

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

Direktor: Herr Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

Betreuer: PD Dr. K.-D. Schlüter

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen im Fachbereich vertreten
durch Herrn Prof. Dr. M. Diener

**Signaltransduktion der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der
TGF β -Expression in adulten ventrikulären Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sibylle Wenzel
Tierärztin aus Schöffengrund

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

2. Berichterstatter Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie	3
1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie	5
1.3 Rolle von Angiotensin II für die Myokardhypertrophie	6
1.4 Signalkaskade von Angiotensin II zur gesteigerten TGF β -Expression	7
1.5 Aufgabenstellung	11
2 Material	12
2.1 Chemikalien	12
2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien	12
2.1.2 Spezielle Chemikalien	14
2.1.2.1. Reverse Transkription	14
2.1.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	14
2.1.2.3 Fragmentisolierung	14
2.2 Geräte und Laborbedarf	15
2.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	15
2.2.1.1 Zellkultur	15
2.2.1.2 DNA-Gelelektrophorese	15
2.2.1.3 RT-PCR	15
2.2.1.4 SDS-Gelelektrophorese	16
2.2.1.5 Sonstige Geräte	16
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	17

2.3	Auswertungs-Software	17
3	Methoden	18
3.1	Isolierung von Herzmuskelzellen	18
3.1.1	Versuchstiere	18
3.1.2	Präparation isolierter Kardiomyozyten aus dem Rattenherz	18
3.1.3	Präparation und Behandlung isolierter Endothelzellen aus dem Rattenherz	20
3.2	Zellkultur	21
3.2.1	Vor- und Ausplattieren	21
3.2.2	Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten adulter Ratten	22
3.2.3	Behandlung der Zellen und Zellernte	22
3.2.4	Transfektion der Kardiomyozyten mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden	23
3.3	Nachweis der Expression durch RT-PCR	24
3.3.1	Präparative RNA-Isolierung	24
3.3.2	Bestimmung des RNA-Gehaltes	25
3.3.3	Reverse Transkription	26
3.3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	26
3.3.5	DNA-Gelelektrophorese	29
3.4	Quantifizierung der RT-PCR	30
3.4.1	Fragmentisolierung	30
3.4.2	Quantifizierung der semiquantitativen RT-PCR	31
3.5	Protein-Gelelektrophoretische Methoden	33
3.5.1	Probenvorbereitung	33
3.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.5.3	Western-Blot-Verfahren	36
3.5.4	Immunologischer Nachweis von p38 MAP-Kinase und p38p MAP-Kinase	37

3.6	Proteinbestimmung	39
3.6.1	Probenvorbereitung	39
3.6.2	Bestimmung des Proteingehaltes	39
3.7	NADH/NADPH-Oxidations-Assay	40
3.7.1	Probenvorbereitung	40
3.7.2	Oxidation von NADH/NADPH	40
3.8	AP1-Binding-Assay	41
3.8.1	Kernextraktion	41
3.8.2	Radioaktive 5'-Endmarkierung	42
3.8.3	G50-Sephadex-Schleudersäule	43
3.8.4	Quantitative Bestimmung der Inkorporation von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	44
3.8.5	Proteinbestimmung	44
3.8.6	Spezifische Bindung von Proteinen an Oligonukleotide	44
3.8.7	Retardation-Gele	45
3.9	Statistik	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Einfluß von Angiotensin II auf die ventrikuläre TGFβ mRNA-Expression in vitro	47
4.1.1	Konzentrationsabhängige Steigerung der ventrikulären TGF β mRNA-Expression durch Angiotensin II	47
4.1.2	Translations- aber nicht transkriptionsabhängige Steigerung der ventrikulären TGF β mRNA-Expression durch Angiotensin II	48
4.2	Rolle des Transkriptionsfaktors AP1 für die TGFβ mRNA-Expression	51
4.2.1	Angiotensin II-abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors AP1	51
4.2.2	„Decoy“-Transfektion als spezifische Methode der Hemmung des Transkriptionsfaktors AP1	52
4.2.3	Hemmung der Angiotensin II-abhängigen Steigerung der	54

	c-fos mRNA-Expression und deren Abhängigkeit von einer Proteinkinase C-Aktivierung	
4.2.4	Transfektion der Zellkultur mit c-fos Sense- und Antisense- Oligonukleotiden und anschließender Kontrolle der TGF β mRNA-Expression	55
4.3	Rolle der p38 MAP-Kinase für die TGFβ mRNA-Expression	57
4.3.1	Angiotensin II-abhängige Induktion der p38 MAP-Kinase	57
4.3.2	Proteinkinase C-abhängige Induktion der p38 MAP-Kinase durch Angiotensin II	58
4.3.3	p38 MAP-Kinase-abhängige Steigerung der TGF β mRNA- Expression	60
4.4	Kreuzreaktivität von Angiotensin II mit EGF-Rezeptoren und Tyrosinkinasen	61
4.5	Einfluß von Radikalfängern auf die Angiotensin II-vermittelte p38 MAP-Kinase-Aktivierung bzw. Steigerung der TGFβ mRNA- Expression	63
4.5.1	Beeinflussung der Angiotensin II-abhängigen p38 MAP-Kinase-Aktivierung durch N-Acetylcystein und Vitamin C	63
4.5.2	Bedeutung von Vitamin C und N-Acetylcystein für die Steigerung der TGF β mRNA-Expression nach Angiotensin II-Induktion	64
4.6	Beteiligung einer kardiomyozytären NAD(P)H-Oxidase bei der Aktivierung der p38 MAP-Kinase	66
4.6.1	Einfluß von Diphenylium Iodid, phox22 Sense und Antisense und mox Sense und Antisense auf die Angiotensin II-vermittelte Aktivierung der p38 MAP-Kinase	66
4.6.2	Oxidation von NADH und NADPH	69
4.6.3	Expression von phox22 in ventrikulären Kardiomyozyten	71

4.7	Kreuzreaktivität von Angiotensin II-vermittelten Signalschritten und der NAD(P)H-Oxidase in Kardiomyozyten	72
4.7.1	Stellung der NAD(P)H-Oxidase in der durch Angiotensin II induzierten Enzymkaskade	72
4.7.2	Rolle von phox22 für den NADH-Verbrauch	72
5	Diskussion	74
5.1	Bedeutung des Transkriptionskomplexes AP1 für die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGFβ mRNA-Expression	75
5.2	Rolle der p38 MAP-Kinase	77
5.3	Rolle Redox-sensitiver Signaltransduktionsschritte	78
5.4	Reihenfolge der einzelnen Signalschritte in diesem Signaltransduktionsweg	82
5.5	Schlußfolgerung	83
6	Zusammenfassung	84
7	Summary	85
8	Literaturverzeichnis	86
9	Danksagung	94

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
(³² P)γ-ATP	(³² P)γ-Adenosintriphosphat
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammonium-Persulfat
aqua bidest	aqua bidestillata
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	copy DNA
cpm	Zählvorgänge pro Minute (counts per minute)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPI	Diphenylium Iodid
dpm	Zerfälle pro Minute (dots per minute)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
IE	internationale Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Diphosphatnukleotid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium

NCS	neonatales Kälberserum
Oligo-dT ₍₁₅₎	Oligo-desoxy-Thymidin (15 Nukleotide)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR [®]	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI3	Phosphatidylinositol-3
PKC	Proteinkinase C
PSMF	Phenylmethylsulfonylfluoride
RT	Reverse Transkription
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor β
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie

Bei der myokardialen Hypertrophie handelt es sich um eine Verdickung des Herzmuskels, hervorgerufen entweder durch neurohumorale Faktoren, durch mechanische Belastung im Sinne einer chronischen Erhöhung der Druck-Volumen-Arbeit oder durch das Zusammenspiel beider Faktoren. Dabei findet eine Zunahme des Zellvolumens der Herzmuskelzellen bei gleichbleibender Zellzahl statt. Hierbei ist das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteindegradation zugunsten der Synthese verschoben.

Bei Erhöhung der mechanischen Belastung des Herzens kommt es zu einer Vergrößerung der Herzmuskelzellen, die zunächst noch weitgehend reversibel ist. Das Zellwachstum kann als kompensatorische Antwort auf den Anstieg der Wandspannung verstanden werden, da diese durch eine Verdickung der Kammerwand im Normbereich gehalten werden kann. Nach Überschreiten des kritischen Herzgewichtes verliert aber die Hypertrophie ihren adaptiven Charakter. Die Eigenversorgung des Herzens kann dann nicht mehr gewährleistet werden und es kommt zu einer strukturellen Schädigung. In der Folge dilatieren die Herzkammern bei gleichzeitiger Abnahme der Wanddicke, aber fortschreitender Zunahme von Herzgewicht und Herzgröße. Dies führt zu einer funktionellen Dekompensation, da die Wandspannung nun zunimmt und das Herz nicht mehr imstande ist, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen. Die Blutversorgung der peripheren Organe ist vermindert. Die Myokardhypertrophie gilt als Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz und erhöhte Morbidität und Mortalität (Levy et al., 1990).

In vivo ist die Entwicklung einer Herzhypertrophie häufig von einer Aktivierung des Renin–Angiotensin–Systems, einer erhöhten Sympathikuseinwirkung und einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren gekennzeichnet. Als bedeutender Wachstumsfaktor ist der Transforming Growth Faktor β (TGF β) zu nennen, welcher im hypertrophierten Myokard im Übergang von der kompensierten zur

dekompensierten Form der Myokardhypertrophie vermehrt exprimiert wird (Villarreal et al., 1992; Boluyt et al., 1994). Außerdem ist TGF β zusätzlich in der Lage, mit anderen Mediatorsystemen, die ebenfalls eine Rolle bei der Herzhypertrophie spielen, direkt zu interagieren. Verschiedene in-vitro-Studien haben gezeigt, daß TGF β den β -adrenergen Effekt von Adrenalin und Noradrenalin dahingehend reguliert, daß es für eine Ankopplung β -adrenerger Rezeptoren an Signaltransduktionsschritte sorgt, die kausal in die Steigerung der Proteinbiosynthese eingebunden sind. Mit anderen Worten, TGF β induziert eine cAMP-abhängige Aktivierung der PI 3-Kinase (Schluter et al., 1995; 1999). Eine mögliche Beeinflussung der Rezeptordichte auf den entsprechenden Zielzellen durch TGF β wird diskutiert (Iizuka et al., 1994; Kimura et al., 1999; Nogami et al., 1994). Aus diesen Gründen liegt die Vermutung nahe, daß TGF β in vivo die hypertrophieinduzierende Wirkung adrenerger Stimulation beim Übergang von Hypertrophie zur Insuffizienz beeinflusst.

Abb.: 1.1

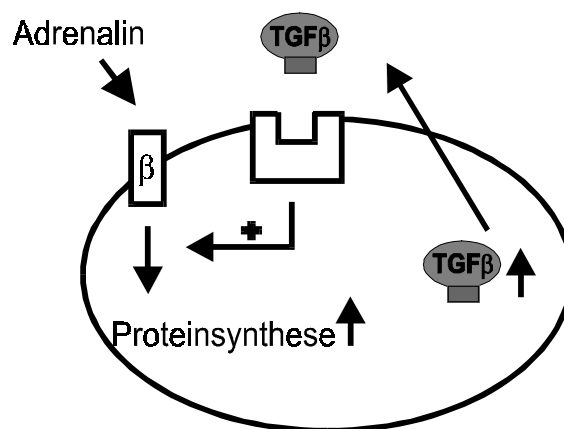


Abb. 1.1: Dargestellt ist die Vorstellung über den durch TGF β beeinflussten β -adrenerg-induzierten Signaltransduktionsweg. Hierbei wird das Zytokin TGF β in der Zelle vermehrt synthetisiert, um dann autokrin an der Zelle selbst positiv auf die β -adrenerge Stimulation zu wirken. Letztlich wird durch diesen Mechanismus die Proteinbiosynthese – charakteristisch für den Zustand der Herzhypertrophie – gesteigert.

Am Modell neonataler Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, daß eine passive Dehnung von Kardiomyozyten Charakteristika einer myokardialen Hypertrophie induzieren kann (Komuro et al., 1990; 1991). Dieser mechanisch-induzierte Wachstumsstimulus wird durch die Freisetzung von Angiotensin II vermittelt (Sadoshima et al., 1993). Angiotensin II soll in diesem Modell über einen autokrinen Mechanismus, an dem auch Endothelin-1 beteiligt ist, hypertrophieinduzierend wirken (Yamazaki et al., 1996). Die Entstehung einer Myokardhypertrophie durch hämodynamische Faktoren könnte demnach durch lokale neurohumorale Faktoren unterstützt sein.

1.2 Zellkulturmodell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie

Da es in vivo schwierig ist, neurohumorale von mechanischen Effekten abzugrenzen, wurden in der vorliegenden Studie die Vorteile des Zellkulturmodells genutzt. Im Gegensatz zu in-vivo-Methoden ist man hier in der Lage, mit definierten Medien und genau bekannten Wirkstoffkonzentrationen, neurohumorale Faktoren unabhängig von der Hämodynamik zu untersuchen.

Da die myokardiale Hypertrophie klinisch vorwiegend im Erwachsenenalter auftritt, ist es sinnvoll, im Zellkulturmodell terminal differenzierte, adulte Herzmuskelzellen zu verwenden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf Kardiomyozyten adulter Ratten zurückgegriffen. Verglichen mit neonatalen Kardiomyozyten, deren Wachstumsregulation bereits gut erforscht ist, sind adulte Kardiomyozyten bisher nur wenig als experimentelles Modell genutzt worden.

1.3 Rolle von Angiotensin II für die Myokardhypertrophie

Das Renin–Angiotensin–System spielt eine wichtige Rolle bei der Hypertrophieentstehung (Lee et al., 1993), da sowohl ACE–Hemmer als auch AT₁–Rezeptorblocker die Herzinsuffizienz und auch die Schwere der Hypertrophie in vivo günstig beeinflussen. Angiotensin II, die aktive Komponente des Renin–Angiotensin–Systems, bewirkt jedoch keine direkte Steigerung der Proteinsynthese in adulten Herzmuskelzellen; somit kann diesem Hormon in ausdifferenzierten Kardiomyozyten kein direkter wachstumssteigernder Effekt zugesprochen werden (Wada et al., 1996). Lediglich an neonatalen Kardiomyozyten war ein solcher Effekt nachzuweisen (Sadoshima et al., 1993). In diesem undifferenzierten Zelltyp vermittelt Angiotensin II über eine Aktivierung der „early response kinase“ (ERK) das Zellwachstum (Yamazaki et al., 1999). An adulten Kardiomyozyten scheinen darüber hinausgehende wachstumsinduzierende Effekte, ausgelöst z.B. durch α -adrenerge Stimulation, nicht über die „early response kinase“ reguliert zu werden (Schluter et al., 2000). Es erscheint unwahrscheinlich, daß Angiotensin II eine direkte wachstumsinduzierende Wirkung in vivo besitzt. Andererseits ist bekannt, daß Angiotensin II die TGF β -Expression in verschiedenen Zelltypen aktiviert (Moriguchi et al., 1999). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, daß Angiotensin II einen indirekten Effekt über die kardiale Steigerung der TGF β -Expression auf die Entstehung einer Myokardhypertrophie ausübt. TGF β wiederum kann einen Einfluß auf andere wachstumsstimulierende Wege, so z.B. über eine β -adrenerge Stimulation oder über Neuropeptid Y, die ebenfalls eine Myokardhypertrophie verursachen, nehmen (Schlüter et al., 1995; Goldberg et al., 1998). Zusätzlich stellte sich die Frage, ob Angiotensin II eine Steigerung der ventrikulären TGF β -Expression auch in vivo bewirkt und ob diese Interaktion über einen spezifischen Angiotensin II-Rezeptor vermittelt wird oder ob sie einen unspezifischen Effekt auf sich ändernde Blutdruckwerte darstellt.

1.4 Signalkaskade von Angiotensin II zur gesteigerten TGF β -Expression

Aus den vorher genannten Gründen ist es von großem Interesse, molekulare Mechanismen der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β mRNA-Expression näher zu identifizieren, um die kardiale Biologie besser verstehen zu können.

Die Beteiligung verschiedener regulierender Transkriptionsfaktoren bezüglich unterschiedlicher Gen-Expressionen ist gut bekannt. Insbesondere ist auch bekannt, daß Angiotensin II die Expression von c-fos, einem Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1, steigert (Sadoshima et al., 1993; Kojima et al., 1994). Deswegen liegt die Vermutung nahe, daß Angiotensin II die TGF β -Expression über den Transkriptionsfaktor AP1 reguliert. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob Angiotensin II den Transkriptionsfaktor AP1 an adulten Kardiomyozyten aktiviert. Zur Spezifizierung dessen Bedeutung für die Angiotensin II-induzierte Steigerung der TGF β mRNA-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte, wurden diese Zellen mit doppelsträngigen Oligonukleotiden („decoys“), welche die komplementäre Sequenz zu der AP1-Bindungssequenz besitzen und somit dessen Wirkung durch Abfangen des Komplexes hemmen, transfiziert.

Abb.: 1.4.1

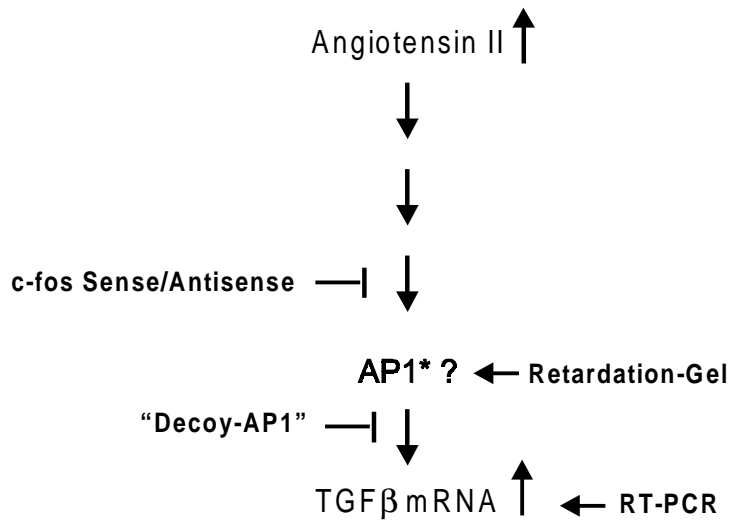


Abb. 1.4.1: Dargestellt ist der Transkriptionsfaktor AP1 (AP1) als möglicher Signalschritt bei der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGFβ mRNA-Expression in ventrikulären Herzmuskelzellen. Die Transfektion der Zellen mit „Decoy-AP1“ (decoy) bzw. c-fos Sense- und Antisense-Oligonukleotiden und das Anfertigen von Retardation-Gelen sind Möglichkeiten, die Beteiligung dieses Faktors zu untersuchen. Die Bestimmung der TGFβ mRNA-Expression erfolgte mittels RT-PCR.

Aufgrund verschiedener Veröffentlichungen bezüglich der Angiotensin II-vermittelten Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der „early response kinase“ (ERK) (Ushio-Fukai et al., 1998), lag die Vermutung nahe, daß eines der Mitglieder der „mitogen aktivierten Protein Kinasen“ in der Enzymkaskade auf dem Weg von Angiotensin II zu einer gesteigerten TGFβ-Expression in adulten ventrikulären Herzmuskelzellen eine große Rolle spielt. Verschiedene Arbeiten (Xi et al., 1999) zeigten zusätzlich, daß Angiotensin II c-fos, eine Komponente des Transkriptionsfaktors AP1, unabhängig von der ERK aktivieren kann. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob Angiotensin II eine Steigerung der TGFβ-Expression mittels der p38 MAP-Kinase bewirkt.

