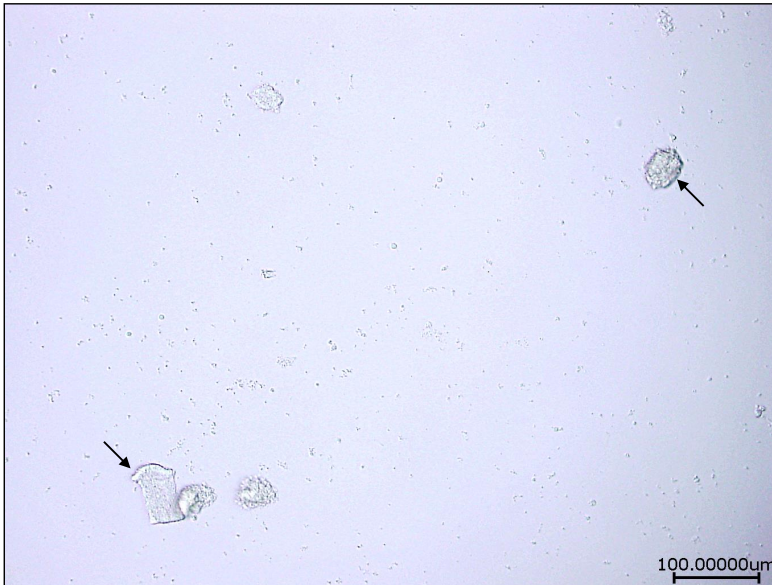
Abb. Kap. 5. (II b): 20 % FCS



Zu Abb. Kap. 5. (II b): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, abgerundete, zweikernige Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

Abb. Kap. 5. (III a + b + c): Kardiomyozyten an Tag 5 in Kultur ungefärbt

Abb. Kap. 5. (III a): Kontrolle



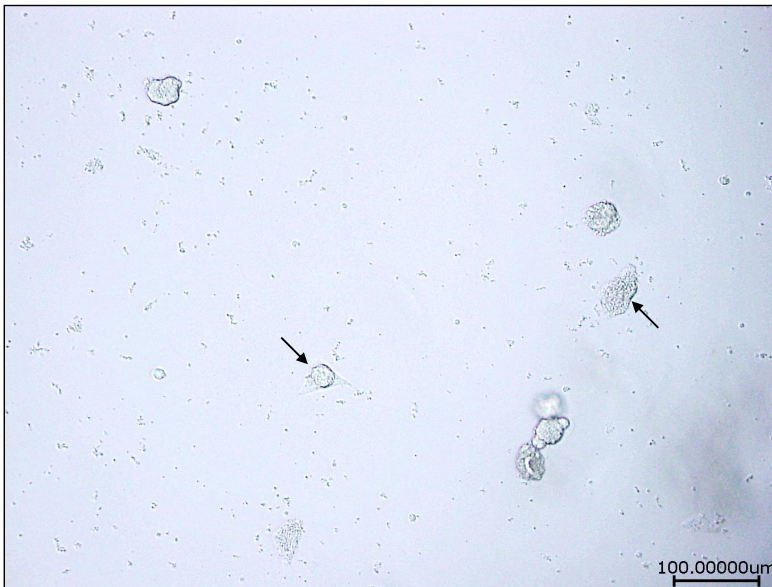
Zu Abb. Kap. 5. (III a): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, stäbchenförmige Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

Abb. Kap. 5. (III b): 20 % FCS



Zu Abb. Kap. 5. (III b): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, abgerundete Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