Abb.: 1.4.2

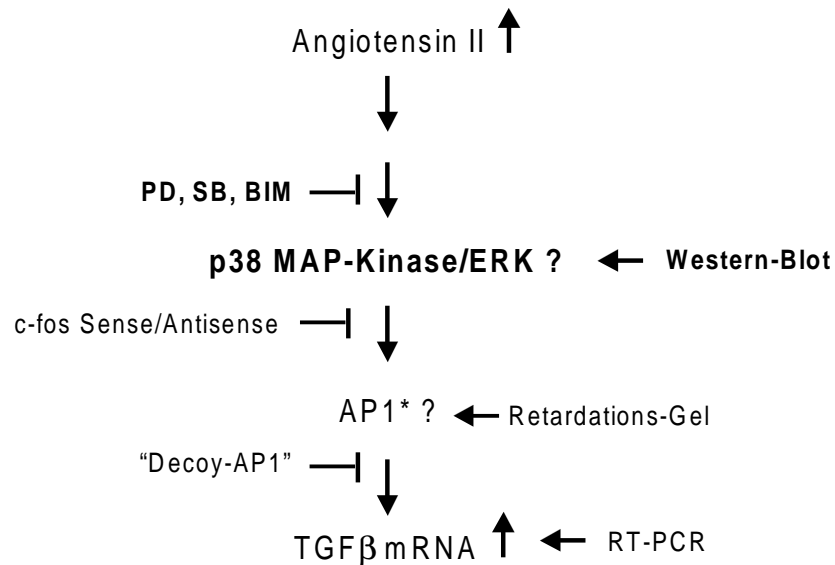


Abb. 1.4.2: Dargestellt sind neben dem Transkriptionsfaktor AP1 die p38 MAP-Kinase bzw. die „early response kinase“ (ERK) als mögliche weitere Signalschritte in der durch Angiotensin II ausgelösten Enzymkaskade. Eine Beteiligung dieser Kinasen kann mittels des Western-Blot Verfahrens untersucht werden. Als Inhibitor der ERK ist PD 98059 (PD) und als Inhibitor der p38 MAP-Kinase ist SB 202190 (SB) aufgeführt. Um die Proteinkinase C-Beteiligung an dieser Enzymkaskade zu untersuchen, ist Bisindolylmaleimid (BIM) als deren Inhibitor genannt.

Es ist beschrieben, daß die p38 MAP-Kinase in Glattmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei einem Angiotensin II-aktivierten, radikalabhängigen Signalweg einnimmt (Ushio-Fukai et al., 1998).

Dieser beschriebene Zusammenhang von p38 MAP-Kinase und Radikalabhängigkeit führt zu der Frage, inwieweit Angiotensin II in ventrikulären Herzmuskelzellen eine Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase bzw. die Steigerung der TGFβ mRNA-Expression über einen radikalabhängigen Zwischenschritt reguliert. Es ist bekannt, daß Angiotensin II in Glattmuskelzellen der Rattenaorta die

Expression von phox22, einer Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, steigert (Ushio-Fukai et al., 1996) und hierüber die Produktion von Superoxiden gesteigert wird. Inwieweit Angiotensin II über eine NAD(P)H-Oxidase diesen radikalabhängigen Zwischenschritt reguliert, wurde anhand von NAD(P)H-Oxidations-Assays untersucht.

Abb.: 1.4.3

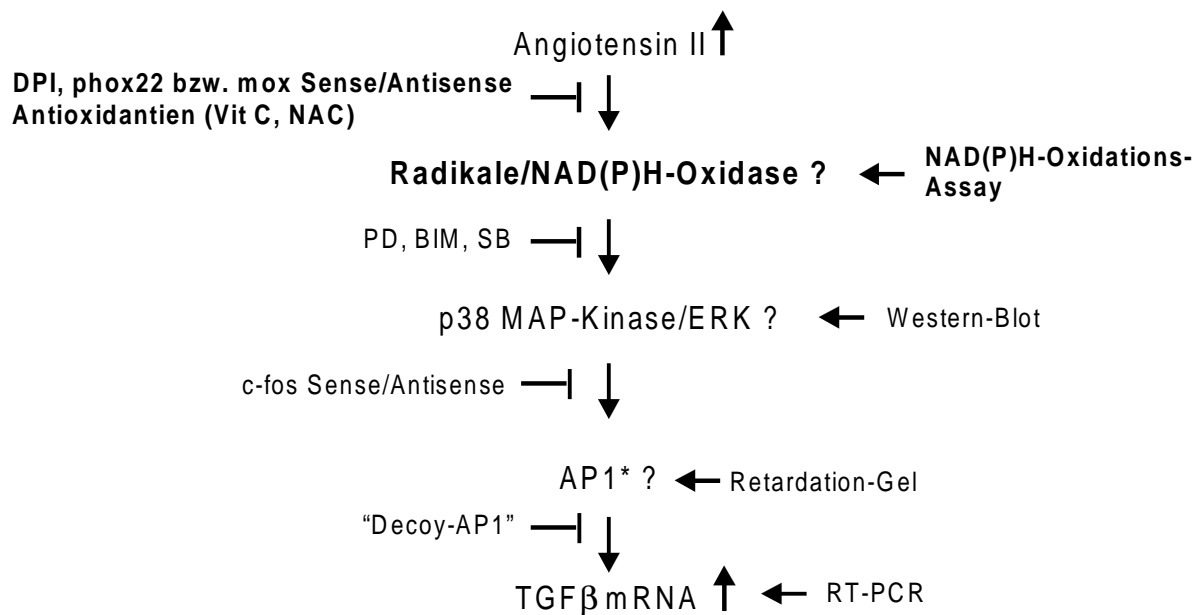


Abb. 1.4.3: Dargestellt ist als weiterer möglicher Signalschritt in der durch Angiotensin II vermittelten Enzymkaskade die Beteiligung eines radikalabhängigen Zwischenschrittes unter eventueller Mitwirkung einer NAD(P)H-Oxidase. Die Radikalabhängigkeit dieses Systems läßt sich durch Zugabe von Antioxidantien, so z. B. Vitamin C (Vit C) oder N-Acetylcystein (NAC) oder durch Hemmung von Flavoenzymen durch Diphenylium Iodid (DPI) überprüfen. Um im Speziellen eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase zu untersuchen, werden ventrikuläre Kardiomyozyten mit phox22 Sense- und Antisense-Oligonukleotiden transfiziert oder der NADH/NADPH-Verbrauch mittels NAD(P)H-Oxidations-Assay photometrisch bestimmt.

1.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie wurde auf zellulärer Ebene der Angiotensin II-induzierte Mechanismus der gesteigerten TGF β mRNA-Expression untersucht. Hierbei sollte geklärt werden:

1. inwiefern der Transkriptionsfaktor AP1 in der Enzymkaskade eine Rolle spielt.
2. ob ein Mitglied der MAP-Kinase-Familie, im speziellen die p38 MAP-Kinase, ursächlich an der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β -Expression beteiligt ist.
3. ob für dessen Induktion eine Radikalabhängigkeit nachgewiesen werden kann.
4. welche Interaktionen zwischen dem Angiotensin II-Rezeptor (AT1-Rezeptor), Radikalbildung und der p38 MAP-Kinase bestehen.
5. inwiefern diese Signalschritte Proteinkinase C-abhängig sind.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

$\gamma^{32}\text{P-ATP}$	Amersham, Braunschweig
Acrylamid	eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich
Actinomycin D	Calbiochem, Bad Soden
AG 1478	Calbiochem, Bad Soden
Albumin	Sigma, Deisenhofen
Angiotensin II	Bachem, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
Ascorbinsäure	Fluka, Neu-Ulm
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich
Bisindolymaleimid	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
Carnitin	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase; Typ CLS II, (322U/mg)	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Deisenhofen
Cytosin- β -Arabinfuranosid	Sigma, Deisenhofen
Diphenylalanin	Sigma, Deisenhofen
DPI	Calbiochem, Bad Soden
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	PAA Laboratories, Cölbe

Material

Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Genistein	Calbiochem, Bad Soden
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
MAP-Kinase Antikörper	Calbiochem, Bad Soden
Medium 199/Earl`s Salts	Gibco BRL, Eggenstein
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Mercaptopropanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Molekulargewichtsmarker (DNA-MSP I)	New England Biolabs, Beverly, USA
NADH	Calbiochem, Bad Soden
NADPH	Roche Diagnostics, Mannheim
NBT	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
PMA	Sigma RBI, Taufkirchen
RNA-Clean [®]	Hybaid-AGS, Heidelberg
SB 212090	Calbiochem, Bad Soden
SDS	Merck, Darmstadt
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
Taurin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Chemikalien

2.1.2.1 Reverse Transkription

Reverse Transkriptase (M-MLV)	Gibco, BRL Eggenstein
DTT	
5xRT-Puffer	
dNTP-Mix	
RNAsin	Promega, Mannheim
Oligo-dT ₍₁₅₎	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Taq-Polymerase (Thermus aquaticus)	Gibco, BRL Eggenstein
10xPCR-Puffer	
dNTP-Mix	
MgCl ₂	
1%W-1	
Primer	
Reverser Primer	

2.1.2.3 Fragmentisolaton

NucleotraP [®] CR extraction kit:	Macherey-Nagel, Düren
Puffer NT2	
Puffer NT3	
NucleotraP [®] CR Suspension	

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Sigma (Deisenhofen) und Calbiochem (Bad Soden) in der höchsten

erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.2.1.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen
Gewebehacker	Bachofer, Reutlingen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan

2.2.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Horizontale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

2.2.1.3 RT-PCR

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

2.2.1.4 SDS-Gelelektrophorese

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

2.2.1.5 Sonstige Geräte

Anlage zur Demineralisierung von Wasser	Millipore, Eschborn
Belichtungsgerät	Molecular-Packard, Frankfurt a. M.
Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Hybridisierungsöfen	Techne, Wertheim-Bestenheid
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Phosphor-Imager	Molecular Dynamics, Krefeld
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Krefeld
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Video-Dokumentation	Intas, Göttingen
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.2.2. Verbrauchsmaterialien

Immobilon P	Millipore, Eschborn
Hybond-N Nylon, 0,45 Micron	Amersham, Braunschweig
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, 3004, 3083 Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsgefäß	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Einweg-Zellschaber	Typ Falcon 3087 Becton Dickinson, Heidelberg

2.3 Auswertungs-Software

Image Quant	Molecular Dynamics , Krefeld
-------------	------------------------------

3 Methoden

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 300–400 g isoliert. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser.

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

Die verwendete Langendorff-Perfusionsanlage wurde zu Beginn der Präparation mit Powell-Medium gespült, luftblasenfrei mit 80 ml des gleichen Mediums befüllt und auf 37° C erwärmt. Während der gesamten Isolierung wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Nach kurzer Diethylethernarkose (ca. ein bis zwei Minuten) wurde der Thorax der Ratten eröffnet und das Zwerchfell entfernt. Anschließend wurden sowohl Lunge als auch Herz mit einem Scherenschlag abgetrennt und in eine bereitstehende Petrischale mit kalter (+4° C) physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dort wurde das dem Herzen noch anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt und die Aorta weiter freipräpariert. Das Herz wurde danach mit der Aorta an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und retrograd perfundiert. Das in dem Herzen verbliebene Blut wurde zunächst mit 40 ml Powell-Medium ausgewaschen.

Powell-Medium

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

mit Carbogen begast

Das Herz wurde anschließend mit 50 ml Collagenasepuffer für 25 Minuten rezirkulierend perfundiert. Dabei wurde die Flußrate durch ein Ventil auf ca. 2-3 ml/Minute pro Herz (5 ml/g Frischgewicht/Minute) eingestellt.

Collagenase-Puffer

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

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt, das Ventrikelgewebe mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Der Gewebebrei wurde anschließend für fünf Minuten in 30 ml Collagenasepuffer bei 37° C und ständiger Carbogen-Begasung nachverdaut. Die Vereinzelung der ventrikulären Herzmuskelzellen wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mittels einer 5 ml Pipette unterstützt.

Die so gewonnene Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und für drei Minuten bei 25 x g zentrifugiert. Hiermit wurden Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Collagenase-Lösung von den intakten Zellen abgetrennt. Die Herzmuskelzellen wurden in Powell-Medium, welches zusätzlich 200 µmol/l CaCl₂ enthielt, aufgenommen und nochmals bei 25 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde erneut in Powell-Medium mit einem CaCl₂-Anteil von 400 µmol/l aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wurde auf eine der Anzahl der präparierten Herzen

abgestimmte Zahl von Reagenzgläsern aufgeteilt. Die Reagenzgläser wurden zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule der Gradienten-Lösung gefüllt. Nach einer erneuten Zentrifugation für eine Minute bei 25 x g erhielt man eine Zellpopulation, die zu ca. 40–60 % aus intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

Gradienten-Lösung

Powell-Medium	x ml
Albumin	4 % (wt/vol)
CaCl ₂	1 mmol/l

3.1.3 Präparation und Bearbeitung isolierter Endothelzellen aus dem Rattenherz (Piper et al., 1990)

Koronare Endothelzellen wurden aus den selben Herzen isoliert wie auch die ventrikulären Myozyten. Die gewonnenen Endothelzellen wurden in 30 ml Ausplattiermedium für Endothelzellen aufgenommen, bei 2000 x g zentrifugiert, in 25 ml Ausplattiermedium aufgenommen und auf 100 mm Schalen (Typ Falcon 3083) ausplattiert. Bis zum Ausbilden eines konfluenten Zellrasens wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit dem Ausplattiermedium für Endothelzellen durchgeführt, wobei die Antibiotikakonzentrationen des Mediums von 5 % auf 2 % reduziert wurden. Anschließend wurde zum Auflösen der Zell-Zell-Verbindungen der Endothelrasen trypsinisiert (5 ml 1xTrypsin-EDTA/Schale) und auf Schalen des Typs Falcon 3004 in einer Menge von 300000 Zellen/ml aufgetragen. Nach zwei Tagen konnten die Zellen in der ersten Passage für die jeweiligen Versuche eingesetzt werden.

Ausplattiermedium für Endothelzellen

M199/CO ₂ gepuffert	x ml
FCS/NCS (1:1)	20 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml bzw. 250 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml bzw. 250 µg/ml

3.2 Zellkultur

3.2.1 Vor- und Ausplattieren

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

M199/HEPES gepuffert

Medium 199/Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l
Auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert	

Vorinkubationsmedium

M199/HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausplattiert.

CCT-Kulturmedium

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

auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert

Zum Anheften der intakten Zellen auf dem Boden der Kulturschalen wurden diese bei 37° C und unter CO₂-freien Bedingungen für zwei bis vier Stunden inkubiert und anschließend mindestens zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Dabei wurden die runden Zellen entfernt, so daß die verbliebene Zellkultur zu etwa 90 % aus stäbchenförmigen und somit intakten Zellen bestand.

3.2.2 Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten adulter Ratten

In der hier vorliegenden Studie wurden frisch isolierte Kardiomyozyten nach einer vierstündigen Anheftungsphase mit CCT-Kulturmedium gewaschen und nach einer kurzen Ruhepause von ca. zehn Minuten direkt für die entsprechenden Experimente genutzt. Hierbei blieb die stäbchenförmige Gestalt der Zellen erhalten.

3.2.3 Behandlung der Zellen und Zellernte

Die zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschenen Kardiomyozyten wurden nach ca. zehnminütiger Ruhephase entsprechend den jeweiligen Versuchsvorschriften behandelt, wobei bei späterer Isolierung der RNA vier Kulturschalen (Typ Falcon 3004) in gleicher Weise behandelt wurden, um eine ausreichende Menge an gewonnener RNA zu gewährleisten. Zur Gewinnung von Proteinen genügte die Menge an Zellen, die auf einer Kulturschale des Typs Falcon 3001 anheften. Zum Beenden der Inkubation zur RNA-Isolierung wurde das

Kulturmedium abgesaugt und eine der vier gleich behandelten Schalen mit 1 ml kaltem 1xPBS versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und von Schale zu Schale zu einer Zellsuspension zusammengeführt. Dieser eine ml 1xPBS wurde zusammen mit den geernteten Zellen aus den vier Kulturschalen in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dieses anschließend für zwei Minuten bei 2300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis gestellt oder zur längeren Lagerung bei -80° C tiefgefroren.

10xPBS

NaCl	150 mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4 mmol/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	16 mmol/l
auf pH 7,3 titriert	

3.2.4 Transfektion der Kardiomyozyten mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden

„Decoy-AP1“, ein Oligonukleotid mit der komplementären Sequenz zu der AP1-Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors AP1, wurde vier Stunden vor der eigentlichen Induktion der Zellen mit Angiotensin II auf die Kulturschalen gegeben. „Decoy-AP1“ besitzt die Sequenz 5'-AZE FOG TCA TGA CGT CAT GAO EZO A-3', wobei Z,E,F und O Phosphorthioate sind und Z für T, E für G, F für A und O für C stehen. „Decoy-AP1“ ist in der Lage, den Transkriptionsfaktor AP1 zu binden und somit aus der Enzymkaskade herauszunehmen. Mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden wurden die Zellen über Nacht vorinkubiert. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

c-fos Sense: 5'-FZE FTG TTC TOE EET-3'
c-fos Antisense: 5'-FOO OGA GAA CFZ OFT-3'

phox22 Sense: 5'-GFZ OZG CCC CAT GGT GAE EFO C-3'
phox22 Antisense: 5'-GEZ OOT CAC CAT GGG GCF EFZ C-3'

mox Sense a: 5'-AOF FZG GGA AAC ZEE OT-3'

mox Sense b: 5'-TZZ EFZ AAT GGG FFF OT-3'

mox Antisense a: 5'-AEO OFG TTT CCC FZZ ET-3'

mox Antisense b: 5'- AEZ ZZC CCA TTG ZOF FA-3'

Auch hier sind Z,E,O und F Phosphorthioate und stehen ebenfalls für die oben genannten Basen.

3.3 Nachweis der Expression durch RT-PCR

3.3.1 Präparative RNA-Isolierung (Chomczynski et al., 1987)

Das gewonnene Zellpellet (3.2.3) wurde mit 300 µl RNA-Clean[®] resuspendiert und bis zur vollständigen Auflösung der Zellen mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers aufgewirbelt. In einem anschließenden Schritt wurde die Suspension mit 30 µl Chloroform versetzt und gut durchmischt, so daß sie weiß erschien. Die folgende Zentrifugation bei 4° C für 15 Minuten und einer Geschwindigkeit von 1200 x g trennte die gesamte RNA von DNA und Proteinen. Zu erkennen war die Auftrennung an der Bildung von insgesamt drei Phasen, wovon die obere klare Phase die gesamte RNA enthielt. In der unteren gelblichen Phase waren die DNA und in der mittleren dünnen die Proteine gelöst. Die obere Phase wurde nun vorsichtig abpipettiert (ca. 140 µl) und in ein neues, steriles und zur Beseitigung von evtl. vorhandenen RNAsen für fünf Minuten mit UV-Licht bestrahltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden zu diesen 140 µl nun 150 µl Isopropanol gegeben, die Lösungen kurz vermischt und anschließend für mindestens 20 Minuten bei -20° C aufbewahrt.

Nach diesen 20 Minuten wurde der Ansatz wiederum für 15 Minuten bei 4° C und 12000 x g zentrifugiert. Hierdurch konnte die gefällte RNA in einem Pellet nach Absaugen des Überstandes gewonnen werden. In einem weiteren Schritt wurden sie

mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend, wie im vorherigen Schritt beschrieben, zentrifugiert.

Die im Pellet enthaltene RNA wurde getrocknet und in 10-30 µl sterilem aqua bidest. resuspendiert. Die Menge des zugeführten aqua bidest. richtete sich nach der rein optisch geschätzten RNA Menge.

Zur quantitativen photometrischen RNA-Bestimmung wurden 3 µl der Lösung entnommen, in 1 ml aqua bidest. aufgenommen und in eine Quarzglasküvette überführt. Die restliche Lösung konnte zur Synthese der cDNA durch die Reverse Transkription entweder sofort verwendet oder bis dahin tiefgefroren gelagert werden.

Um RNA aus ganzen Herzen oder anderen Geweben zu extrahieren, wurde das bei -80°C gelagerte Gewebe in ca. 10 ml flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zerstoßen. Zur völligen Auflösung wurde das pulverisierte Gewebe anschließend in einem Glasmörser mit 3–5 ml RNA-Clean[®] aufgelöst. Die nun folgenden Schritte unterscheiden sich nicht von der RNA-Isolierung aus Zellpellets.

3.3.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Anschließend an die RNA-Isolierung wurde die RNA Menge quantitativ photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 3 µl der RNA-enthaltenden Lösung entnommen, in 1 ml aqua bidest. gelöst und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Um die Effizienz der Proteintrennung zu überprüfen, wurde zusätzlich die Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das errechnete Verhältnis der beiden Extinktionswerte sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um eine möglichst reine RNA-Suspension vorliegen zu haben. Da die benötigte Menge an RNA für die Reverse Transkription 1 µg ist, mußte anschließend das Volumen ausgerechnet werden, in dem diese Menge RNA gelöst ist. Ein Volumen von 5 µl RNA-enthaltende Lösung wurde jedoch nicht überschritten.

3.3.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurde je 1 μg RNA pro Ansatz zur cDNA-Synthese eingesetzt, wobei diese Menge mit sterilem aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 5 μl aufgefüllt wurde. Diese 5 μl wurden anschließend bei 60° C für 15 Minuten im Thermocycler denaturiert. Während dieser Zeit konnte der Mix angefertigt werden.

Der Mix für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

RT-Ansatz

oligo-dT ₍₁₅₎	1,0 μl (0,1 mg/ml)
5xRT-Puffer	2,0 μl
dNTPs	1,0 μl (10 mmol/l je Nukleotid)
RNA-sin	0,2 μl (25 U/ μl)
DTT	0,5 μl (0,1 mol/l)
Reverse Transkriptase	0,3 μl (200 U/ μl)

Zum Ende der 15 Minuten wurden die Proben auf Eis gestellt und 5 μl des Mix je Probe hinzupipettiert. Die Reverse Transkription fand bei 37° C für eine Stunde im Thermocycler statt; mit einer anschließenden Denaturierung der gebildeten cDNA bei 95° C für fünf Minuten. Bis zur späteren Verwendung konnten die Proben bei -80° C tiefgefroren werden.

3.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden nun die unter 3.3.3 gewonnenen cDNA-Abschnitte amplifiziert. Hierzu wurden 1,5 μl cDNA und 8,5 μl des hergestellten PCR-Ansatzes in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt, gut gemischt und bei einer für den Primer spezifischen Zyklenanzahl und Temperatur im Cycler bearbeitet. Folgende Primer-Sequenzen der Ratte wurden gewählt:

Methoden

βAktin: 5'-GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG-3'

βAktin reverse: 5'-ZGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA-3'

(Nudel, et al. 1983)

TGFβ: 5'-AAT ACG TCA GAC ATT AGG GAA-3'

TGFβ reverse: 5'-GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT-3'

(Brand, et al. 1995)

c-fos: 5'-TGC CAG ATG TGG ACC GTG CTG- 3'

c-fos reverse: 5'-CCA CAG CTT GGT GTG TTT CAC-3'

(Curran, et al. 1987)

PCR-Ansatz

10xPCR-Puffer	1 µl
aqua bidest.	5,8 µl
Primer forward	0,15 µl (100 µmol/l)
Primer reverse	0,15 µl (100 µmol/l)
dNTPs	0,4 µl (10 µmol/l)
MgCl ₂	0,3 µl(50 µmol/l)
1%W-1	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Im Thermocycler wurden nun drei Programme durchlaufen. Hierbei variierte die Annealingtemperatur im 1. und 2. Programm und die Zyklenzahl im 2. Programm in Abhängigkeit zum jeweiligen Primer.

Programm 1 (1 Zyklus)	Denaturierung	93°C , 5 min
	Annealing	primerspezifisch, 3 min
	Amplifikation	72°C , 3 min
Programm 2 (x Zyklen)	Denaturierung	93°C , 1 min
	Annealing	primerspezifisch, 1 min
	Amplifikation	72°C , 3 min
Programm 3 (1 Zyklus)	Denaturierung	72°C , 15 min

Im folgenden sind die primerspezifischen Zyklenzahlen und Annealingtemperaturen aufgeführt.

<u>Primer</u>	<u>Zyklen</u>	<u>Annealingtemperatur</u>
βAktin	20	60° C
TGFβ	27	53° C
phox22	33	52° C

Die verwendeten Zyklenzahlen sind so gewählt, daß der Anstieg der Amplifikationen im linearen Bereich lag. Zur Semiquantifizierung wurden die induzierten Expressionen der TGFβ- und der c-fos-Gene auf die Expression des in Kardiomyozyten konstitutiv exprimierten βAktin-Gens bezogen.

3.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR[®]-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein natives 2%iges Agarose-Gel (SeparideTM Gel Matrix) aufgetragen. Der optimale Trennbereich dieses Gels lag zwischen 50 bp und 600 bp.

10xTAE-Puffer

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

Agarose-Gel-Lösung

1xTAE-Puffer	75 ml
Separide TM Gel Matrix	1,5 g
Ethidiumbromid	3,75 µl

Um das Gel zu gießen, wurden 75 ml 1xTAE-Puffer zusammen mit 1,5 g Agarose in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, so daß eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 3,75 µl Ethidiumbromid hinzugegeben, gut vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Nach ca. 30minütiger Erkaltungsphase konnte der Profilvermer gezogen und das Gel mit den Proben beladen werden. Zu den Proben wurden zuvor 1 µl 10:1 TAE-Auftragspuffer mit einer Laufhöhe von etwa 65 Basenpaaren hinzupipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden cDNA-Proben wurde ein DNA-Längenmarker (PBR 322, geschnitten mit der Restriktions-Endonuklease MSP I, New England BioLabs, Beverly, USA) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

TAE-Auftragspuffer

10xTAE-Puffer	x ml
Saccharose	50 % (wt/vol)
Bromphenolblau	1 % (wt/vol)
Xylencyanol	1 % (wt/vol)

Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA pro Gel statt. Im Anschluß erfolgte die Betrachtung unter UV-Beleuchtung (312 nm). Die Gele wurden abfotografiert und mit dem Videodokumentationssystem aufgenommen. Der in die DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (Maniatis et al., 1989) fluoreszierte violett. Die Intensität dieser Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Image Quant ausgewertet.

3.4 Quantifizierung der PCR[®]

3.4.1 Fragmentisolation

Zunächst wurde aus einer qualitativ hochwertigen RNA mittels RT-PCR eine hohe Amplifikation des jeweiligen Fragments angestrebt. Hierzu wurde für jeden Primer die maximale Zyklenzahl von 35 Zyklen bei den entsprechenden Temperaturen gewählt. Zur Kontrolle der RT-PCR wurden 10 µl des Amplifikates wie in 3.3.5 beschrieben in einem Agarose-Gel ausgewertet.

Die eigentliche Fragmentisolation erfolgte mit dem „NucleotraP[®] CR extraction kit“ der Firma Macherey-Nagel, Düren.

Zu den restlichen PCR[®]-Produkten wurde nun ein Volumenanteil Chloroform gegeben, anschließend gut gemischt und bei 5000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses Volumen wurden nun mit TE-Puffer (pH-Wert 8,0) auf 100 µl aufgefüllt. Zu diesen 100 µl wurden nun 400 µl „NT2-Puffer“ und 10 µl gut durchmisches „NucleotraP[®] CR“ hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Proben alle zwei bis drei Minuten gemischt wurden. Nach diesen zehn Minuten folgte eine weitere Zentrifugation bei 10000 x g für 30 Sekunden nach Erreichen der Drehzahl, nach der der Überstand verworfen wurde.

TE-Puffer

Tris/HCl	10 mmol/l (pH 8,0)
EDTA	1 mmol/l

Zu dem DNA enthaltenden Pellet wurden wiederum 400 µl „NT2-Puffer“ hinzugegeben und erneut für 30 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen.

Nun wurde zweimal folgender Waschvorgang durchgeführt:

Nach der Zugabe von 400 µl „NT3-Puffer“ folgte ein kurzes Vortexen und eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10000 x g. Der „NT3 Puffer“ wurde abgesaugt und das Pellet für 15 Minuten luftgetrocknet. Dieses Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer durch Vortexen gelöst, für zehn Minuten inkubiert und währenddessen alle zwei bis drei Minuten kurz gemischt. Danach folgte wiederum eine Zentrifugation nach dem zuletzt genannten Prinzip. Der DNA enthaltende Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

3.4.2 Quantifizierung der semiquantitativen RT-PCR

Um die Polymerasekettenreaktion zu quantifizieren, wurde ein Standard der einzelnen Primer hergestellt. Hierzu mußte zunächst das Fragment isoliert werden, wie es in 3.4.1 beschrieben wurde. Dieses Fragment wurde zusammen mit dem Marker pBR322 DNA-Msp I Digest in einem Agarose-Gel (siehe 3.3.6) aufgetrennt und anschließend mit dem Computer-Programm „Image Quant“ densitometrisch ausgewertet. Die Bandenintensität der auf Höhe des Produkts laufenden Markerbande und die Produktbande selbst wurden verglichen.

Dabei entsprechen folgende Laufhöhen x ng DNA:

(1 μg = 4294 bp; 1 bp = 0,233 ng)

622 bp	144,926 ng
527 bp	122,791 ng
404 bp	94,132 ng
307 bp	71,531 ng
238+242 bp	121,840 ng

Nun konnte aufgrund der Laufhöhe und der Bandenintensität die Menge an Fragment errechnet werden und in einer weiteren PCR[®] unter entsprechenden Bedingungen in einer Verdünnungsreihe das Produkt amplifiziert werden.

Abb.: 3.4.1

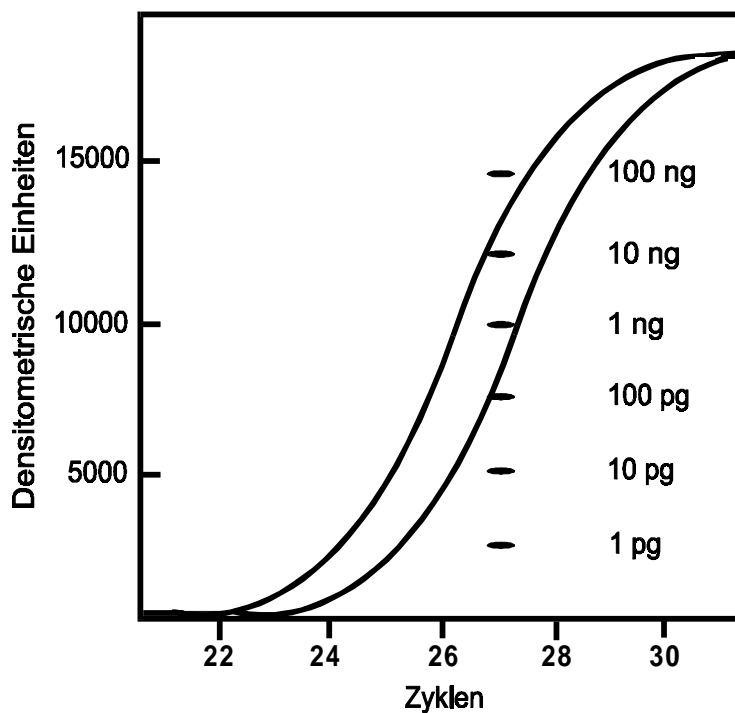


Abb. 3.4.1: Dargestellt ist der lineare Verlauf einer RT-PCR innerhalb einer bestimmten Zyklenzahl. Geringere aber auch höhere Zyklenzahlen führen zu einem ungenauen Ergebnis. Zusätzlich eingetragen sind die Konzentrationen, in denen der externe Standard eingesetzt wurde und die daraus resultierende Bandenintensität.

3.5 Protein-Gelelektrophoretische Methoden

3.5.1 Probenvorbereitung

Zu den Kardiomyozyten, die auf Schalen (Typ Falcon 3001) kultiviert und wie in 3.2 beschrieben behandelt wurden, wurde nach entsprechender Inkubationszeit und einmaligem Waschen mit 1 ml kalter 1xPBS-Lösung 100 µl Lysispuffer hinzugegeben. Die Zellmembranen lösten sich nach ca. 15minütigem Schütteln bei Raumtemperatur auf. Zum Verdau von Nukleinsäuren wurde für weitere 20 Minuten Benzonase[®] (Endkonzentration 50 U/ml) hinzugefügt. Anschließend konnten die aufgelösten Zellen abgeschabt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 25 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt werden. Die vollständige Denaturierung der Proteine fand bei 60° C für 15 Minuten im Eppendorf-Inkubator statt. Die Proben standen nun zur weiteren Verwendung bereit oder konnten bei –80° C tiefgefroren werden.

Lysispuffer (SDS-Page)

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

Natrium-ortho-Vanadat diente zur Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

2xLaemmli-Puffer

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

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vom Gesamtprotein-extrakt der Kardiomyozyten erfolgte nach Laemmli (1970). Vor dem Gießen eines Gels wurden die Glasplatten für die Gelkammer gründlich gereinigt und mit 100%igem Alkohol gut entfettet. Für ein Gel benötigte man eine rechteckige Glasplatte und eine Glasplatte mit Aussparung (22 x 125 mm), zwei Spacer (Dicke 1 mm) und einen Silikonschlauch entsprechender Dicke. Zwischen den beiden Glasplatten kamen beidseits die Spacer und zur unteren Abdichtung der Silikonschlauch zum Liegen. Nun wurde dieses Element dergestalt mit Klammern an der Gelkammer befestigt, daß die Glasplatte mit Aussparung der Kammer zugewandt war. Anschließend konnte das Trenngel bis auf 2/3 der Höhe gegossen werden. Da dieses Gel unter Luftausschluß auspolymerisieren mußte, wurde der restliche Zwischenraum mit Wasser gefüllt. Nach ca. 30 Minuten wurde das Sammelgel nach Dekantierung des Wassers bis zur vollen Höhe gegossen. Der Profilformer für die Taschen wurde sofort im Anschluß an das Gießen in das Sammelgel eingesetzt. Nach ca. zehn Minuten konnten der Silikonschlauch und der Profilformer entfernt und die Elektroforesekammer in ein Gefäß mit Laufpuffer überführt werden.

Für die Untersuchungen zur MAP-Kinase-Aktivierung wurde ein 12,5%iges Trenngel verwendet.

4xTrenngelpuffer

Tris/HCl 1,5 mol/l (pH 8,8)

SDS 0,4 % (wt/vol)

Trenngel (MAPK)

AA/BAA (30:1) 12,5 ml

Trenngelpuffer 7,5 ml

aqua bidest. 10 ml

APS 10 % (wt/vol) 200 µl

TEMED 25 µl

SDS 10 % (wt/vol) 300 µl

Sammelgelpuffer

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

Sammelgel

AA/BAA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
aqua bidest.	6,4 ml
APS 10 % (vol/vol)	100 µl
Temed	12 µl
SDS 10 % (wt/vol)	150 µl

Die Mengenangaben für das Trenngel bzw. das Sammelgel beziehen sich auf die Menge, die für zwei Gele benötigt wurde.

Da der Nachweis der Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAP-Kinase nicht auf einem Gel geführt werden konnte, wurden gleiche Mengen an Probenmaterial (25 µl) in gleicher Reihenfolge auf zwei Gele aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung der zu untersuchenden Proteine wurden Protein-Molekulargewichtsmarker zwischen 29 und 205 kDa (SDS-6H-Molecular Weight Standard; Sigma, Deisenhofen) gleichzeitig auf das Gel aufgetragen.

Laufpuffer (SDS-PAGE)

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

Die SDS-Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 40 V über Nacht oder bei 180 V für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur statt.

3.5.3 Western-Blot-Verfahren

Die in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden im „Semi Dry Blotting-Verfahren“ elektrophoretisch nach Kyhse-Andersen (1984) auf Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membranen transferiert. Dabei wurden in Puffer getränkte Filterpapiere (Biotec. Fischer, Reiskirchen) als Pufferreservoir verwendet. Später konnten die auf diese Weise fixierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Folgende Puffer wurden für das Western-Blot-Verfahren verwendet:

Kathodenpuffer

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

Anodenpuffer

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

Konzentrierter Anodenpuffer

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

Zwei PVDF-Membranen und neun Filterpapiere wurden in Gelgröße ausgeschnitten. Je drei Filterpapiere wurden in Kathodenpuffer, Anodenpuffer und konzentriertem Anodenpuffer getränkt. Die PVDF-Membranen wurden für wenige Sekunden mit 100%igem Methanol benetzt und anschließend in den Anodenpuffer getaucht. Nun konnten zunächst die drei in konz. Anodenpuffer getränkten Filterpapiere luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer aufgebracht werden. Auf diese drei Filterpapiere wurden anschließend die drei in Anodenpuffer getränkten Filterpapiere auf gleiche Weise aufgelegt. Es folgte das luftblasenfreie Auflegen der PVDF-Membranen. Nun wurden die Polyacrylamidgele nach Entfernung des Sammelgels vorsichtig auf die Membranen aufgelegt. Zuletzt wurden die drei Kathodenfilter aufgeschichtet und die Kathode aufgesetzt. Der Proteintransfer

erfolgte mit konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² (entsprechend ca. 90 mA bei einem Gel und ca. 180 mA bei zwei Gelen) für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.5.4 Immunologischer Nachweis der p38 MAP-Kinase und p38p MAP-Kinase

Nach erfolgtem Proteintransfer (3.5.3) konnten sowohl die p38 MAP-Kinase als auch deren phosphorylierte Form mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu mußten zunächst die PVDF-Membranen für mindestens zwei Stunden mit einer 3%igen BSA-Lösung in 1xTBS bei Raumtemperatur inkubiert werden, um unspezifische Bindungstellen abzusättigen.

10xTBS-Puffer

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

Nach zweimaligem Waschen für fünf Minuten in 1xTBS wurde eine der Membranen mit dem phosphorunspezifischen p38 MAP-Kinase Antikörper und die andere mit dem phosphorspezifischen p38p MAP-Kinase Antikörper für mindestens zwei Stunden inkubiert. Es kamen polyklonale Antikörper zur Anwendung.

Erst-Antikörper-Lösung (pH 7,4)

Antikörper gegen p38/p38p MAP-Kinase	1 µg/ml
BSA	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)
gelöst in TBS	

Die Erst-Antikörper-Lösung konnte mehrere Male wiederverwendet werden und wurde zwischenzeitlich bei -20° C gelagert.

Nach der Inkubation wurden die Membranen zweimal für zehn Minuten mit 1xTBS, welches mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100 versetzt war, zur Entfernung ungebundener Antikörper gewaschen. Zur Markierung der Antigen-Antikörper-

Komplexe folgte die Zweit-Antikörper-Inkubation (hier kommt der gleiche Antikörper für beide Membranen zum Einsatz) nach gleichem Prinzip.

Zweit-Antikörper-Lösung (pH 7,4)

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

Um überschüssiges Konjugat von der Membran zu entfernen, wurde anschließend zweimal für zehn Minuten in 1xTBS plus 0,5 % (wt/vol) Triton X-100 gründlich gewaschen. Dann wurden die Membranen durch Zwischeninkubation für zehn Minuten in alkalischem Phosphatasepuffer äquilibriert.

Alkalischer Phosphatasepuffer

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

Die Detektion von p38 MAP-Kinase oder der phosphorylierten Form erfolgte durch eine Farbreaktion mit Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Dabei wurde das zugesetzte Substrat 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) durch die an den Zweit-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase und die Reaktion mit dem Farbstoff NBT in ein violette Präzipitat umgesetzt. Hierzu wurden kurz vor Gebrauch 2,6 mg BCIP und 6,6 mg NBT in 20 ml alkalischem Phosphatasepuffer im Dunkeln vollständig gelöst und anschließend die Membranen für 10–20 Minuten in dieser Lösung gefärbt. Vor dem Trocknen zwischen zwei Filterpapieren mußten die Membranen zunächst gründlich mit Wasser abgespült werden.