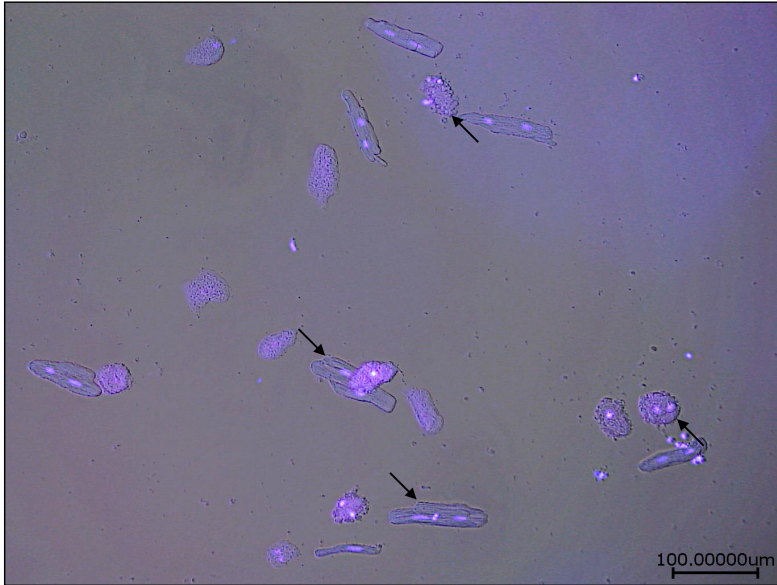
Abb. Kap. 5. (III c): 20 % FCS (weiteres Beispiel)



Zu Abb. Kap. 5. (III c): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte Kardiomyozyten mit Pseudopodien. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

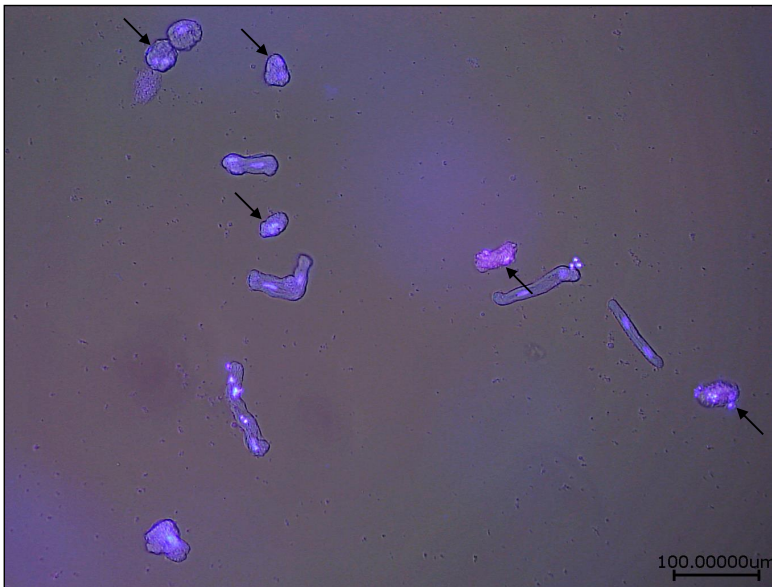
Abb. Kap. 5. (IV a + b + c): Kardiomyozyten an Tag 2 in Kultur nach Anfärbung mit HOECHST/Propidiumiodid

Abb. Kap. 5. (IV a): 1 μ M Angiotensin II



Zu Abb. Kap. 5. (IV a): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, stäbchenförmige Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

Abb. Kap. 5. (IV b): 1 μ M Phenylephrin



Zu Abb. Kap. 5. (IV b): Schwarzer Pfeil nach unten zeigend markiert exemplarisch intakte, abgerundete Kardiomyozyten. Schwarzer Pfeil nach oben zeigend markiert exemplarisch abgestorbene Kardiomyozyten.

5.2 Zusammenfassung

Adulte ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten lassen sich isolieren und unter FCS-haltigen Bedingungen über einen längeren Zeitraum kultivieren. Hierbei lässt sich ein Anpassungsprozess beobachten, der mit der Degradation des kontraktilen Apparats und dem morphologischen Abrunden der Kardiomyozyten beginnt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Reorganisation des kontraktilen Apparats und zur Ausbildung von Pseudopodien. Die vorliegende Untersuchung widmet sich den ersten 48 Stunden in Kultur, die durch das Abrunden der Kardiomyozyten gekennzeichnet sind. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen aktiven Vorgang handelt, der als notwendiger initialer Schritt im Ablauf verstanden werden kann. FCS kann als Trigger des Anpassungsprozesses durch die Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren durch Phenylephrin ersetzt werden. Die Stimulation α -1-adrenerger Rezeptoren resultiert *in vitro* als auch *in vivo* in kardiomyozytärer Hypertrophie. Dies bekräftigt die Vorstellung, dass isolierte adulte Kardiomyozyten ein geeignetes Modell darstellen, die kardiomyozytäre hypertrophe Adaptation unter Bedingungen pathologisch gesteigerter hämodynamischer Belastung zu untersuchen, die durch erhöhte Katecholaminspiegel gekennzeichnet sind. Zudem unterstreicht es die Annahme, dass das kardiomyozytäre Remodelling als ein komplexer Vorgang der De- und anschließenden Redifferenzierung zu verstehen ist. Die Degradation des kontraktilen Apparats bedarf der Aktivierung des Proteasoms über die verstärkte Synthese der induzierbaren Untereinheit LMP2. Dies konnte bei spontan hypertensiven Ratten *in vivo* bestätigt werden. Die verstärkte Expression von LMP2 fällt hier zeitlich mit der adaptiven Phase der Hypertrophie bei kompensierter Herzleistung zusammen. Der Aktivierung der p38-MAPK kommt eine große Bedeutung hinsichtlich der zugrunde liegenden Signalweiterleitung zu. Ihre Inhibition mittels SB-202190 konnte sowohl die verstärkte Synthese von LMP2 als auch den Prozentsatz an abgerundeten Kardiomyozyten signifikant reduzieren. Schließlich konnte gezeigt werden, dass einkernige Kardiomyozyten anpassungsfähiger sind als mehrkernige Kardiomyozyten. Mehrkernige Kardiomyozyten gehen aus einkernigen Kardiomyozyten hervor und scheinen darüber einen Teil ihres Adaptationsvermögens eingebüßt zu haben. Das adaptive Potential eines Herzens steckt demnach in seinen einkernigen Kardiomyozyten. Mit zunehmendem Alter sinkt das kardiomyozytäre Anpassungsvermögen.

5.3 Summary

Adult ventricular cardiomyocytes can be isolated and cultured over a longer period of time on condition that the culture media contains fetal calf serum (FCS). In this case a process of adaptation can be observed, that starts with the degradation of the cardiomyocytes contractile apparatus accompanied by the rounding of the former rod-shaped cells. With the passage of some days a reorganization of the contractile apparatus and the formation of pseudopodia-like structures can be witnessed. This study focuses on the first 48 hours of culture and the cardiomyocytes rounding. We could identify the rounding as an active process and an inevitably first step in the adaptation. Phenylephrin as an α -1-adrenergic receptor agonist can replace FCS as its trigger. Stimulation of α -1-adrenergic receptors leads to cardiomyocytes hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. Therefore, isolated adult cardiomyocytes seem to be fitting to study cardiomyocytes hypertrophic adaptation to pathologically elevated hemodynamic stress *in vivo*, which is accompanied by elevated catecholamine levels. Under this assumption the hypertrophic adaptation can be understood as a sequence consisting of initial dedifferentiation and subsequent redifferentiation. Degradation of the contractile apparatus requires the induction of proteasomal subunit low molecular weight protein (LMP) 2. This finding could be confirmed in spontaneously hypertensive rats *in vivo*. The induction of LMP2 coincides with the adaptive phase of hypertrophy with preserved cardiac performance. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) is of importance for the underlying signaling pathway. p38 pathway inhibitor SB-202190 could significantly reduce the induction of LMP2 as well as cardiomyocytes rounding. Finally, we could show that mono-nucleated cardiomyocytes have a greater adaptive capacity than bi-nucleated cardiomyocytes. Bi-nucleated cardiomyocytes originate from mono-nucleated cardiomyocytes and appear to have lost part of their adaptive capacity thereby. One's cardiac adaptive potential therefore lies within its mono-nucleated cardiomyocytes. With age cardiomyocytes capacity to adapt decreases.