3.6 Proteinbestimmung

3.6.1 Probenvorbereitung

Die Zellen wurden wie in 3.2 induziert und inkubiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde zu dem Zellrasen 1 ml einer 1N NaOH Lösung, die mit 0,1 % SDS versetzt war, hinzugegeben. Zum Auflösen der Zellen wurden diese für mindestens eine Stunde im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

3.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes (Bradford et al., 1976)

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Bindung des Farbstoffes an die Proteine bewirkte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm. Hierzu wurden 5–10 µl des unter 3.6.1 gewonnenen Zellhydrolysates in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach kurzer Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes diente als Standard BSA gelöst in 1N NaOH/0,01 % (wt/vol) SDS in den Konzentrationen 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 % (wt/vol)
96 % Methanol	5 % (vol/vol)
85 % ortho-Phosphorsäure	10 % (vol/vol)
aqua bidest. ad 1 l	

3.7 NADH/NADPH–Oxidations-Assay

3.7.1 Probenvorbereitung

Die Kardiomyozyten wurden wie unter 3.2.1 beschrieben auf Schalen des Types Falcon 3001 ausplattiert und nach zwei- bis vierstündiger Inkubation mit Inkubationspuffer für isolierte Kardiomyozyten zweimal sehr gründlich gewaschen, damit das Phenolrot des Ausplattiermediums entfernt wurde. Nach zehnmütiger Ruhephase konnte nun zu jeder Schale NADH bzw. NADPH mit einer Endkonzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben werden. Anschließend wurden die Zellen je nach Versuchsbedingung induziert und inkubiert.

Inkubationspuffer für isolierte Kardiomyozyten (pH 7,4)

NaCl	125,0 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
MgSO ₄ * 2H ₂ O	1,2 mmol/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,0 mmol/l
Glucose	10,0 mmol/l
HEPES	10,0 mmol/l

3.7.2 Oxidation von NADH/NADPH (Patterson et al., 1999)

Um die Oxidation von NADH bzw. NADPH zu bestimmen, wurde der Zellüberstand nach einer Stunde abgenommen und durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 2000 x g geklärt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt. Um die Aussage zu quantifizieren wurde der Gesamtproteingehalt der Zellen wie in 3.6.2 beschrieben gemessen und die Absorption auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen.

3.8 AP1-Binding-Assay

3.8.1 Kernextraktion

Die Zellen wurden wie in 3.2.1 beschrieben ausplattiert und entsprechend den Versuchsbedingungen induziert und inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Zellen aus jeweils fünf Schalen (Typ Falcon 3004) mit einem Schaber abgekratzt, zusammen mit dem Kulturmedium in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 2000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml 1xPBS aufgenommen und erneut bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals abgesaugt und das Pellet entweder tiefgefroren oder in 400 µl 1xSchwellungspuffer aufgenommen.

10xSchwellungspuffer

Tris/HCl	10 mmol/l (pH 7,9)
KCl	10 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
DTT (1:500)	1 mmol/l

Die Zellsuspension wurde bis zur Auflösung des Pellets gründlich gemischt und für 30-40 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 900 x g und 4° C. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 400 µl 1xHomogenisierungspuffer aufgenommen, kurz gemischt und für fünf bis zehn Minuten auf Eis gestellt.

10xHomogenisierungspuffer

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

Diese Zellsuspension wurde nun mit acht Stößen in einem Glasmörser homogenisiert und anschließend bei 900 x g für zehn Minuten und 4° C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde zu dem Pellet 40 µl Storagepuffer gegeben, kurz gemischt und anschließend wieder für 30 Minuten auf Eis gestellt, wobei alle fünf Minuten gemischt wurde.

10xStoragepuffer

HEPES	10 mmol/l (pH 7,5)
KCl	50 mmol/l
NaCl	300 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
DTT (1:500)	1 mmol/l
PMSF (1:100)	1 mmol/l
Glycerol	20 % (vol/vol)

Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 13000 x g für fünf Minuten und 4° C konnte der Überstand bei -80° C tiefgefroren oder sofort weiterverarbeitet werden.

3.8.2 Radioaktive 5'-Endmarkierung

Äquimolare Mengen der zu hybridisierenden AP1 Oligonukleotide (5' GAT CCG CTT GAT GAG TCA GCC GGA A 3'; 5' TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG GAT C 3') in TE-Puffer wurden gemischt, auf 95° C erhitzt und während mehrerer Stunden langsam auf Raumtemperatur gebracht. Für die Dephosphorylierung von 32 ng DNA-Oligonukleotiden benötigt man 0,1 U bis 0,5 U Phosphatase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37° C. Danach wurde die Phosphatase durch Inkubation bei 65° C für 15 Minuten inaktiviert.

Reaktionsgemisch

Shrimps alkalische Phosphatase	0,5 µl (4U/µl)
10xPuffer (200 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0; 100 mmol/l MgCl ₂)	2,0 µl
Oligo (1:100)	4,0 µl
aqua bidest.	13,5 µl

An diesen dephosphorylierten DNA-Oligonukleotiden konnte mit Hilfe einer T4-Polynukleotidkinase die gammaständige Phosphatgruppe von $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ auf die 5'OH-Gruppe übertragen werden. Hierzu wurde dem gewonnenen Reaktionsansatz die Polynukleotidkinase und das $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ hinzugegeben und für eine Stunde bei 37° C im Thermocycler inkubiert.

Reaktionsgemisch

T4-Polynukleotidkinase	1,0 µl (10 U/µl)
Tris/HCl (1 mol/l, pH 8,0)	0,5 µl
$\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (7000 Ci/mmol/l)	2,0 µl

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine G50-Sephadex–Schleudersäule (3.7.3) abgetrennt.

3.8.3 G50-Sephadex-Schleudersäule (Gelfiltration)

Sephadex-G50 hält unter den angegebenen Bedingungen freie Nukleotide zurück, während Oligonukleotidfragmente mit mehr als 20 bp ungehindert passieren können.

Zunächst wurde Sephadex mit TE-Puffer aufgeschwemmt und für ca. zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Herstellung der Säulen wurden Insulinspritzen mit Glaswolle abgedichtet, mit dem Säulenmaterial (Sephadex-G50) befüllt und anschließend zur Verdichtung dreimal bei 3500 x g 15 Minuten lang zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Spritzen erneut mit Sephadex-G50 aufgefüllt. Die Schleudersäulen waren zur Beladung geeignet, wenn sie randvoll gefüllt waren. Nun wurde der Makierungsansatz auf eine Säule aufgetragen, mit 50 µl aqua bidest. nachgespült und wie oben beschrieben für 20 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem Eppendorfgesäß aufgefangen. Anschließend bestimmte man die spezifische Aktivität von 1 µl des Eluats im Szintillationszähler (3.8.4).

3.8.4 Quantitative Bestimmung der Inkorporation von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz der unter 3.8.2 gewonnenen Probe wurde ein 1 µl Aliquot des markierten Fragments mit 4 ml der Szintillationslösung gemischt und in einem Beckman-Szintillationszähler mittels eines speziellen Protokolles für ^{32}P die Impulsrate pro Zeiteinheit in „counts per minute“ (cpm) bestimmt.

3.8.5 Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der unter 3.8.1 gewonnenen Probe wurde wie unter 3.6.2 beschrieben bestimmt.

3.8.6 Spezifische Bindung von Proteinen an Oligonukleotide

Diese Methode zum Nachweis von Protein-Oligonukleotid-Wechselwirkungen (Strauss et al., 1984) beruht auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität eines Protein-Nukleotid-Komplexes im Vergleich zu einem proteinfreien, radioaktiv markierten Fragment. Zum Abfangen unspezifischer DNA-bindender Proteine

wurden die Proteinfractionen zuerst 15 Minuten bei 30° C mit unspezifischer DNA (poly-(dIdC)) vorinkubiert.

1xBindungspuffer

Tris/HCl, pH 7,9	20 mmol/l
KCl	5 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
Glycerin	10 % (vol/vol)
DTT	3 mmol/l
PMSF	0,2 mmol/l

10 μ l der unter 3.7.1 gewonnenen Probe (zu testende Proteinfraction), 10 μ l Bindungspuffer und 0,5 μ l poly-dIdC (1 μ g/ μ l) wurden in einem Eppendorfgefäß für 15 Minuten bei 30° C vorinkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von 4 μ l des radioaktiv markierten Oligonukleotidfragments (20000 cpm) für 30 Minuten bei 30° C weiterinkubiert.

Reaktionsansatz

endmarkiertes Oligonukleotid-Fragment	4,0 μ l (1-5 ng)
poly-(dIdC)	0,5 μ l
zu testende Proteinfraction	10 μ l
Bindungspuffer	10 μ l

Die Ansätze konnten dann auf einem Retardation-Gel aufgetrennt werden.

3.8.7 Retardation-Gele

Der Aufbau und das Gießen der Gele entspricht der Beschreibung unter 3.4.2.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C und 150 V für ca. zwei Stunden. Zur Kontrolle der Laufhöhe der Proben wurde in eine Tasche 1 μ l TAE-Auftragungspuffer (3.3.5) aufgetragen.

Retardation-Gel-Lösung

AA/BAA (80:1)	4 ml
100xRA-Puffer	400 µl
Glycerin	1 ml
aqua bidest.	35 ml
TEMED	34 µl
APS 10 % (wt/vol)	300 µl

10xRA-Puffer, pH 7,9

Tris/HCl	600 mmol/l
Natriumacetat	330 mmol/l
EDTA	100 mmol/l

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel bei 150° C getrocknet und in handelsübliche Frischhaltefolie gepackt, auf einen Storage Phosphor Screen gelegt und je nach Signalstärke für einige Stunden bis Tage exponiert. Das Signal konnte am Phosphor Imager mit dem Computer-Programm „Image Quant“ eingescannt und ausgewertet werden.

3.9 Statistik

Die Meßwerte wurden als Mittelwerte \pm der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) unter Nutzung des Student–Newmann–Keuls–Testes durchgeführt und das Signifikanzniveau wurde ermittelt (Godfrey et al., 1985; SAS/STAT., 1992). Differenzen mit $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluß von Angiotensin II auf die ventrikuläre TGF β mRNA-Expression in vitro

4.1.1 Konzentrationsabhängige Steigerung der ventrikulären TGF β mRNA-Expression durch Angiotensin II

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration für die Angiotensin II-vermittelte Induktion der TGF β mRNA-Expression an isolierten Kardiomyozyten wurde Angiotensin II in steigenden Konzentrationen eingesetzt und die Inkubation nach 24 Stunden beendet. Angiotensin II wurde in Konzentrationen von 10^{-10} – 10^{-6} mol/l verwendet (Abb. 4.1.1). Eine maximale Steigerung der TGF β mRNA-Expression wurde für eine Angiotensin II-Konzentration von 100 nmol/l gefunden. Die EC₅₀ für die Angiotensin II-vermittelte Wirkung wurde mit 519 pmol/l ermittelt. Um einen maximalen Effekt zu erreichen, wurde Angiotensin II in allen weiteren Versuchen in einer Konzentration von 100 nmol/l eingesetzt.

Abb.: 4.1.1

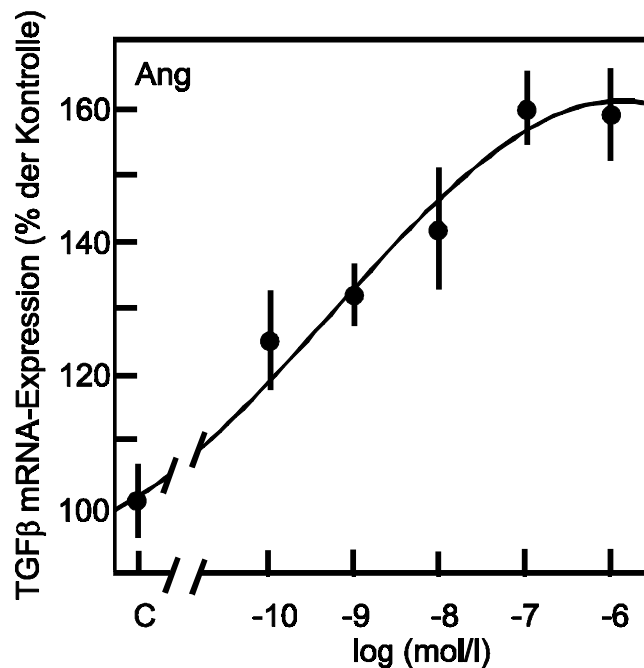


Abb. 4.1.1: Konzentrationsabhängige Steigerung der TGFβ mRNA-Expression durch Angiotensin II (Ang) in adulten ventrikulären Kardiomyozyten. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Angiotensin II induziert. Zur Kontrolle (C) dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von Angiotensin II, die unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Die Ergebnisse wurden mittels RT-PCR erhoben und auf die endogene βAktin mRNA-Expression bezogen. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ Versuchen.

4.1.2 Translations- aber nicht transkriptionsabhängige Steigerung der ventrikulären TGFβ mRNA-Expression durch Angiotensin II

Zur Überprüfung, ob in der Signalkaskade von Angiotensin II zu TGF β neue Transkriptionsfaktoren gebildet oder lediglich bereits vorhandene aktiviert werden müssen, wurden isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen zum einen mit Cycloheximid ($30 \mu\text{mol/l}$), einem Hemmstoff der Translation, und zum anderen mit Actinomycin D ($5 \mu\text{mol/l}$), einem Hemmstoff der Transkription, für 10–15 Minuten vorinkubiert. Zur Darstellung der TGFβ-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene wurden die Zellen nach 24stündiger Inkubation mit Angiotensin II geerntet.

Hier konnte gezeigt werden, daß beide Substanzen in der Lage waren, die vermehrte Bildung von TGF β zu hemmen. Im Gegensatz hierzu wurde die verstärkte Expression von TGF β mRNA nach Induktion mit Angiotensin II nur in Gegenwart von Actinomycin D gehemmt, wohingegen in Gegenwart von Cycloheximid die TGF β mRNA-Expression unverändert anstieg (Abb. 4.1.2.1). Dies bedeutet, daß keine de-novo-Synthese von Transkriptionsfaktoren für die Angiotensin II-vermittelte Induktion von TGF β notwendig ist. Die Stärke der TGF β -Expression zeigte in Kontrollversuchen, in denen Zellen der gleichen Präparation nur mit Actinomycin D bzw. Cycloheximid behandelt wurden, keinen signifikanten Unterschied zur Expression unbehandelter Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.1.2.1

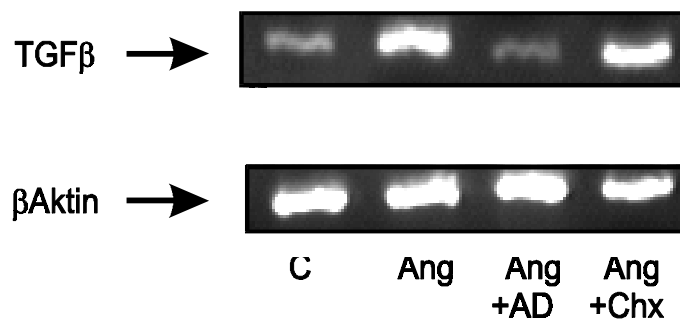


Abb. 4.1.2.1: Repräsentatives Agarose-Gel nach Amplifikation der cDNA mit Oligonukleotiden für TGF β (27 Zyklen) und β Aktin (20 Zyklen). Die cDNA wurde aus der mRNA von isolierten Kardiomyozyten gewonnen, die unter Kontrollbedingungen (C) kultiviert wurden, mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) induziert wurden, oder mit Angiotensin II und Actinomycin D (AD, 5 μ mol/l), bzw. Angiotensin II und Cycloheximid (Chx, 30 μ mol/l) für 24 Stunden inkubiert wurden. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurden die TGF β - und die β Aktin-Expression bestimmt.

Abb.: 4.1.2.2

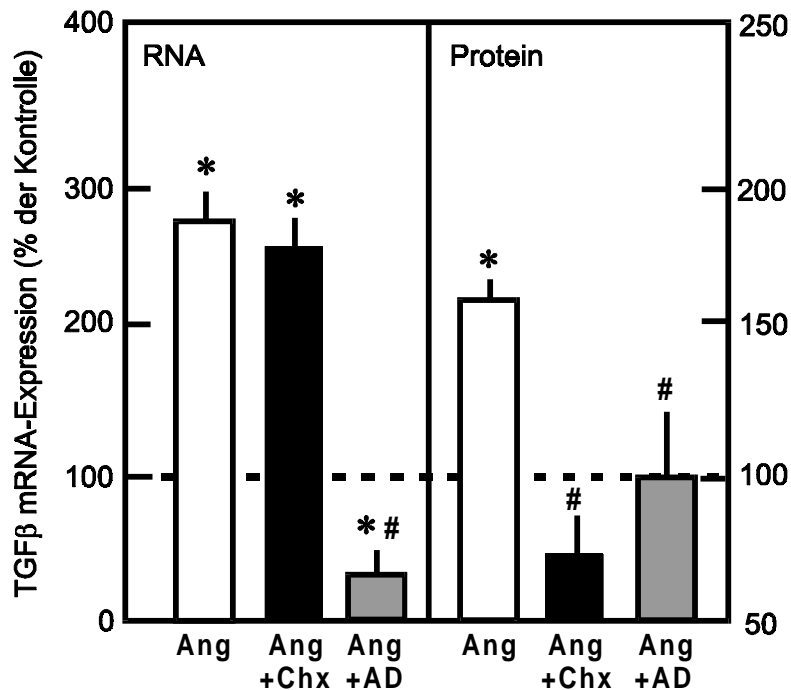


Abb. 4.1.2.2: links: Dargestellt ist die signifikante Erhöhung der TGFβ mRNA-Expression nach alleiniger Induktion mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) und nach Induktion mit Angiotensin II und Cycloheximid (Chx, 30 μmol/l) in ventrikulären Kardiomyozyten. Bei Induktion mit Angiotensin II und Actinomycin D (AD, 5 μmol/l) kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der TGFβ mRNA-Expression.

rechts: Dargestellt ist die signifikante Erhöhung der TGFβ-Werte nach Angiotensin II-Induktion. Sowohl die Induktion mit Angiotensin II und Actinomycin D als auch mit Angiotensin II und Cycloheximid ergaben keinen Anstieg der TGFβ-Werte.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 6 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Präparation, deren TGFβ mRNA-Expression 100 % entspricht.

4.2 Rolle des Transkriptionsfaktors AP1 für die TGF β mRNA-Expression

4.2.1 Angiotensin II-abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors AP1

AP1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher als Heterodimer aus c-fos/c-jun oder als Homodimer aus c-jun/c-jun zusammengesetzt ist. Um die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP1 bei der Angiotensin II-vermittelten Induktion von TGF β nachzuweisen, wurde seine Aktivierung mittels Retardation-Assay untersucht. Hierzu wurden aus isolierten Herzmuskelzellen Kernproteinextrakte gewonnen und deren Bindungsaffinität zu radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die eine AP1-Bindungsdomäne repräsentierten, bestimmt. Abb. 4.2.1 zeigt die AP1-Bindungsaktivität für Kernproteine aus Kardiomyozyten, die nicht mit Angiotensin II und solche, die mit Angiotensin II stimuliert wurden. Nach Angiotensin II-Induktion war ein deutlicher Anstieg der AP1-Bindungsaktivität feststellbar, was sich in einer stärker werdenden grauen Bande, in Abb. 4.2.1 mit AP1 bezeichnet, darstellte.