5.4 Literaturverzeichnis

- Aouadi, M. et al. (2006) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activity Commits Embryonic Stem Cells to Either Neurogenesis or Cardiomyogenesis. *Stem Cells* 24: 1399-1406
- Behr, T. et al. (2001) Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation* 104 (11): 1292-1298
- Bergmann, O. et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98-102
- Bergmann, O. et al. (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the adult heart. *Cell* 161: 1566-1575
- Bishop, S.P., Drummond, J.L. (1979) Surface morphology and cell size measurement of isolated rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 11: 423-430
- Böhm, M. et al. (1988) Alpha-adrenoceptors and alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in failing human myocardium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 12: 357-364
- Bristow, M.R. et al. (1982) Decreased Catecholamine Sensitivity and β -Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts. *The New England Journal of Medicine* 307: 205-211
- Brodsky, W.Y., Tsirekidze, N.N. und Arefyeva, A.M. (1985) Mitotic-cyclic and Cycle-independent Growth of Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 17: 445-455
- Bugaisky, L.B. und Zak, R. (1989) Differentiation of adult rat cardiac myocytes in cell culture. *Circulation Research* 64: 493-500
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162 (1): 156-159
- Clubb, F. und Bishop, S.B. (1984) Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Laboratory Investigation* 50: 571-577
- Cotecchia, S. et al. (2015) The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cellular Signalling* 27: 1984-1993

- Dahlmann, B. et al. (2000) Different Proteasome Subtypes in a Single Tissue Exhibit Different Enzymatic Properties. *Journal of Molecular Biology* 303: 643-653
- Davis, B.R. (2000) Major Cardiovascular Events in Hypertensive Patients Randomized to Doxazosin vs Chlorthalidone. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 283: 1967-1975
- Decker, M.L. et al. (1991) Morphometric evaluation of the contractile apparatus in primary cultures of rabbit cardiac myocytes. *Circulation Research* 69: 86-94
- Depre et al. (2006) Activation of the Cardiac Proteasome During Pressure Overload Promotes Ventricular Hypertrophy. *Circulation* 114: 1821-1828
- Drews, O. et al. (2007 a) Mammalian Proteasome Subpopulations with Distinct Molecular Compositions and Proteolytic Activities. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 2021-2031
- Drews, O., Zong, C. und Ping, P. (2007 b) Exploring proteasome complexes by proteomic approaches. *Proteomics* 7: 1047-1058
- Drews, O. et al. (2010) Differential Regulation of Proteasome Function in Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* 107: 1094-1101
- Drews, O. (2016) Protein Degradation in Cardiomyocytes: Target Proteins and clinical Consequences. In: *Cardiomyocytes – active players in cardiac disease*, Editor: K.-D. Schlüter. Schweiz: Springer International Publishing; Seiten 191-222
- Driesen, R.B. et al. (2009) Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13: 896-908
- Eble, D.M. et al. (1999) Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell Tissue Research* 296: 541-548
- Ebstein, F. et al. (2012) Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 2543-2558
- Eppenberger, M.E. et al. (1988) Immunocytochemical Analysis of the Regeneration of Myofibrils in Long-Term Cultures of Adult Cardiomyocytes of the Rat. *Developmental Biology* 130: 1-15
- Eppenberger, M.E. et al. (1990) Reexpression of α -Smooth Muscle Actin Isoform in Cultured Adult Rat Cardiomyocytes. *Developmental Biology* 139: 269-278
- Fielitz J. et al. (2007) Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 2486-2495

Gaczynska, M. et al. (1994) Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91 (Biochemistry): 9213-9217

Gilda, J. und Gomes, A. (2017) Proteasome dysfunction in cardiomyopathies. *The Journal of Physiology* 595 (12): 4051-4071

Gomes, A.V. et al. (2006) Mapping the Murine Cardiac 26S Proteasome Complexes. *Circulation Research* 99: 362-371

González-Rosa et al. (2018) Myocardial polyploidization creates a barrier to heart regeneration in zebrafish. *Developmental Cell* 44 (4): 433-446

Groll, M. et al. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in the subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96 (Colloquium Paper): 10976-10983

Hamawaki, M. et al. (1998) Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT_{1A} receptors. *American Journal of Physiology* 274: H868-H873

Haq, S. et al. (2001) Differential Activation of Signal Transduction Pathways in Human Hearts With Hypertrophy Versus Advanced Heart Failure. *Circulation* 103: 670-677

Heallen, T. et al. (2019) Stimulating Cardiogenesis as a treatment for heart failure. *Circulation Research* 124 (11): 1647-1657

Hernández-Torres, F. et al. (2007) A role for p38a mitogen-activated protein kinase in embryonic cardiac differentiation. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 582: 1025-1031

Huang et al. (2012) Mononucleated and binucleated cardiomyocytes in left atrium and pulmonary vein have different electric activity and calcium dynamics. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 108 (1-2): 64-73

Huber, E.M. et al. (2012) Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148: 727-738

Izumo, S., Nadal-Ginard, B. und Mahdavi, V. (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85 (Biochemistry): 339-343

Jacobson, L. und Piper, H.M. (1986) Review Article. Cell Cultures of Adult Cardiomyocytes as Models of the Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 18: 661-678

- Jensen, B.C. et al. (2009 a) The Alpha-1D is the Predominant Alpha-1-Receptor Subtype in Human Epicardial Coronary Arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 54: 1137-1145
- Jensen, B.C. et al. (2009 b) Alpha-1-Adrenergic Receptor Subtypes in Non-Failing and Failing Human Myocardium. *Circulation: Heart Failure* 2: 654-663
- Jensen, B.C. et al. (2014) Alpha-1-Adrenergic Receptors in Heart Failure: The Adaptive Arm of the Cardiac Response to Chronic Catecholamine Stimulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 63: 291-301
- Jopling et al. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464 (7288): 606-609
- Kabakov, A.E. und Gabai, V.L. (2018) Cell Death and Survival Assays. In: Chaperones – Methods and Protocols, Editor: S.K. Calderwood und T.L. Prince. Vereinigte Staaten: Springer Science + Business Media; Seiten 107-127
- Katzberg, A.A., Farmer, B.B. und Harris, R.A. (1977) The Predominance of Binucleation in Isolated Rat Heart Cardiomyocytes. *Journal of Anatomy* 149: 489-500
- Kimura et al. (2015) Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature* 523: 226-268
- Kostin et al. (2003) Myocytes Die by multiple Mechanisms in Failing Human Hearts. *Circulation Research* 92: 715-724
- Kubin, T. et al. (2011) Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell stem cell* 9: 420-432
- Kubista, M. et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3): 95-125
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 81: 807-869
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 225: 680-685
- Leri, A., Kajstura, J. und Anversa, P. (2011) Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Trends in Cardiovascular Medicine* 21: 52-58
- Leri, A. et al. (2015) Origin of Cardiomyocytes in the Adult Heart. *Circulation Research* 116: 150-166

- Levy, D. et al. (1992) Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics: the Framingham Heart Study. *Clinical and Experimental Hypertension* 14: 85-97
- Li, F. et al. (1996) Rapid Transition of cardiac myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy during Postnatal Development. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28: 1737-1746
- Li, N. et al. (2015) Activation of the cardiac proteasome promotes angiotensin II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 79: 303-314
- Liang, Q. und Molckentin, J.D. (2003) Redefining the roles of p38 und JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35: 1385-1394
- Livak, K. und T.D. Schmittgen (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25 (4): 402-408
- Lloyd-Jones, D.M. et al. (2002) Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure. The Framingham Heart Study. *Circulation* 106: 3068-3072
- Lorell, B.H. und Carabello, B.A. (2000) Left Ventricular Hypertrophy. Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation* 102: 470-479
- LoRusso, S.M. et al. (1997) Premyofibrils in Spreading Adult Cardiomyocytes in Tissue culture: Evidence for Reexpression of the Embryonic Program for Myofibrillogenesis in Adult Cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 37: 183-198
- Marber, M.S., Rose, A.B. und Wang, Y. (2011) The p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway-A Potential Target for Intervention in Infarction, Hypertrophy and Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51: 485-490
- Mehta, P.K. und Griendling, K.K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 292: C82-C97
- Monace, J.J. und McDevitt, H.O. (1982) Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79 (Immunology): 3001-3005
- Morgan, H.E. und Baker, K.M. (1991) Cardiac Hypertrophy. Mechanical, Neural, and Endocrine Dependence. *Circulation* 83: 13-25
- Mozaffarian, D. et al. (2016) Heart disease and Stroke Statistics – 2016 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* 133(4): e38-360