Abb.: 4.2.1

AP1-Bindungsaktivität

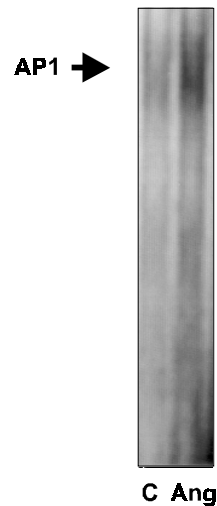


Abb. 4.2.1: Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 (AP1) nach Angiotensin II-Induktion. Das Bild zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus einem Retardation-Gel im Phosphor Imager. Dargestellt ist die Bindung von Kernproteinen an radioaktiv markierten Oligonukleotiden mit Homologie zur AP1-Bindungsstelle der DNA. Die beiden mit AP1 markierten Banden sind die im Gel langsamer laufenden radioaktiven Oligonukleotide mit angelagertem AP1-Komplex, wobei der unten im Bild zu sehende dunkelgraue Bereich die kleineren und damit schneller laufenden reinen Oligonukleotide darstellt. Die Kernproteine wurden aus Herzmuskelzellen nach einstündiger Induktion ohne Angiotensin II (C) und nach einstündiger Induktion mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) gewonnen.

4.2.2 „Decoy-Transfektion“ als spezifische Methode der Hemmung des Transkriptionsfaktors AP1

„Decoy-AP1“ ist ein Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zu der Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors AP1. Dieses Oligonukleotid fängt aktivierte AP1-Moleküle ab, so daß sie nicht an die AP1-Bindungsstelle des entsprechenden Gens binden können. Die Kardiomyozyten wurden mit „Decoy-AP1“

transfiziert und anschließend für eine Stunde zur Beurteilung der AP1-Bindungsaktivität und 24 Stunden für die Überprüfung der TGF β mRNA-Expression mit Angiotensin II induziert. Die TGF β mRNA-Expression in ausschließlich mit „Decoy-AP1“ behandelten Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Expression in unbehandelten Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt). Durch dieses Vorgehen läßt sich beurteilen, ob die unter 4.2.1 dargestellte Aktivierung von AP1 durch Angiotensin II kausal an der gesteigerten Expression von TGF β beteiligt ist. Abb. 4.2.2 zeigt, daß die Angiotensin II-induzierte Steigerung der TGF β mRNA-Expression durch Co-Transfektion mit „Decoy-AP1“ vollständig unterdrückt wird.

Abb.: 4.2.2

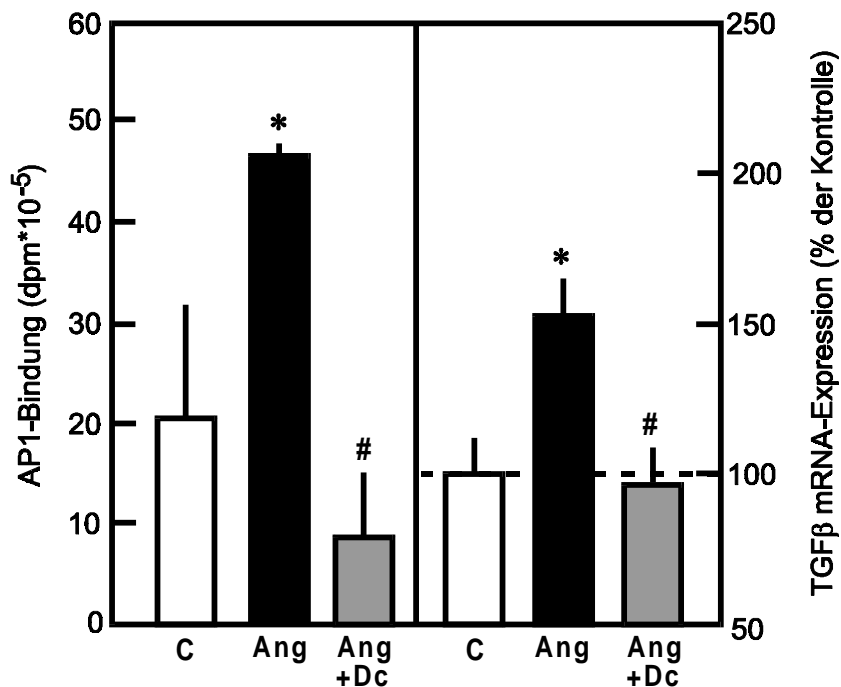


Abb. 4.2.2: links: AP1-Bindungsaktivität in Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (C) oder 60 Minuten nach Induktion mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) und Angiotensin II mit vorausgegangener vierstündiger Transfektion mit „Decoy- AP1“ (Dc, 10 μ g/ml Medium). Rechts: Entsprechende TGF β mRNA-Expression in diesen Zellen nach 24stündiger Inkubation mit Angiotensin II, Angiotensin II und „Decoy-AP1“ und unter Kontrollbedingungen (C). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 Experimenten. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Die mRNA-Expression der Kontrolle entspricht 100 %.

4.2.3 Hemmung der Angiotensin II-abhängigen Steigerung der c-fos mRNA-Expression und deren Abhängigkeit von einer Proteinkinase C-Aktivierung

Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor AP1 in der durch Angiotensin II hervorgerufenen Signalkaskade als Heterodimer (c-fos/c-jun) oder als Homodimer (c-jun/c-jun) aktiv ist, wurden frisch isolierte Kardiomyozyten für 60 Minuten mit Angiotensin II induziert und die c-fos mRNA-Expression mittels RT-PCR untersucht. Gegenüber unbehandelten Kontrollzellen war die c-fos mRNA-Expression nach Induktion mit Angiotensin II signifikant erhöht. Zu Überprüfung der Proteinkinase C-Abhängigkeit dieser Induktion wurden Herzmuskelzellen mit Bisindolylmaleimid (BIM), einem Inhibitor der Proteinkinase C, für 10-15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Angiotensin II induziert. Der durch alleinige Angiotensin II-Induktion hervorgerufene Anstieg der c-fos mRNA-Expression wurde durch eine Hemmung der Proteinkinase C-Aktivität signifikant inhibiert. Die Expression von c-fos nach alleiniger Inkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid zeigte gegenüber unbehandelten Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.2.3

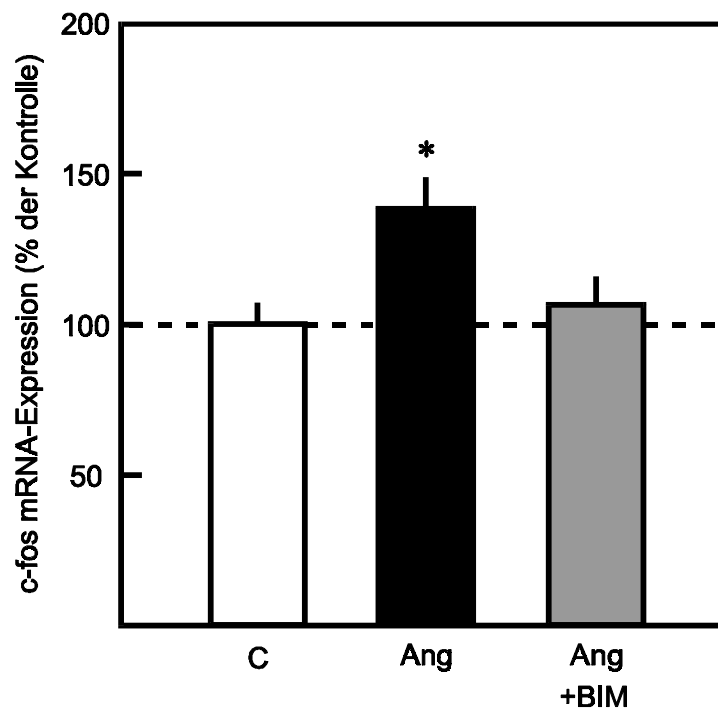


Abb. 4.2.3: c-fos mRNA-Expression in ventrikulären Herzmuskelzellen nach Inkubation für 60 Minuten mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l), oder Angiotensin II und Bisindolylmaleimid (BIM, 5 mmol/l) und unter Kontrollbedingungen (C). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 6$ Experimenten. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Die mRNA-Expression der Kontrolle entspricht 100 %.

4.2.4 Transfektion der Zellkultur mit c-fos Sense- und Antisense-Oligonukleotiden und anschließender Kontrolle der TGF β mRNA-Expression

Um die Bedeutung der c-fos mRNA-Expression für die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β mRNA-Expression zu überprüfen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten mit c-fos Sense- und Antisense-Oligonukleotiden für 16 Stunden transfiziert und anschließend mit Angiotensin II für 24 Stunden inkubiert. Bei der Transfektion der Zellen mit dem c-fos Sense-Oligonukleotid blieb der durch

Angiotensin II hervorgerufene Anstieg der TGF β mRNA-Expression unverändert hoch, wohingegen bei der Transfektion der Zellen mit dem c-fos Antisense-Oligonukleotid dieser Anstieg fast vollständig unterbunden wurde (Abb. 4.2.4). Die Ergebnisse wurden mittels RT-PCR erhoben, wobei zur Semiquantifizierung der Daten die TGF β -Werte auf die gleichzeitig erhobenen β Aktin-Werte normiert wurden. Die Daten zeigen, daß eine basale Expression des c-fos Moleküls, und damit die Möglichkeit der Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktors AP1, erforderlich ist für die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β mRNA-Expression.

Abb.: 4.2.4

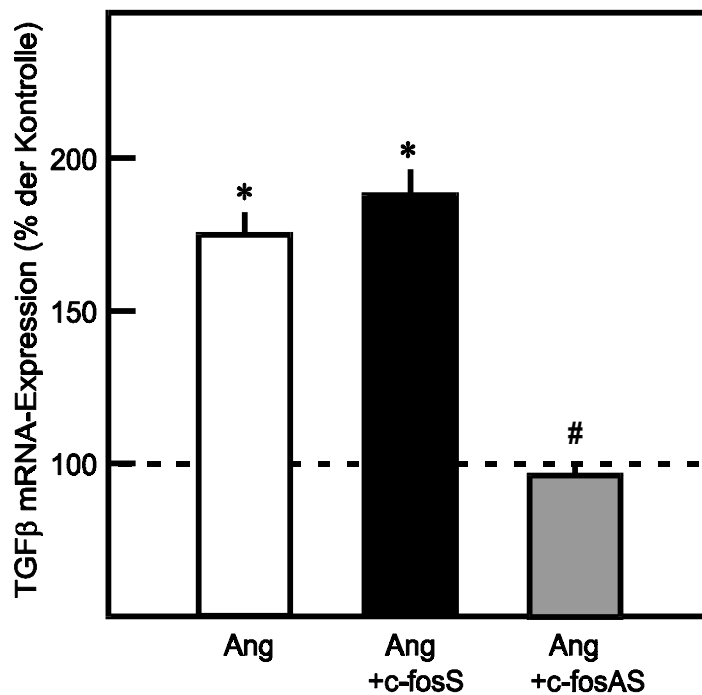


Abb. 4.2.4: In einem Balkendiagramm dargestellte TGF β mRNA-Expression nach Transfektion ventrikulärer Kardiomyozyten für 16 Stunden mit c-fos Sense- (c-fosS, 10 μ g/ml Medium) und Antisense- (c-fosAS, 10 μ g/ml Medium) Oligonukleotiden und anschließender 24stündiger Induktion der Zellen mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) oder alleiniger Angiotensin II-Stimulation ebenfalls für 24 Stunden. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus n = 3 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Präparation, deren TGF β mRNA-Expression 100 % entsprechen.

4.3 Rolle der p38 MAP–Kinase für die TGF β mRNA-Expression

4.3.1 Angiotensin II-abhängige Induktion der p38 MAP–Kinase

Als Maß für den Aktivierungsgrad der p38 MAP–Kinase ist die Stärke ihrer Phosphorylierung anzusehen. Zu deren Bestimmung wurden zwei identisch beladene und bearbeitete Gele mit zwei unterschiedlichen Antikörpern, von denen einer unspezifisch sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte, der andere lediglich die phosphorylierte Form der p38 MAP–Kinase bindet, behandelt.

Um eine Angiotensin II-vermittelte Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase zu untersuchen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten nach 0, 15, 30 und 60minütiger Inkubation mit Angiotensin II geerntet. Nach 30 und 60 Minuten war ein signifikanter Anstieg der p38 MAP–Kinase-Aktivität und somit ihrer vermehrten Phosphorylierung zu erkennen. Diese signifikante Angiotensin II-vermittelte Aktivitätssteigerung wurde durch die Vorinkubation der Zellen mit SB 202190, einem spezifischen Inhibitor der p38 MAP-Kinase, signifikant gehemmt (Abb. 4.3.1.2). Die alleinige Inkubation der Zellen mit SB 202190 ergab keinen signifikanten Unterschied der p38 MAP-Kinase-Aktivität gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.3.1.1

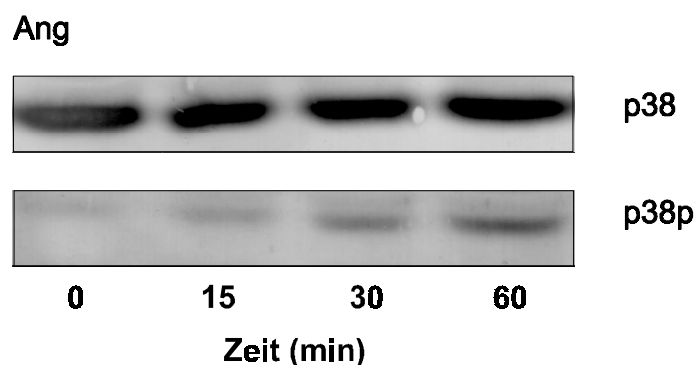


Abb. 4.3.1.1: Ausschnitt aus einem repräsentativen Western-Blot. Deutlich zu erkennen ist der graduelle Anstieg der Phosphorylierung (p38p) nach 30 und 60minütiger Inkubation mit Angiotensin II (Ang II, 100 nmol/l). Die Proteinextrakte der Zellen wurden in einem SDS–Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem phosphorspezifischen (p38p) und einem unspezifischen p38 MAP–Kinase Antikörper (p38) behandelt.

Abb.: 4.3.1.2

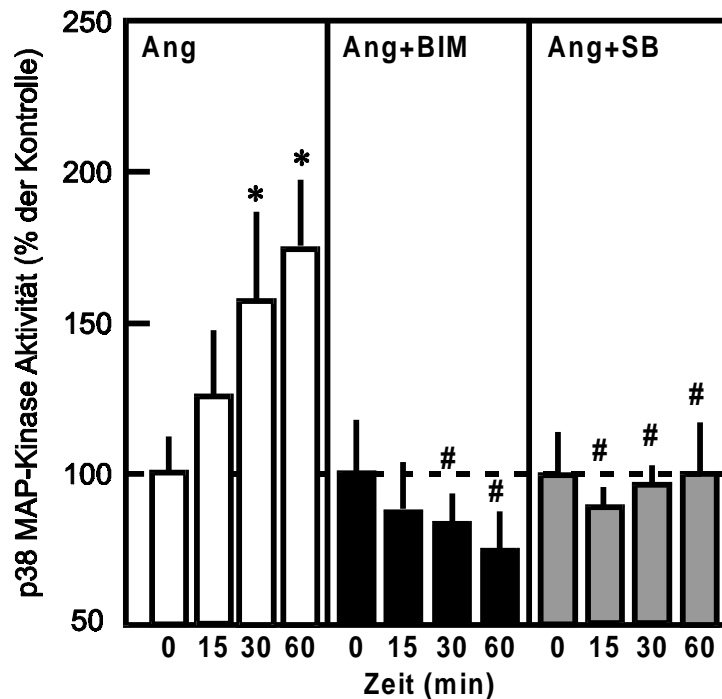


Abb. 4.3.1.2: Dargestellt ist die Zunahme der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach Angiotensin II-Induktion (Ang, 100 nmol/l) für 0, 15, 30 und 60 Minuten. Diese Angiotensin II-vermittelte Zunahme der Phosphorylierung war sowohl durch Vorinkubation der Zellen mit SB 202190 (SB, 1 μ mol/l) als auch durch Bisindolylmaleimid (BIM, 5 mmol/l) zu hemmen. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = < p 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation bei entsprechender zeitlicher Induktion. Als Kontrolle dienten die ermittelten Werte bei null Minuten. Diese Werte entsprechen 100 %.

4.3.2 Proteinkinase C-abhängige Induktion der p38 MAP-Kinase durch Angiotensin II

Zur Überprüfung einer Proteinkinase C-abhängigen Angiotensin II-vermittelten p38 MAP-Kinase-Aktivierung wurden ventrikuläre Kardiomyozyten mit Phorbolmyristate-acetate (PMA), einem direkten Aktivator der Proteinkinase C, für 60 Minuten induziert. Anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad der p38 MAP-

Kinase kontrolliert. Ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungsgrades der p38 MAP-Kinase wurde nach 30 bzw. 60minütiger Inkubation beobachtet (Abb. 4.3.2). Diese Proteinkinase C-abhängige Aktivitätssteigerung wurde sowohl bei Vorinkubation der Zellen mit SB 202190 als auch mit Bisindolylmaleimid (BIM) inhibiert (Abb.4.3.2). Zusätzlich wurde gezeigt, daß Bisindolylmaleimid ebenfalls in der Lage ist, die Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38 MAP-Kinase in mit Angiotensin II-induzierten Zellen zu inhibieren (Abb. 4.3.1), Dies läßt den Schluß zu, daß die Angiotensin II-abhängige Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase ein Proteinkinase C-abhängiger Weg ist. Die alleinige Inkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid ergab keinen signifikanten Unterschied der p38 MAP-Kinase-Aktivität gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.3.2

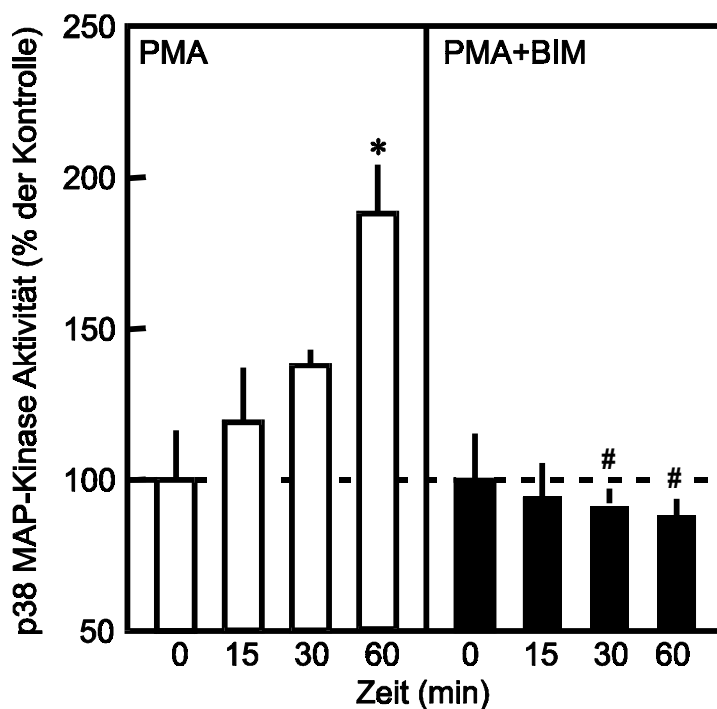


Abb. 4.3.2: In einem Balkendiagramm dargesteller Verlauf des graduellen Anstiegs der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach Phorbol-myristate-acetate-Induktion (PMA, 100 nmol/l) für 0, 15, 30 und 60 Minuten; im Vergleich dargestellt ist die Inhibierung der Zunahme der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach Vorinkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid (BIM, 5 μ mol/l). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 6 Experimenten. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation bei entsprechender zeitlicher Induktion. Die erhobenen Werte nach null Minuten dienten als Kontrolle und entsprechen 100 %.