- Müller, S. et al. Die konfokale Laser Mikroskopie. Optische Abbildung und elektronische Grundlagen. ZEISS, 45-0029 d/09.03: 3
- Nippert, F. et al. (2016) The Effects of Swiprosin-1 on the Formation of Pseudopodia-Like Structures and beta-Adrenoceptor Coupling in Cultured Adult Rat Ventricular Myocytes. PLoS ONE 11(12):e0167655
- Nippert, F., Schreckenberger, R. und Schlüter, K.D. (2017) Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes. Journal of Visualized Experiments October: 128
- Nishida, K. et al. (2004) p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Plays a Critical Role in Cardiomyocyte Survival but Not in Cardiac Hypertrophic Growth in Response to Pressure Overload. Molecular and Cellular Biology December: 10611-10620
- Olivetti, G. et al. (1996) Aging, Cardiac Hypertrophy and Ischemic Cardiomyopathy Do Not Affect the Proportion of Mononucleated Myocytes in the Human Heart. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28: 1463-1477
- Pagan, J. et al. (2013) Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Heart. Circulation Research 112: 1046-1058
- Patterson, M. et al (2017) Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. Nature Genetics 49 (9): 1346-1353
- Piper, H.M. (1985) Isolierte adulte Herzmuskelzellen als Myokardmodell. Eigenschaften und Anwendungen. Stuttgart; New York; Thieme; Seiten 14-26
- Pöling, J. et al. (2014) Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor- β prevents inflammatory heart failure. Basic Research in Cardiology 109: 396
- Pönicke, K. et al. (2001) Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only α_{1A} -adrenoceptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 364: 444-453
- Razeghi et al. (2006) Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. Biochemical and Biophysical Research Communications 342: 361-364
- Ren, X. et al. (2007) Activation of p38/MEF2C pathway by all-trans retinoic acid in cardiac myoblasts. Life Sciences 81: 89-96
- Reudelhuber, T.L., Bernstein, K.E. und Delafontaine, P. (2007) Is Angiotensin II a Direct Mediator of Left Ventricular Hypertrophy? Hypertension 49: 1196-1201
- Ritchie, R.H., Marsh, J.D. und Schiebinger R.J. (1999) Bradykinin-stimulated protein synthesis by myocytes is dependent on the MAP kinase pathway and p70^{S6K}. American Journal of Physiology 276: H1393-H1398

- Rivett, A.J. (1989) The Multicatalytic Proteinase. Multiple proteolytic activities. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 12215-12219
- Rock, K.L. et al. (1994) Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class I Molecules. *Cell* 78: 761-771
- Rose, A.B., Force, T. und Wang, Y. (2010) Mitogen-activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Herat-Breaking Tale. *Physiological Reviews* 90: 1507-1546
- Ruf, S., Piper, H.M. und Schlüter, K.-D. (2002) Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 443: 482-490
- Schlüter, K.-D. (1998) Untersuchungen zur Regulation der Proteinsynthese adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch hormonelle und neurohumorale Faktoren. Achen; Shaker Verlag; Seiten 3-4
- Schlüter, K.-D. (2016 a) Growth regulation of Cardiomyocytes: Control of Cell Size and its Role in Cardiac Hypertrophy. In: *Cardiomyocytes – active players in cardiac disease*, Editor: K.-D. Schlüter. Schweiz: Springer International Publishing; Seiten 167-189
- Schlüter, K.-D. (2016 b) Ways to Study the Biology of Cardiomyocytes. In: *Cardiomyocytes – active players in cardiac disease*, Editor: K.-D. Schlüter. Schweiz: Springer International Publishing; Seiten 3-24
- Schlüter, K.-D. und Wenzel, S. (2008) Angiotensin II: A hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. *Pharmacology & Therapeutics* 119: 311-325
- Schlüter K.-D. et al. (2017) Induction of Imp2 is required in the early phase of cardiac remodeling. *Clinical Research in Cardiology* 106: Suppl 1
- Schreckenber, R. et al. (2017) Effects of 6-months' Exercise on Cardiac Function, Structure and Metabolism in Female Hypertensive Rats – The Decisive Role of Lysyl Oxidase and Collagen III. *Frontiers in Physiology* 8: 556
- Schwarzfeld, T.A. und Jacobson, S.L. (1981) Isolation and Development in Cell Culture of Myocardial Cells of the Adult Rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13: 563-575
- Sheppard, C.J.R. und A. Choudhury (1977) Image Formation in the Scanning Microscope. *Optica Acta: International Journal of Optics* 24 (10): 1051-1073