4.3.3 p38 MAP–Kinase-abhängige Steigerung der TGF β mRNA-Expression

Um die Wichtigkeit der p38 MAP–Kinase für die Steigerung der TGF β mRNA-Expression zu überprüfen, wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen mit SB 202190 vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Angiotensin II stimuliert. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, daß der signifikante Angiotensin II-induzierte Anstieg der TGF β mRNA-Expression durch den Inhibitor der p38 MAP–Kinase, SB 202190, vollständig unterbunden wurde. Eine Proteinkinase C-abhängige, Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β mRNA-Expression wurde durch deren Inhibierung mit Bisindolylmaleimid bewiesen. Ein signifikanter Anstieg der TGF β mRNA-Expression konnte auch durch eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C mit Phorbol-myristate-acetate (PMA) induziert werden. Auch hier war eine Hemmung dieses Anstieges durch Vorinkubation der Zellen mit SB 202190 und Bisindolylmaleimid möglich (Abb. 4.3.3). Bei alleiniger Inkubation der Zellen mit SB 202190 bzw. Bisindolylmaleimid konnten keine signifikanten Unterschiede gegenüber der TGF β mRNA-Expression unbehandelter Kontrollzellen gefunden werden (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.3.3

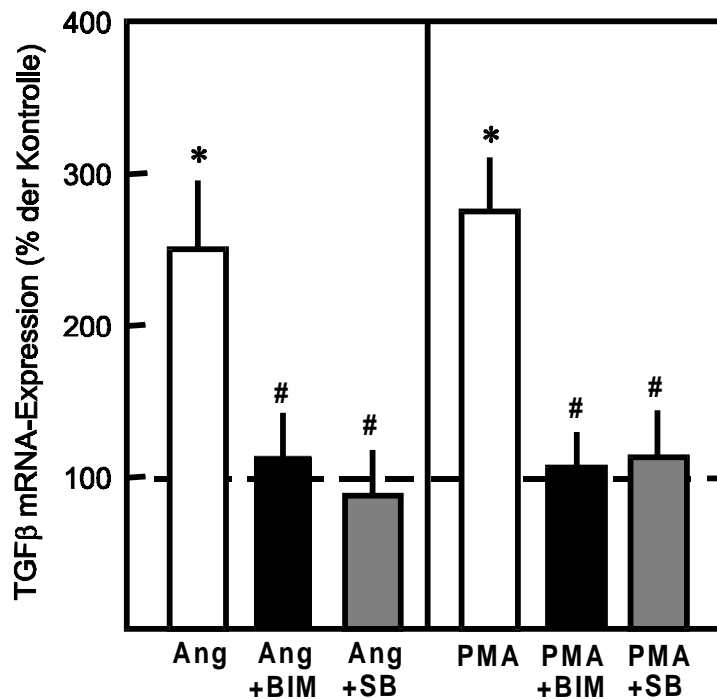


Abb. 4.3.3: Dargestellt ist die TGFβ mRNA-Expression in Kardiomyozyten 24 Stunden nach Inkubation mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l), Angiotensin II und Bisindolylmaleimid (BIM, 5 mmol/l), Angiotensin II und SB 202190 (SB, 1 μmol/l), Phorbol-myristate-acetate (PMA, 100 nmol/l), PMA und BIM oder PMA und SB. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Experimenten. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Präparation, deren TGFβ mRNA-Expression 100 % entsprechen.

4.4 Kreuzreaktivität von Angiotensin II mit EGF-Rezeptoren und Tyrosinkinasen

Literaturangaben ist zu entnehmen, daß Angiotensin II in Fibroblasten des Herzens die p38 MAP-Kinase über eine Kreuzreaktivität mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und daraus resultierender Koaktivierung von Tyrosinkinasen aktiviert. Um eine solche Kreuzreaktivität in ventrikulären

Herzmuskelzellen auszuschließen, wurden isolierte Zellen zum einem mit Genistein (100 $\mu\text{mol/l}$), einem Proteinkinase-Inhibitor mit starker Präferenz zu Tyrosin-spezifischen Kinasen, und zum anderen mit AG 1478 (1 $\mu\text{mol/l}$), einem spezifischen EGF-Rezeptor-Antagonisten, vorinkubiert und anschließend mit Angiotensin II für 24 Stunden stimuliert. Tab. 4.4 zeigt, daß von den beiden verwendeten Inhibitoren nur Genistein in der Lage war, die Angiotensin II-induzierte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase signifikant zu hemmen, was den Schluß zuläßt, daß Angiotensin II an Herzmuskelzellen die p38 MAP-Kinase nicht über eine Kreuzreaktivität, sondern direkt aktiviert. Genistein und AG 1478 bewirkten bei alleiniger Inkubation keinen signifikanten Unterschied in der p38 MAP-Kinase-Aktivität gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

Tab.: 4.4

Versuchsbedingungen	0 min	15 min	30 min	60 min
Angiotensin II	1,00 \pm 0,12	1,26 \pm 0,21	1,59 \pm 0,39*	1,76 \pm 0,22*
AG 1478	1,00 \pm 0,19	0,74 \pm 0,23	0,79 \pm 0,27	0,76 \pm 0,15
Angiotensin II + AG 1478	1,00 \pm 0,16	1,26 \pm 0,19	1,58 \pm 0,25* #	1,93 \pm 0,44* #
Genistein	1,00 \pm 0,17	0,78 \pm 0,37	0,83 \pm 0,19	0,90 \pm 0,14
Angiotensin II + Genistein	1,00 \pm 0,11	0,71 \pm 0,23	0,82 \pm 0,16	0,96 \pm 0,37

Tab. 4.4: In der Tabelle aufgeführt ist die Aktivität der p38 MAP-Kinase nach Inkubation adulter Herzmuskelzellen mit Angiotensin II (100 nmol/l) alleine oder in Anwesenheit von AG1478 (1 $\mu\text{mol/l}$) oder Genistein (100 $\mu\text{mol/l}$). Zur Kontrolle wurden Zellen alleine mit Genistein bzw. mit AG 1478 inkubiert. Als Maß für die p38 MAP-Kinase-Aktivität wurde der Grad der Zunahme ihrer Phosphorylierung im Vergleich zur basalen Phosphorylierung (null Minuten) angegeben. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus n = 6 Experimenten * = p < 0,05 versus Kontrolle (null Minutenwerte der jeweiligen Versuchsbedingung). # = p < 0,05 versus alleiniger AG 1478-Stimulation bei entsprechender zeitlicher Induktion.

4.5 Einfluß von Radikalfängern auf die Angiotensin II-vermittelte p38 MAP-Kinase-Aktivierung bzw. Steigerung der TGF β mRNA-Expression

4.5.1 Beeinflussung der Angiotensin II-abhängigen p38 MAP-Kinase-Aktivierung durch N-Acetylcystein und Vitamin C

Aufgrund verschiedener Veröffentlichungen bezüglich radikalabhängiger Angiotensin II-vermittelter Signalkaskaden in anderen Zelltypen – so z. B. in vaskulären Glattmuskelzellen - , stellte sich die Frage, ob auch in Herzmuskelzellen Angiotensin II radikalabhängig die TGF β mRNA-Expression steigert.

Um die vermutete Beteiligung an der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β mRNA-Expression zu verifizieren, wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen mit Vitamin C (Vit C, 1 mmol/l) und N-Acetylcystein (NAC, 1 mmol/l) – beides Antioxidantien – vorinkubiert und anschließend für 60 Minuten mit Angiotensin II stimuliert. Der Phosphorylierungsgrad der p38 MAP-Kinase wurde untersucht. Es war eine deutlich geringere Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Gegenwart der Radikalfänger zu erkennen (Tab. 4.5.1). Die alleinige Inkubation der Zellen mit Vitamin C und N-Acetylcystein bewirkte keinen signifikanten Unterschied in der p38 MAP-Kinase-Aktivität verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen.

Abb.: 4.5.1

Versuchsbedingungen	0 min	15 min	30 min	60 min
Angiotensin II	1,00±0,12	1,26±0,21	1,59±0,39*	1,76±0,22*
Vitamin C	1,00±0,09	1,02±0,44	0,75±0,37	0,82±0,57
Angiotensin II + Vit C	1,00±0,14	0,98±0,17	0,99±0,16	0,90±0,21
N-Acetylcystein	1,00±0,16	1,03±0,07	0,85±0,14	1,00±0,40
Angiotensin II +NAC	1,00±0,09	1,03±0,33	0,81±0,14	0,75±0,06

Tab. 4.5.1: In der Tabelle aufgeführt ist die Aktivität der p38 MAP-Kinase nach Inkubation adulter Herzmuskelzellen mit Angiotensin II (100 nmol/l) alleine oder in Anwesenheit von N-Acetylcystein (NAC, 1 mmol/l) oder Vitamin C (Vit C, 100 µmol/l). Zur Kontrolle wurden Zellen der gleichen Präparation nur mit Vitamin C bzw. mit N-Acetylcystein inkubiert. Als Maß für die p38 MAP-Kinase-Aktivität wurde der Grad der Zunahme ihrer Phosphorylierung im Vergleich zur basalen Phosphorylierung (null Minuten) angesehen. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM aus n = 6 Experimenten * = p < 0,05 versus Kontrolle (null Minutenwerte der jeweiligen Versuchsbedingung).

4.5.2 Bedeutung von Vitamin C und N-Acetylcystein für die Steigerung der TGFβ mRNA-Expression nach Angiotensin II-Induktion

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der Verringerung des reaktiven Redoxpotentials und der Angiotensin II-abhängigen Steigerung der TGFβ mRNA-Expression zu überprüfen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten mit Vitamin C bzw. N-Acetylcystein für 10–15 Minuten vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Angiotensin II stimuliert. Nach dem Ernten der Zellen wurde mittels

RT-PCR die Stärke der TGF β mRNA-Expression bestimmt. Sowohl Vitamin C als auch N-Acetylcystein waren in der Lage, die Steigerung der TGF β mRNA-Expression nach Angiotensin II-Stimulation signifikant abzuschwächen (Tab. 4.5.2).

Tab.: 4.5.2

Versuchsbedingungen	TGF β / β Aktin (%)
Kontrolle	100,0 \pm 0,11
Angiotensin II	151,7 \pm 19,4*
Vitamin C	100,0 \pm 23,6
Angiotensin II + Vit C	99,8 \pm 18,1
N-Acetylcystein	100,0 \pm 17,8
Angiotensin II + NAC	100,4 \pm 21,0

Tab. 4.5.2: Dargestellt ist die TGF β mRNA-Expression ventrikulärer Herzmuskelzellen normiert auf die β Aktin-Werte der gleichen Zellen. Die Zellen wurden mit Vitamin C (Vit C, 100 μ mol/l) und N-Acetylcystein (NAC, 1 mmol/l) für 10–15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Angiotensin II für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrollen für die alleinige Angiotensin II-Induktion stammten aus den gleichen Zellpräparationen und wurden unbehandelt unter ansonsten identischen Bedingungen ebenfalls nach 24 Stunden geerntet. Zur Kontrolle der Werte nach Angiotensin II- und Vitamin C-Induktion dienten Zellen der gleichen Präparation, die nur mit Vitamin C behandelt wurden. Ebenso diente die alleinige N-Acetylcystein-Induktion als Kontrolle zur Angiotensin II und N-Acetylcystein-Induktion. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus n = 6 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle.

4.6 Beteiligung einer kardiomyozytären NAD(P)H-Oxidase bei der Aktivierung der p38 MAP-Kinase

4.6.1 Einfluß von Diphenylium Iodid, phox22 Sense und Antisense und mox Sense und Antisense auf die Angiotensin II-vermittelte Aktivierung der p38 MAP-Kinase

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Enzym, welches in der Lage ist, Radikale (im Speziellen Sauerstoffradikale) als Produkt zu bilden. Es wurde postuliert, daß dieses Enzym an der Radikalabhängigkeit des Angiotensin II-vermittelten Effektes auf die Steigerung der TGF β mRNA-Expression beteiligt ist. Es sind zwei Typen dieser NAD(P)H-Oxidase bekannt, der leukozytäre und der glattmuskuläre Typ, welche sich in der Ausbildung ihrer Untereinheiten und in ihrem Vorkommen unterscheiden. Als gemeinsame Untereinheiten besitzen beide phox22, p67, rac und p47. Als membranständige Untereinheit besitzt die glattmuskuläre Form desweiteren noch mox und die leukozytäre Form gp91. Von Endothelzellen ist bekannt, daß sie den leukozytären Typ dieser Oxidase exprimieren.

Um eine Beteiligung von Flavoenzymen in der Enzymkaskade der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β mRNA-Expression zu überprüfen, wurden Zellen mit Diphenylium Iodid (DPI, 10 μ mol/l), einem Inhibitor von Flavoenzymen, vorinkubiert und anschließend mit Angiotensin II für 60 Minuten stimuliert. Diphenylium Iodid inhibierte bei Angiotensin II-stimulierten Zellen die Aktivierung der p38 MAP-Kinase signifikant, zeigte jedoch in Kontrollversuchen alleine keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität der p38 MAP-Kinase (die Daten sind nicht gezeigt). Da Diphenylium Iodid die Aktivität sämtlicher Flavoenzyme, einschließlich die der NAD(P)H-Oxidase, hemmt, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten mit phox22 Sense- und Antisense-Oligonukleotiden (10 μ g/ml Medium) für 16 Stunden transfiziert und anschließend mit Angiotensin II induziert. Eine Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase konnte lediglich bei vorheriger Transfektion der Zellen mit dem phox22 Sense-Oligonukleotid beobachtet werden. Transfektion der Zellen mit dem phox22 Antisense-Oligonukleotid bewirkte keine

signifikante Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase, was den Schluß zuläßt, daß eine der beiden Typen der NAD(P)H-Oxidase an der Angiotensin II-vermittelten Enzymkaskade beteiligt ist (Abb. 4.6.1).

Um die mögliche Isoform näher zu untersuchen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten mit mox Sense- und Antisense-Oligonukleotiden (10 µg/ml Medium) ebenfalls für 16 Stunden transfiziert und anschließend mit Angiotensin II inkubiert (Abb. 4.6.1). Mox ist eine spezifische membranständige Untereinheit der glattmuskulären Form der NAD(P)H-Oxidase. Auch hier war nur nach Transfektion der Zellen mit dem mox Sense-Oligonukleotid und anschließender Angiotensin II-Inkubation ein signifikanter Anstieg der p38 MAP-Kinase Aktivität zu erkennen, wohingegen durch die Transfektion der Zellen mit dem mox Antisense-Oligonukleotid der Angiotensin II-vermittelte Anstieg der p38 MAP-Kinase-Aktivität unterbunden wurde.

Abb.: 4.6.1

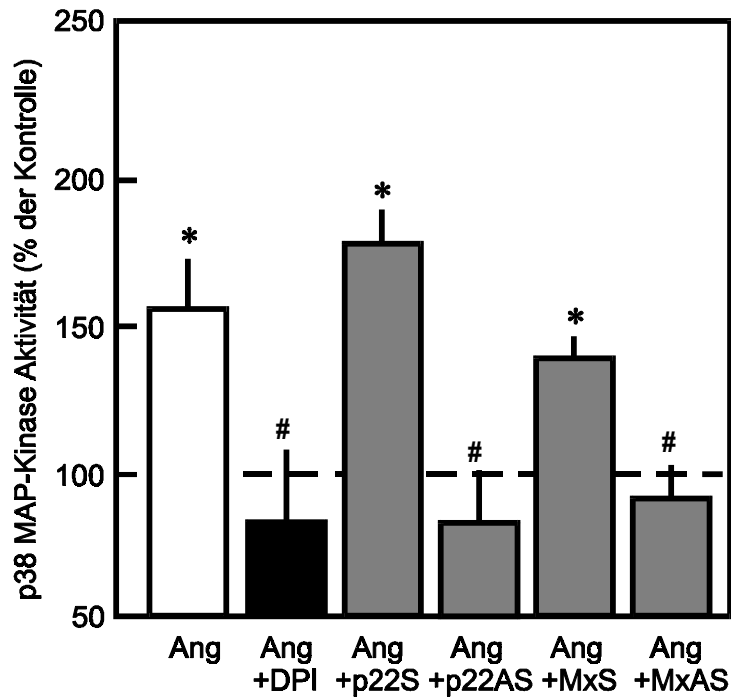


Abb. 4.6.1: Dargestellt ist die p38 MAP-Kinase-Aktivität. Die Zellen wurden mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) induziert oder mit Diphenylium Iodid (DPI, 10 μ mol/l) vorinkubiert oder mit phox22 Sense- (p22S, 10 μ g/ml Medium) und Antisense- (p22AS, 10 μ g/ml Medium) und mit mox Sense- (MxS, 10 μ g/ml Medium) und Antisense-Oligonukleotiden (MxAS, 10 μ g/ml Medium) für 16 Stunden transfiziert und anschließend für 60 Minuten mit Angiotensin II stimuliert. Die Zunahme der Phosphorylierung wurde mit der Stärke der Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen (null Minuten) verglichen. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Die Kontrollbedingungen entsprechen 100 %.

4.6.2 Oxidation von NADH und NADPH

Als weiteren Nachweis für eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase wurde der Verbrauch bzw. die Oxidation von NADH und NADPH gemessen. Hierzu wurden sowohl bei ventrikulären Kardiomyozyten als auch bei kultivierten Endothelzellen der Rattenaorta 250 $\mu\text{mol/l}$ NADH oder NADPH zu den Kulturmedien hinzugegeben und nach Induktion der Zellen mit Angiotensin II für 60 Minuten der Verbrauch im Überstand photometrisch bestimmt. Bei Kardiomyozyten stieg unter Angiotensin II-Einfluß sowohl der Verbrauch von NADH als auch der von NADPH signifikant an. Das läßt, wie auch die Hemmbarkeit der p38 MAP-Kinase-Phosphorylierung durch das mox Antisense-Oligonukleotid, den Schluß zu, daß in Herzmuskelzellen der glattmuskuläre Typ der NAD(P)H-Oxidase, welcher beide Substrate verwendet, vorhanden ist. Im Gegensatz dazu war Angiotensin II bei Endothelzellen lediglich in der Lage, den Verbrauch von NADPH nicht aber den von NADH zu steigern. In Endothelzellen wird der leukozytäre Typ der NAD(P)H-Oxidase exprimiert. In beiden Zelltypen konnte die Oxidation von NADH bzw. NADPH signifikant durch Diphenylium Iodid inhibiert werden (Abb. 4.6.2), eine alleinige Behandlung der Zellen mit Diphenylium Iodid zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der NADH/NADPH-Oxidation gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt).

Abb.: 4.6.2

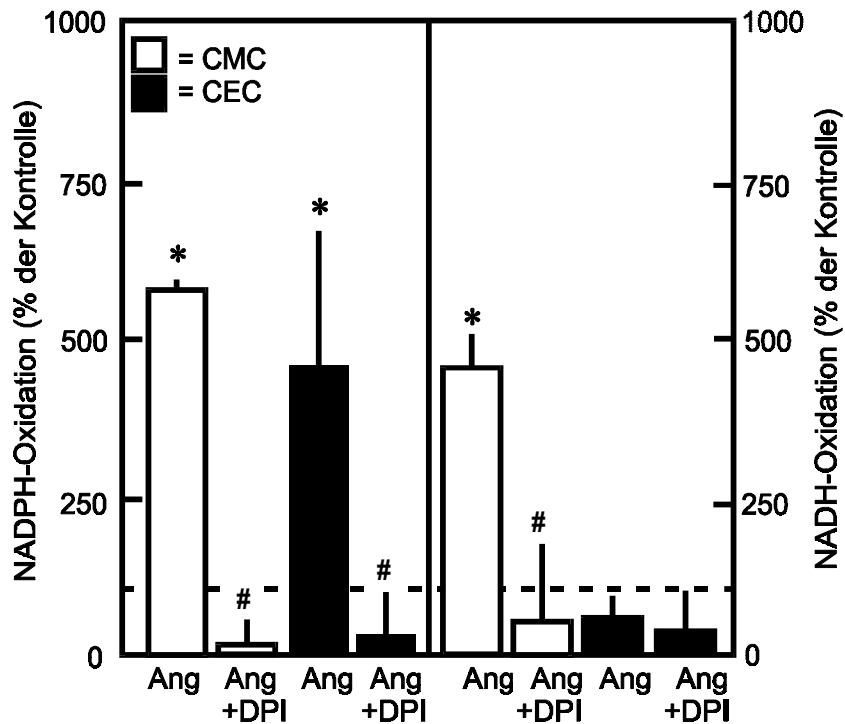


Abb. 4.6.2: Dargestellt ist der Verbrauch von NADH und NADPH in ventrikulären Herzmuskelzellen (CMC) und in koronaren Endothelzellen (CEC) nach Induktion der Zellen mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) und Angiotensin II unter Zugabe von Diphenylium Iodid (DPI, 5 μ mol/l). Die Zellen wurden für 60 Minuten mit Angiotensin II induziert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 8 Experimenten. * = p < 0,05 versus Kontrolle (unbehandelte Zellen der gleichen Präparation). # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Der NADH-Verbrauch un behandelter Kontrollzellen entspricht 100 %.