Su, H. und Wang, X. (2010) The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovascular Research* 85: 253-262

Szalay et al. (2006) Ongoing Coxsackievirus Myocarditis Is Associated with Increased Formation and Activity of Myocardial Immunoproteasomes. *American Journal of Pathology* 168: 1542-1552

Szibor, M. et al. (2014) Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cellular and molecular life sciences* 71: 1907-1916

Taegtmeier, H., Sen, S. und Vela, D. (2010) Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1188: 191-198

Tham, K.Y. et al. (2015) Review Article. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology* 89: 1401-1438

Thrower, J.S. et al. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 19: 94-102

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (9): 4350-4355

Tsukamoto et al. (2006) Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 1125-1133

Unger, T. et al. (1996) Angiotensin receptors. *Journal of Hypertension - Supplement*: 14: S95-S103

Unno, M. et al. (2002) The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* 10: 609-618

Volz, A. et al. (1991) Longevity of Adult Ventricular Rat Heart Muscle Cells in Serum-free Primary Culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 23: 161-173

Wenzel, S. et al. (2005) p38 MAP-kinase in cultured adult ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling. *The European Journal of Heart Failure* 7: 453-460

Willis, M. und Patterson, C. (2013) Proteotoxicity und Cardiac Dysfunction: Alzheimer's disease of the Heart? *The New England Journal of Medicine* 368: 455-464

Wu, J. et al. (2010) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls a Switch Between Cardiomyocyte and Neuronal Commitment of Murine Embryonic Stem Cells by

Activating Myocyte Enhancer Factor 2C-Dependent Bone Morphogenetic Protein 2 Transcription. *Stem Cells and Development* 19 (11): 1723-1734

Yokota, T. und Wang, Y. (2016) p38 MAP kinases in the heart. *Gene* 575: 369-376

ZEISS (2002) LSM 510 and LSM 510 Meta Laser Scanning Microscopes. Operating Manual. Release 3.2. ZEISS, B 45-0008 e 10/02: 3-3

Zierhut, W. und Zimmer, H.-G. (1989) Significance of Myocardial α - and β -Adrenoceptors in Catecholamine-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* 65: 1417-1425

Zu, L. et al. (2010) Evidence for a Role of Immunoproteasomes in Regulating Cardiac Muscle Mass in Diabetic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (1): 5-15

5.5 Publikationsverzeichnis

Petersen, A., Kutsche, H. S., Nippert, F., Schreckenberger, R., Schulz, R., Schlüter, K.-D. (2020) Induction of Proteasome Subunit Low Molecular Weight Protein (LMP)-2 Is Required to Induce Active Remodeling in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Medical Science* 8(2):21. doi: 10.3390/medsci8020021

Schlüter, K.-D., Hess, A., Nippert, F., Schreckenberger, R. (2017) Induction of *Imp2* is required in the early phase of cardiac remodeling. *Clinical Research in Cardiology* 106: Suppl 1. doi: 10.1007/s00392-017-1105-2

Nippert, F., Schreckenberger, R., Hess, A., Weber, M. und Schlüter, K.-D. (2016) The Effects of Swiprosin-1 on the Formation of Pseudopodia-Like Structures and beta-Adrenoceptor Coupling in Cultured Adult Rat Ventricular Myocytes. *PLoS ONE* 11(12):e0167655. doi: 10.1371/journal.pone.0167655

5.6 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

A. Petersen

Berlin, Juli 2019

5.7 *Danksagung*

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schlüter, allen Mitarbeitern/-innen seiner Arbeitsgruppe und meinen Mitdoktoranden/-innen am Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

5.8 *Lebenslauf*

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6900-1



9 783835 196900 1