4.6.3 Expression von phox22 in ventrikulären Kardiomyozyten

Zum abschließenden Nachweis des Vorhandenseins einer NAD(P)H-Oxidase wurde in ventrikulären Kardiomyozyten mittels RT-PCR die Expression von phox22, eine in beiden Formen vorkommende Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, untersucht. Es konnte eine Bande nachgewiesen werden, die in ihrer Laufhöhe der Größe des gesuchten Sequenzabschnittes entspricht (Abb. 4.6.3).

Abb.: 4.6.3

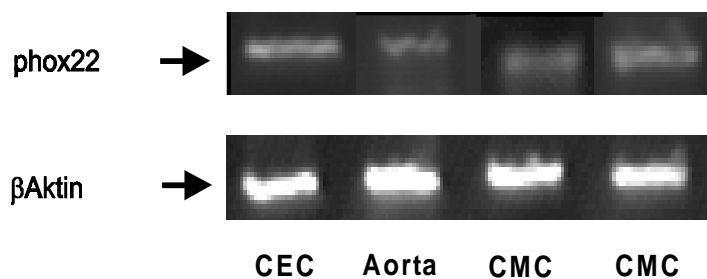


Abb. 4.6.3: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Agarose-Gel nach Amplifikation der cDNA mit Oligonukleotiden für phox22 (33 Zyklen) und βAktin (20 Zyklen). Die cDNA wurde aus der mRNA von isolierten ventrikulären Kardiomyozyten (CMC), aus ganzen Aorten der Ratte (Aorta) und aus koronaren Endothelien (CEC) der Ratte gewonnen. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zu Kontrollzwecken wurde gleichzeitig die βAktin-Expression bestimmt.

4.7 Kreuzreaktivität von Angiotensin II-vermittelten Signalschritten und der NAD(P)H-Oxidase in Kardiomyozyten

4.7.1 Stellung der NAD(P)H-Oxidase in der durch Angiotensin II induzierten Enzymkaskade

Um die Stellung der NAD(P)H-Oxidase bezüglich der p38 MAP-Kinase, der Proteinkinase C und des Transkriptionsfaktors AP1 in der durch Angiotensin II hervorgerufenen Enzymkaskade zu bestimmen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten mit SB 202190, Genistein und Bisindolylmaleimid für 10–15 Minuten vorinkubiert, für 60 Minuten mit Angiotensin II stimuliert und anschließend der Verbrauch von NADH photometrisch bestimmt. Die alleinige Inkubation der Zellen mit SB 202190, Genistein und Bisindolylmaleimid zeigte in der Menge des NADH-Verbrauches keinen signifikanten Unterschied zu dem unbehandelten Kontrollzellen (die Daten sind nicht gezeigt). Das Kulturmedium enthielt 250 $\mu\text{mol/l}$ NADH. Der erhöhte Verbrauch an NADH, hervorgerufen durch eine Angiotensin II-Induktion, wurde durch alle drei Substanzen nicht beeinflusst, wohingegen diese Substanzen die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase inhibieren konnten. In einem weiteren Versuch war bei direkter Stimulation der Proteinkinase C durch Phorbol-myristate-acetate kein erhöhter Verbrauch an NADH zu messen (Abb. 4.7.1). Das läßt den Schluß zu, daß der radikalabhängige Zwischenschritt und damit die NAD(P)H-Oxidase unmittelbar an erster Stelle in der Signalkaskade nach der Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor steht.

4.7.2 Rolle von phox22 für den NADH-Verbrauch

Zu Kontrollzwecken wurden Zellen mit phox22 Sense- und Antisense-Oligonukleotiden für 16 Stunden transfiziert und anschließend mit Angiotensin II für 60 Minuten inkubiert. Der NADH-Verbrauch war nur nach Transfektion der Zellen mit dem phox22 Antisense-Oligonukleotid signifikant gehemmt, wohingegen dieser Verbrauch bei Zellen, die mit phox22 Sense transfiziert wurden, gegenüber dem

Verbrauch bei ausschließlich mit Angiotensin II-induzierten Zellen, nicht vermindert war (Abb. 4.7.1).

Abb.: 4.7.1

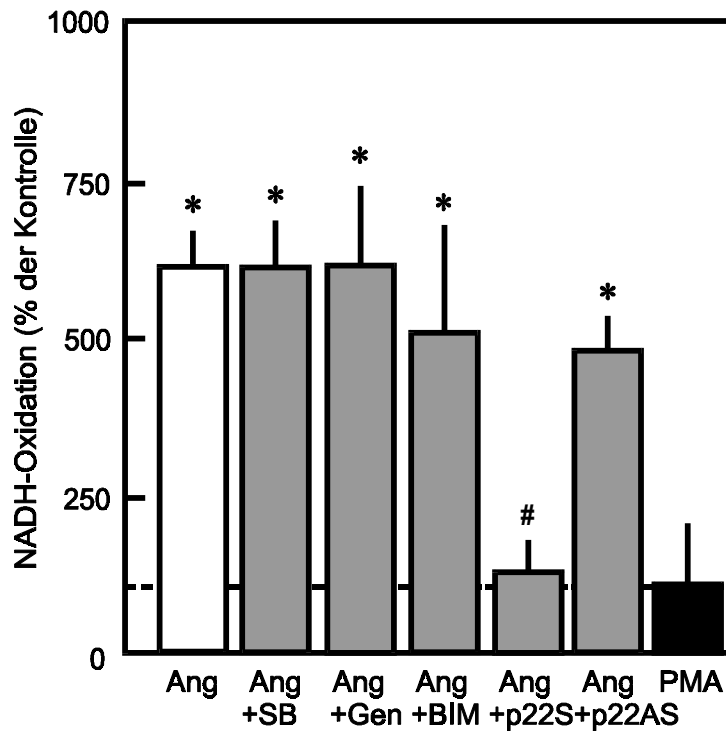


Abb. 4.7.1: Dargestellt ist der Verbrauch von NADH in ventrikulären Kardiomyozyten nach alleiniger Inkubation der Zellen mit Angiotensin II (Ang, 100 nmol/l) für 1 Stunde und nach Vorinkubation mit SB 202190 (SB, 1 μ mol/l), Genistein (Gen, 100 μ mol/l) oder Bisindolylmaleimid (BIM, 5 μ mol/l) und anschließender Angiotensin II-Inkubation. Außerdem wurden Zellen mit phox22 Sense- (p22S, 10 μ g/ml Medium) und mit phox22 Antisense- Oligonukleotiden (p22AS, 10 μ g/ml Medium) für 16 Stunden transfiziert und anschließend für eine Stunde mit Angiotensin II inkubiert. Zusätzlich zu dieser Versuchsreihe wurden Zellen mit Phorbol-myristate-acetate (PMA, 100 nmol/l) ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM aus n = 8 Experimenten. * = p < 0,05 versus Kontrolle. # = p < 0,05 versus alleiniger Angiotensin II-Stimulation. Der NADH-Verbrauch unbehandelter Kontrollzellen entspricht 100 %.

5 Diskussion

Diese Studie charakterisiert in-vitro-Signaltransduktionsschritte, die entscheidend sind für den Angiotensin II-induzierten Anstieg der TGF β -Expression in adulten ventrikulären Herzmuskelzellen. Das Zytokin TGF β ist in der Pathophysiologie der Myokardhypertrophie deswegen interessant, weil es vor allem im Übergang von kompensierter zu dekompenzierter Form die hypertrophe Ansprechbarkeit für β -adrenerge Stimulation oder Neuropeptid Y verstärkt, ohne jedoch direkt wachstumsinduzierend zu wirken (Schlüter et al., 1995; Goldberg et al., 1998). Die Signalschritte, mit denen Angiotensin II eine Steigerung der TGF β -Expression in ventrikulären Herzmuskelzellen bewirkt, sind bislang jedoch wenig erforscht.

Als entscheidende neue Erkenntnisse dieser Studie sind:

1. die Beteiligung eines radikalabhängigen Zwischenschrittes, hier im speziellen die Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase,
2. die darauffolgende Aktivierung von Protein- bzw. Tyrosinkinase,
3. eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase und
4. die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP1

zu nennen.

Um die komplexen systemischen und hämodynamischen Interaktionen zu umgehen, wurde die Signaltransduktion von Angiotensin II bis zu TGF β anhand eines Zellkulturmodells isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten untersucht. In den verwendeten Kulturen waren die isolierten Kardiomyozyten von definierten Kulturmedien und Wirkstoff-Konzentrationen umgeben und mechanisch inaktiv. Der Einfluß der verwendeten Agentien auf die untersuchten Enzymkaskaden

konnte deshalb unabhängig von anderen humoralen und mechanischen Einflüssen untersucht werden.

Da die Myokardhypertrophie vor allem im Erwachsenenalter klinisch relevant ist, war es sinnvoll, die Signaltransduktion der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β -Expression an ventrikulären Herzmuskelzellen adulter Tiere zu untersuchen.

5.1 Bedeutung des Transkriptionskomplexes AP1 für die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β -Expression

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor AP1 in vaskulären Glattmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei einer Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β -Expression spielt (Morishita et al., 1998). Angiotensin II ist in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte in der Lage, die Aktivität des Transkriptionskomplexes AP1 signifikant zu steigern. Um diese Aktivitätssteigerung zu überprüfen, wurden Herzmuskelzellen mit „Decoy-AP1“ transfiziert. Dieses Oligonukleotid fängt selektiv mit seiner komplementären Sequenz zu dem aktiven AP1-Komplex diese Moleküle ab und verhindert somit seine Bindung an die AP1-Bindungsstelle von dadurch gebundenen Genen. „Decoy-AP1“ verhinderte in der vorliegenden Studie signifikant eine Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β -Expression. Im Gegensatz zu anderen Studien, die aus einer vermehrten c-fos-Expression eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP1 vermuteten, konnte hier durch die „Decoy-AP1“-Experimente gezeigt werden, daß die Angiotensin II-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 ein essentieller Schritt für die Steigerung der TGF β -Expression ist.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß für eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionskomplexes AP1 eine Neusynthese von Untereinheiten (Proteinen) nicht zwingend notwendig ist. Denn nach Vorinkubation mit dem Translationshemmer Cycloheximid war Angiotensin II immer noch in der Lage, die TGF β -Expression signifikant zu steigern. Daraus läßt sich schließen, daß Angiotensin II die Bildung

eines aktiven Komplexes aus bereits existierenden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP1, die auch unter nicht-stimulierten Bedingungen vorhanden sind, initiiert. Die signifikante Inhibierung der durch Angiotensin II induzierten Aktivitätssteigerung des Transkriptionskomplexes AP1 durch „Decoy-AP1“ läßt diesen Schluß ebenfalls zu. Zusätzlich zu diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionskomplexes AP1 zwar unabhängig von einer Neusynthese seiner Untereinheiten stattfinden kann, Angiotensin II aber dennoch in der Lage ist, die Expression von c-fos signifikant zu steigern. Der Transkriptionsfaktor AP1 kann entweder als Homodimer aus den Untereinheiten c-jun/c-jun aufgebaut sein, oder als Heterodimer aus c-fos/c-jun gebildet werden. Die heterodimere Form scheint jedoch für die hier untersuchte Angiotensin II-vermittelte Induktion von TGF β die entscheidende zu sein. In Kardiomyozyten, die mit Antisense-Oligonukleotiden gegen c-fos transfiziert wurden, konnte Angiotensin II die Expression von TGF β nicht steigern.

Abb.: 5.1

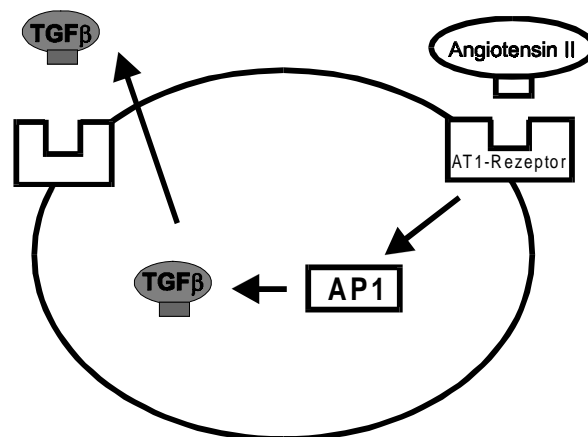


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der aus den Ergebnissen gewonnenen Vorstellung von der in adulten Herzmuskelzellen ablaufenden Signaltransduktion während der durch Angiotensin II hervorgerufenen gesteigerten TGF β -Expression. Angiotensin II, das nach Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems vermehrt gebildet wird, bindet an den AT1-Rezeptor und steigert dadurch über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 (AP1) die TGF β -Expression. (In dieser und in den nachfolgenden Abbildungen sind die gemessenen Parameter grau hinterlegt.)

5.2 Rolle der p38 MAP-Kinase

In der vorliegenden Arbeit wurde weiter untersucht, inwieweit die p38 MAP-Kinase Einfluß auf die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β -Expression in ventrikulären Kardiomyozyten ausübt. An anderen Zellenarten wurde in früheren Studien eine p38 MAP-Kinase-abhängige Steigerung der c-fos-Expression gezeigt (Tharaux et al., 2000). Die vorliegende Studie zeigt eine Proteinkinase C-abhängige Aktivitätssteigerung des Transkriptionskomplexes AP1 und der p38 MAP-Kinase nach Angiotensin II-Stimulation. Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Untersuchungen überein, die eine Proteinkinase C-abhängige Steigerung der p38 MAP-Kinase bei „ischämischem Preconditioning“ in Rattenherzen beschreiben (Baines et al., 1999). Unter den von Baines gewählten Bedingungen führt eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Ko-Aktivierung von Tyrosinkinasen, die wiederum p38 MAP-Kinasen aktivieren. Eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Angiotensin II in ventrikulären Herzmuskelzellen kann durch Vorinkubation der Zellen mit Genistein, einem Inhibitor von Tyrosinkinasen, signifikant inhibiert werden. An Fibroblasten des Herzens konnte gezeigt werden, daß Angiotensin II eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionskomplexes AP1 über einen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor bewirkt (Moriguchi et al., 1999). An Herzmuskelzellen hingegen konnten keine Hinweise auf eine solche Kreuzreaktion gefunden werden. Eine spezifische Inhibition dieser Protein-Tyrosinkinasen durch AG 1478 hatte keinen Einfluß auf die Angiotensin II-induzierte Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase. Somit stimmen die hier gewonnenen Resultate mit Ergebnissen an myogenen Zellen überein, in denen Angiotensin II über eine Proteinkinase C bzw. über Tyrosinkinasen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 bewirkt (Puri et al., 1995). Ganz im Gegensatz dazu bewirkt Angiotensin II in kardialen Fibroblasten eine Aktivitätssteigerung dieses Transkriptionsfaktors über eine Kreuzreaktivität mit einem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor über einen Proteinkinase C-unabhängigen Weg.

Abb.: 5.2

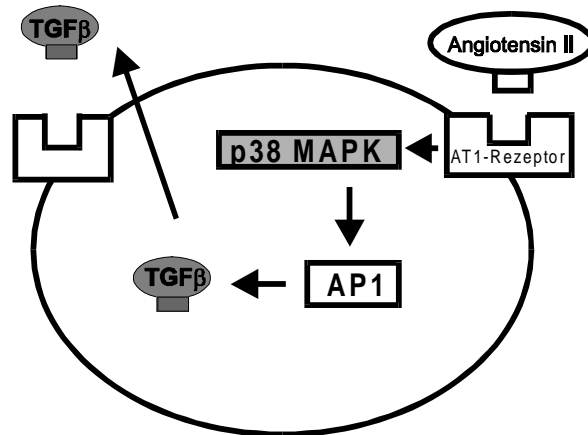


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Bedeutung der p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) bei der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β -Expression in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Angiotensin II bewirkt über eine Bindung an den AT1-Rezeptor eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase mit darauffolgender Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 (AP1), die in einer vermehrten Steigerung der TGF β -Expression mündet.

5.3 Rolle Redox-sensitiver Signaltransduktionsschritte

Von anderen Zelltypen ist bekannt, daß die Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Angiotensin II über einen Redox-sensitiven Zwischenschritt erfolgt (Viedt et al., 2000). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch in ventrikulären Herzmuskelzellen adulter Ratten eine solche Aktivierung und die daraus resultierende Steigerung der TGF β -Expression ebenfalls über einen Redox-sensitiven Signalschritt erfolgt. Die Ergebnisse in der hier vorgestellten Studie zeigen, daß nach Zugabe von Antioxidantien, wie z. B. Vitamin C oder N-Acetylcystein, sowohl eine verminderte Aktivierung der p38 MAP-Kinase als auch eine verminderte Expression von TGF β nach Angiotensin II-Induktion zu beobachten ist. Das läßt den Schluß zu, daß hier die Angiotensin II-induzierte Steigerung der

TGF β -Expression, die Aktivierung des Transkriptionskomplexes AP1 und der p38 MAP-Kinase über einen Redox-sensitiven Signalzwichenschritt erfolgen.

Basierend auf verschiedenen Untersuchungen an Glattmuskelzellen wurde postuliert, daß eine NAD(P)H-Oxidase verantwortlich für die Redox-Sensitivität und die darauffolgende Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase ist. Als erste Bestätigung dieser Hypothese konnte eine Angiotensin II-vermittelte Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch Diphenylium Iodid, einem Inhibitor von Flavoenzymen, unterbunden werden. Um eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase weiter zu verifizieren, wurden Kardiomyozyten mit phox22 Sense- und Antisense-Oligonukleotiden transfiziert. Nach der Transfektion der Zellen mit phox22 Antisense-Oligonukleotiden ließ sich eine signifikante Verminderung der Aktivität der p38 MAP-Kinase erkennen. Mit der phox22 Sense-Transfektion war kein Unterschied in der Aktivitätssteigerung zu einer reinen Angiotensin II-Stimulation feststellbar.

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Enzym, welches aus molekularem Sauerstoff Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies; ROS) bildet. Es sind zwei unterschiedliche Typen der NAD(P)H-Oxidasen bekannt, zum einen der glattmuskuläre und zum anderen der leukozytäre Typ. Diese beiden Formen unterscheiden sich in ihrem Vorkommen und in der Ausbildung ihrer Untereinheiten. Phox22 ist bei beiden Formen membranständig lokalisiert. Ebenfalls als membranständige Untereinheiten sind bei der leukozytären gp91 und bei der glattmuskulären Form mox zu nennen. Als zytosolische Untereinheiten kommen bei beiden Formen p47, p67 und rac (GTPase) vor (Griendling et al., 2000).

Abb.: 5.3.1

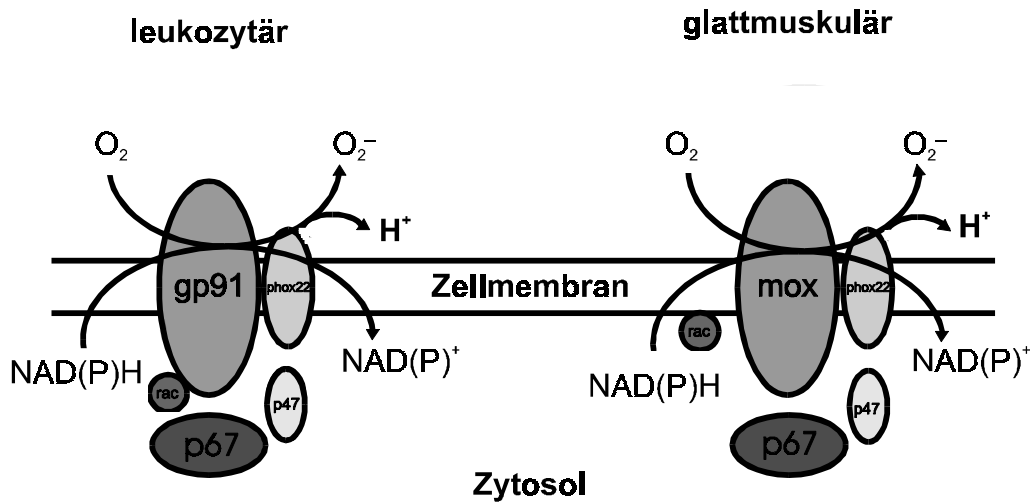


Abb. 5.3.1: Darstellung der Struktur der NAD(P)H-Oxidase. Auf der linken Seite ist die Struktur der leukozytären und auf der rechten Seite die der glattmuskulären Isoform dargestellt. Beide Formen besitzen zwei membranständige Untereinheiten (leukozytär: gp91 und phox22; glattmuskulär: mox und phox22). Für eine physiologische Aktivität ist es notwendig, daß sich die zytosolischen Untereinheiten (p47, p67 und rac) und die membranständigen Untereinheiten verbinden.

Die Ergebnisse mit mox Sense- und Antisense-Oligonukleotiden geben Grund zur Annahme, daß in ventrikulären Herzmuskelzellen die glattmuskuläre Form der NAD(P)H-Oxidase exprimiert wird, da nur hier die Untereinheit mox vorhanden ist. Nur das mox Antisense-Oligonukleotid war in der Lage, die Angiotensin II-vermittelte Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase signifikant zu inhibieren. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen liefert die Tatsache, daß beide Substrate (NADH und NADPH) gleichermaßen von ventrikulären Herzmuskelzellen oxidiert werden, wichtige Hinweise darauf, daß die hier exprimierte NAD(P)H-Oxidase eine strukturelle Übereinstimmung mit der NAD(P)H-Oxidase, welche in Glattmuskelzellen exprimiert wird, aufweist. Im Gegensatz hierzu waren Endothelzellen lediglich in der Lage, NADPH nach Angiotensin II-Induktion vermehrt zu oxidieren. Schon frühere

pharmakologische Studien geben Hinweise darauf, daß in ventrikulären Kardiomyozyten eine NAD(P)H-Oxidase vorhanden ist, die in ihrer Struktur mit der aus Glattmuskelzellen übereinstimmt (Mohazzab-H. et al., 1997). In der durch Mohazzab-H. veröffentlichten Studie wurde allerdings die Superperoxid Bildung nach Reoxigenierung in bovinen ventrikulären Herzmuskelzellen untersucht und nicht die Rolle der NAD(P)H-Oxidase in dem Angiotensin II-induzierten Signaltransduktionsweg.

Abb.: 5.3.2

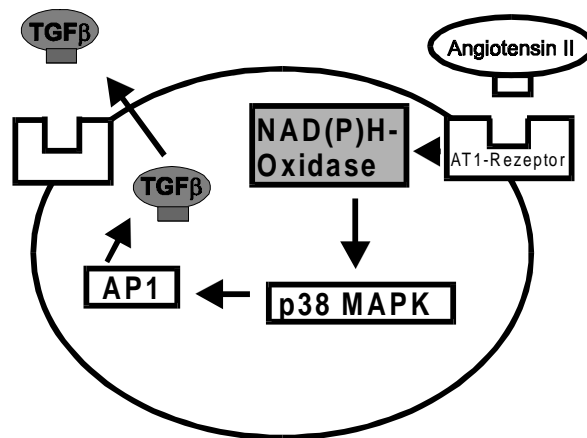


Abb. 5.3.2: Schematische Darstellung der aus den Ergebnissen gewonnenen Vorstellung zur Bedeutung des Redox-sensitiven Signalschrittes (NAD(P)H-Oxidase). Für die Angiotensin II-vermittelte, gesteigerte TGF β -Expression ist nach Bindung des Hormons an seinen Rezeptor (AT1-Rezeptor) eine NAD(P)H-Oxidase verantwortlich, die wiederum über eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors AP1 (AP1) und somit eine vermehrte Expression des Zytokins TGF β bewirkt.

5.4 Reihenfolge der einzelnen Signalschritte in diesem Signaltransduktionsweg

Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, ist eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase von einem Proteinkinase C- (PKC) und von einem Redox-sensitiven Zwischenschritt abhängig. Aus diesem Grund war es von Bedeutung, die Anordnung der unterschiedlichen Signalschritte zu untersuchen. Translokation der zytosolischen p47-Untereinheit an die membranständigen Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Leukozyten ist ein Proteinkinase C-abhängiger Signalzwischenschritt (Yanase et al., 1999). Diese Proteinkinase C-Abhängigkeit konnte in ventrikulären Herzmuskelzellen der adulten Ratte nicht nachgewiesen werden. Zum einen bewirkte eine Vorinkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid, einem Inhibitor der Proteinkinase C, keine verminderte Oxidation von NADH/NADPH, zum anderen konnte eine Steigerung der Oxidation nach direkter Proteinkinase C-Stimulation durch Phorbol-ester nicht induziert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozyten überein, in denen eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbol-myristate-acetate (PMA) zu keiner Steigerung von reaktiven Sauerstoffspezies führte (Xie et al., 1999). Daraus läßt sich schließen, daß die Proteinkinase C unterhalb des Redox-sensitiven Signalschrittes anzusiedeln ist. Auch diese Vermutung stimmt wiederum mit Ergebnissen aus Untersuchungen an Glattmuskelzellen überein. Abschließend läßt sich sagen, daß es nach Angiotensin II-Induktion von ventrikulären Herzmuskelzellen über einen Redox-sensitiven Zwischenschritt mit Beteiligung einer Proteinkinase C zu einer gesteigerten Aktivität der p38 MAP-Kinase kommt. Hieran anschließend wird der Transkriptionsfaktor AP1 aktiviert und führt dadurch zu einer gesteigerten Expression von TGF β . Diese gesteigerte Expression hat wiederum einen wichtigen Einfluß auf die Pathophysiologie der Myokardhypertrophie.

Abb.: 5.4

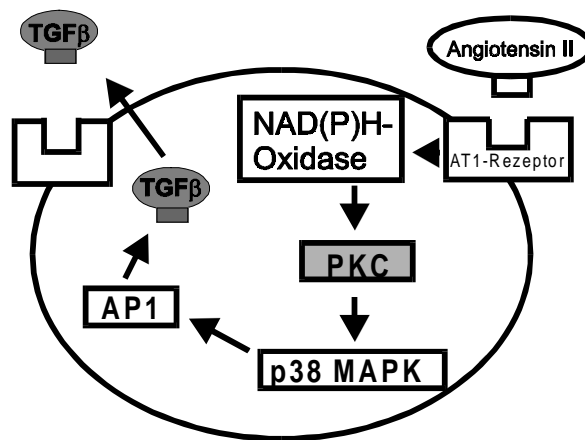


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der aus den Ergebnissen gewonnenen Vorstellung über den durch Angiotensin II hervorgerufenen Signaltransduktionsweg, der in einer gesteigerten Expression von TGF β endet. Als initialer wichtiger Zwischenschritt in der Signalkaskade ist die NAD(P)H-Oxidase zu nennen. Dieser Redox-sensitive Zwischenschritt wiederum führt zu einer Aktivierung einer Proteinkinase C (PKC). Anschließend wird die Phosphorylierung (Aktivität) der p38 MAP-Kinase (p38 MAPK) gesteigert, was wiederum zu einer Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors AP1 (AP1) und zu einer vermehrten Expression von TGF β führt.

5.5 Schlußfolgerung

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals intrazelluläre Signaltransduktionsschritte über welche Angiotensin II eine Expressionssteigerung von TGF β vermittelt. Eine grundlegende und neue Erkenntnis ist hierbei, daß der initiale Schritt eine Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase beinhaltet. Da dieser Schritt therapeutisch durch Gabe von Antioxidantien gehemmt werden kann, steht damit erstmals ein Ansatz zur Verfügung, die kardiale Wirkung von Angiotensin II im Zuge der Regression einer Myokardhypertrophie unabhängig von Interaktionen mit dem Renin-Angiotensin-System oder dem AT1-Rezeptor zu blockieren. Die in dieser Arbeit distal der NAD(P)H-Oxidase identifizierten Signaltransduktionsschritte tragen zusätzlich dazu bei, das Verständnis für die kardiale Biologie zu verbessern.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum erstmalig entscheidende intrazelluläre Signalschritte beschrieben, die in Kardiomyozyten für eine Angiotensin II-vermittelte Steigerung der TGF β -Expression verantwortlich sind. TGF β ist ein Zytokin, welches autokrin die Ansprechbarkeit von Herzmuskelzellen für andere hypertrophe Stimuli erhöht. Die erhöhte Expression von TGF β spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer pathologischen Herzhypertrophie und der daraus entstehenden Herzinsuffizienz.

Diese Studie zeigt, daß nach Angiotensin II-Induktion initial ein Redox-sensitiver Schritt unter Beteiligung einer NAD(P)H-Oxidase abläuft. Es sind zwei Typen der NAD(P)H-Oxidase bekannt, die sich in ihren Untereinheiten unterscheiden; der glattmuskuläre und der leukozytäre Typ. Die hier untersuchte NAD(P)H-Oxidase weist Charakteristika des glattmuskulären Typs auf. Als Folge dieses Redox-sensitiven Zwischenschrittes kommt es zur Aktivierung einer Proteinkinase C und einer nicht näher charakterisierten Tyrosinkinase. Als eine weitere Stufe in der Enzymkaskade konnte eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase, einem Mitglied der „mitogen aktivierten Proteinkinasen“, durch Angiotensin II nachgewiesen werden. Eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades dieser MAP-Kinase ist als Ausdruck gesteigerter Aktivität zu werten. Distal der p38-MAP-Kinase-Aktivierung kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 und dadurch zu einer gesteigerten Expression von TGF β .

Die Erkenntnis dieser Studie, daß ein Redox-sensitiver Schritt ein Schlüsselement der Signaltransduktion von Angiotensin II zur TGF β -Expression bildet, wirft ein neues Licht auf die Rolle des myokardialen Redoxzustandes für die Ausbildung einer Myokardhypertrophie. Es kann vermutet werden, daß antioxidative Therapie die myokardiale TGF β -Expression reduzieren und damit eine pathologische Myokardhypertrophie begrenzen kann.

7 Summary

The present study describes new important intracellular signaling procedure in ventricular cardiomyocytes which are involved for the angiotensin II dependent induction of TGF β expression. TGF β is a cytokine which increases the sensitivity of cardiomyocytes in other hypertrophic stimuli. The increased expression of TGF β probably plays an important role in the development of a pathological cardiac hypertrophy, which results in heart failure.

This study shows that in combination with NAD(P)H-oxidase an initial redox sensitive procedure occurs after angiotensin II induction. There are two types of NAD(P)H-oxidase, which distinguish themselves due to their subunits, – the vascular smooth muscle cell type and the neutrophil cell type. The NAD(P)H-oxidase of adult cardiomyocytes shares structural similarities with the smooth muscle type. The experiments further show that this redox sensitive step activates protein kinase C and a tyrosinkinase, which is not further specified. The next step of this signal transduction pathway shows an increase in phosphorylation of p38 MAP-Kinase a member of the „mitogen activated protein kinases“ after angiotensin II induction. An increase in phosphorylation indicates its activation. The activation of the p38 MAP-Kinase results in the activation of the transcription factor AP1 leading to the increased expression of TGF β .

The fact that a redox-sensitive step is a key element of the signal transduction from angiotensin II to TGF β expression sheds new light on the role the myocardial redox state plays in the development of myocardial hypertrophy. It can be assumed that an antioxidative therapy reduces the myocardial TGF β expression and therefore the development of a pathological myocardial hypertrophy.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Baines, C.P., Cohen, M.V. and Downey, J.M. (1999)
Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels.
J. Cardiovasc. Electrophysiol. **10**, 741-754
- 2 Boluyt, M.O., O'Neill, L., Meredith, A.L., Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Crow, M.T. and Lakatta, E.G. (1994)
Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components.
Circ. Res. **75**, 23-32
- 3 Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- 4 Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. **162**, 156-159
- 7 Godfrey, K. (1985)
Statistics in practice. Comparing the means of several groups
N. Engl. J. Med. **313**, 1450-1456
- 8 Goldberg, Y., Taimor, G., Piper, H.M. and Schlüter, K.-D. (1998)
Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y.
Am. J. Physiol. **275**, C1207-C1215

- 9 Griendling, K.K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000)
NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease
Circ. Res. **86**, 494-501

- 10 Iizuka, K., Sano, H., Kawaguchi, H. and Kitabatake, A. (1994)
Transforming growth factor beta-1 modulates the number of beta-adrenergic
receptors in cardiac fibroblasts.
J. Mol. Cell. Cardiol. **26**, 435-440

- 11 Kyhse-Andersen, J. (1984)
Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid
transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods. **10**, 203-209

- 12 Kimura, M. and Ogihara, M. (1999)
Transforming growth factor beta-1 inhibits the growth of primary adult rat
hepatocyte cultures by increasing cAMP levels.
Eur. J. Pharmacol. **386**, 271-277

- 13 Kojima, M., Shiojima, I., Yamazaki, T., Komuro, I., Zou, Z., Wang, Y., Mizuno,
T., Ueki, K., Tobe, K. and Kadowaki, T. (1994)
Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of
hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular
signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro.
Circulation **89**, 2204-2211

- 14 Komuro, I., Kaida, T., Shibasaki, Y., Kurabayashi, M., Katoh, Y., Hoh, E.,
Takaku, F. and Yazaki, Y. (1990)
Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression.
J. Biol. Chem. **265**, 3595-3598

- 15 Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F. and Yazaki, Y. (1991)
Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation.
J. Biol. Chem. **266**, 1265-1268

- 16 Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685

- 17 Lee, Y.A. and Lindpaintner, K. (1993)
Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy. *Eur. Heart J.* **14(Suppl.J)**, 42-48

- 18 Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B. and Castelli, W.P. (1990)
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
N. Engl. J. Med. **322**, 1561-1566

- 19 Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, **second edition, Vol.1**, 6,44

- 20 Mohazzab-H., K.M., Kaminski, P.M. and Wolin, M.S. (1997)
Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase.
Circulation **96**, 614-620

- 21 Moriguchi, Y., Matsubara, H., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Oda, K. and Iwasaka, T. (1999)
Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms.
Circ. Res. **84**, 1073-1084
- 22 Morishita, R., Gibbons, G.H., Horiuchi, M., Kaneda, Y., Ogihara, T. and Dzau, V.J. (1998)
Role of AP-1 complex in angiotensin II-mediated Transforming growth factor-beta expression and growth of smooth muscle cells: using decoy approach against AP-1 binding site.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **243**, 361-367
- 23 Nogami, M., Romberger, D.J., Rennard, S.I. and Toews, M.L. (1994)
TGF-beta 1 modulates beta-adrenergic receptor number and function in cultured human tracheal smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. **266**, L187-L191
- 24 Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neumann, S., Levy, Z. and Yaffe, D. (1983)
The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene.
Nucleic Acids Res. **11**, 1759-1771
- 26 Patterson, C., Ruef, J., Madamanchi, N.R., Barry-Lane, P., Hu, Z., Horaist, C., Ballinger, C.A., Brasier, A.R., Bode, C. and Runge, M.S. (1999)
Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem. **274**, 19814-19822

- 27 Piper, H.M., Probst, I., Schwartz, P., Hutter, J.F. and Spieckermann, P.G. (1982)
Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. **14**, 397-412
- 28 Piper, H.M., Spahr, R., Mertens, S., Krützfeld, A. and Watanabe, H. (1990)
Microvascular endothelial cells from heart.
In: Piper HM, ed. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*,
Heidelberg: Springer; 158-177
- 29 Puri, P.L., Avantaggiati, M.L., Burgio, V.L., Chirillo, P., Collepardo, D., Natoli, G., Balsano C and Levrero, M. (1995)
Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-jun/c-fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells.
J. Biol. Chem. **270**, 22129-22134
- 30 Qian, S.W., Kondaiah, P., Roberts, A.B. and Sporn, M.B. (1990)
cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta-1.
Nucleic Acids Res. **18**, 3059
- 31 Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993)
Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype.
Circ. Res. **73**, 413-423
- 32 SAS/STAT (1992)
User Guide, Version 6 Fourth Ed. **2**, 946-947
- 33 Schluter, K-D., Zhou, X.J. and Piper, H.M. (1995)
Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes.
Am. J. Physiol. **269**, C1311-C1316

- 34 Schluter, K-D., Simm, A., Schafer, M., Taimor, G. and Piper H.M. (1999)
Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy.
Am. J. Physiol. **276**, H1655-H1663
- 35 Schluter, K-D., Frischkopf, K., Flesch, M., Rosenkranz, S., Taimor, G. and Piper, H.M. (2000)
Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.
Cardiovasc. Res. **45**, 410-417
- 36 Strauss, F. and Varshavsky, A. (1984)
A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome
Cell. **37**, 889-901
- 37 Tharoux, P.L., Chatziantoniou, C., Fakhouri F. and Dussaule, J.C. (2000)
Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway.
Hypertension **36(3)**, 330-336
- 38 Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N. and Griendling, K.K. (1996)
p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells.
J. Biol. Chem. **271**, 23317-23321
- 39 Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M. and Griendling, K.K. (1998)
p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy.
J. Biol. Chem. **273**, 15022-15029

- 40 Viedt, C., Soto, U., Krieger-Brauer, H.I., Fei, J., Elsing, C., Kubler, W. and Kreuzer, J. (2000)
Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **20**, 940-948
- 41 Villarreal, F.K. and Dillmann, W.H. (1992)
Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen.
Am. J. Physiol. **262**, H1861-H1866
- 42 Wada, H., Zile, M.R., Ivester, C.T., Cooper, G. 4th and McDermott, P.J. (1996)
Comparative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiomyocytes in primary culture.
Am. J. Physiol. **271**, H29-H37
- 43 Xi, X.P., Graf, K., Goetze, S., Fleck, E., Hsueh, W.A. and Law, R.E. (1999)
Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **19**, 73-82
- 44 Xie, Z., Kometiani, P., Liu, J., Li, J., Shapiro, J.I. and Askari, A. (1999)
Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes.
J. Biol. Chem. **274**, 19323-19328
- 45 Yamazaki, T., Komuro, I. and Yazaki, Y (1999)
Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy.
Am. J. Cardiol. **83**, 53H-57H

- 46 Yaname, H., Fukunaga, K., Nigorikawa, K., Okamura, N. and Ishibashi, S.
(1999)
Pervanadate activates NADPH oxidase via protein kinase C-independent phosphorylation of p47-phox.
Arch. of Biochem. and Biophys. **361**, 1-6

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper, Leiter des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, für die Bereitstellung des Themas und die hilfreichen Anregungen bei der Erstellung der Promotionsarbeit. Zusätzlich möchte ich dafür danken, daß er für eine finanzielle Unterstützung sorgte, die gerade für eine veterinärmedizinische Promotionsarbeit – obwohl notwendig – bei weitem nicht überall selbstverständlich ist.

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

Sehr herzlich danken möchte ich Herrn PD Dr. K.-D. Schlüter, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und durch außerordentliche Geduld und stete Freundlichkeit viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die fachliche Unterstützung, vor allem in methodischen Fragen, danke ich Frau Dr. G. Taimor, die mir ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desweiteren danke ich den Medizinisch-Technischen-Assistenten Iris Schumacher, Daniela Schreiber und Claudia Magel für die fachliche Unterstützung und viel Spaß.

Für die Korrektur meiner Promotionsarbeit danke ich Hagen Maxeiner, Heike Degenhardt und Daniela Schreiber. Ebenso danke ich Frau Newport für die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Allen weiteren Mitarbeitern, vor allem den Mitdoktoranden, danke ich für die moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zu guter Letzt einen herzlichen Dank an meine Eltern, die mir ein großer Rückhalt waren und sind.