

**Stickstoffmonoxid als weiteres Signalmolekül in der TGFβ-  
induzierten Apoptose adulter Kardiomyozyten der Ratte**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**des Fachbereichs Medizin**

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von:

**Björn Eric Warga**

Arzt aus Bietigheim-Bissingen

Gießen (2015)

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

Gutachter: PD Dr. Jacqueline Heger

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Lips

Tag der Disputation: 15.03.2016

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.1. Herzinsuffizienz</b>	<b>1</b>
<b>2.2. Apoptose</b>	<b>5</b>
2.2.1. Apoptosemechanismen	5
<b>2.3. TGF<math>\beta</math>-Superfamilie</b>	<b>7</b>
2.3.1. TGF $\beta$ <sub>1</sub> / SMAD-Signalweg des Herzens	8
<b>2.3. Stickstoffmonoxid</b>	<b>10</b>
2.3.1. NO-Synthasen	10
2.3.2. Physiologische Rolle von NO	13
2.3.3. Rolle der NO-Synthasen am Herzen	14
<b>2.4. PI3-Kinase</b>	<b>15</b>
<b>2.5. Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>3. Material</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Versuchstiere</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Chemikalien</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Substanzen, Antikörper, Inhibitoren und Enzyme</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Primer für real-time RT-PCR</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Oligonukleotide für Retardation Assay</b>	<b>20</b>
<b>3.6. Puffer, Lösungen, Medien und Ansätze</b>	<b>20</b>
<b>3.7. Geräte und Laborbedarf</b>	<b>26</b>
3.7.1. Zellpräparation und Zellkultur	26
3.7.2. Westernblot	26
3.7.3. Caspase 3/7-Assay	27
3.7.4. Retardation-Assay	27
3.7.5. real-time RT-PCR	27
3.7.6. DAF-Assay	27
3.7.7. Sonstige Geräte	28
3.7.8. Verbrauchsmaterialien	28
<b>3.8. Software</b>	<b>28</b>
<b>4. Methoden</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Zellkultur von ventrikulären Kardiomyozyten</b>	<b>30</b>
4.1.1. Präparation von ventrikulären Kardiomyozyten	30
4.1.2. Vorinkubation der Zellkulturschalen	31
4.1.3. Ausplattieren der Kardiomyozyten	31
4.1.4. Kultivierung der Kardiomyozyten	31
<b>4.2. Apoptosebestimmung</b>	<b>31</b>
4.2.1. Caspase 3/7-Assay	32
4.2.2. HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung	33
<b>4.3. Western-Blot</b>	<b>35</b>
4.3.1. Gesamtproteinisolation mittels RIPA-Puffer	35
4.3.2. Quantitative Proteinbestimmung LOWRY-Assay	35
4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	36
4.3.4. Immunoblot-Verfahren	37
4.3.5. ChemiSmart-System	38
<b>4.4. Retardation Assay</b>	<b>39</b>
4.4.1. Kernextraktion	39

## Inhaltsverzeichnis

4.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford	40
4.4.3. Markierung der Oligonukleotide	40
4.4.4. Gelelektrophorese	41
<b>4.5. RT-PCR</b>	<b>42</b>
4.5.1. Zellernte von Kardiomyozyten und Isolierung von Gesamt-RNA	42
4.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	43
4.5.3. Gel-Elektrophorese der RNA-Proben	43
4.5.4. DNase-Behandlung und Erstellen von cDNA	43
4.5.5. Aktin-PCR und Gel-Elektrophorese	44
4.5.6. real-time RT-PCR	45
<b>4.6. NO-Messung mittels DAF-Assay</b>	<b>48</b>
4.6.1. Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen	48
4.6.2. DAF	48
4.6.3. NO-Messungen	49
<b>4.7. Immunfluoreszenz</b>	<b>50</b>
<b>4.8. Statistik</b>	<b>51</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>5.1. TGF<math>\beta</math><sub>1</sub> induziert eine NO-Freisetzung und Apoptose</b>	<b>52</b>
<b>5.2. TGF<math>\beta</math><sub>1</sub> induziert Apoptose über NO-Freisetzung</b>	<b>54</b>
<b>5.3. Charakterisierung der NO-Synthase</b>	<b>55</b>
<b>5.4. Rezeptorabhängiger Signalweg</b>	<b>59</b>
<b>5.5. Verbindung zwischen Rezeptor und NO-Synthase</b>	<b>63</b>
<b>5.6. Bindungsaktivität</b>	<b>68</b>
<b>5.7. PCR</b>	<b>72</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>6.1. Rolle des ALK-5-Rezeptors</b>	<b>76</b>
<b>6.2. Charakterisierung der NO-Synthase und Aktivierungsform</b>	<b>77</b>
<b>6.3. Rolle der eNOS am Herzen</b>	<b>78</b>
<b>6.4. Rolle der PI3-Kinase</b>	<b>79</b>
<b>6.5. Conclusio und Ausblick</b>	<b>81</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>7.1. Summary</b>	<b>83</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>9. Publikationsverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>101</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>12. Curriculum vitae</b>	<b>103</b>



## Abkürzungsverzeichnis

### 1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
%(vol/vol)	Volumenprozent
%/wt/vol)	Gewichtsprozent
AP-1	Activating Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine serum albumine
°C	Grad Celsius
CCT	Creatin, Carnitin, Taurin
cDNA	Complementary DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Ct	Cycle threshold
DAF-FM	Diaminofluorescein FM-Diacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	und andere
FCS	Fetal Calf Serum
fw-Primer	Forward-Primer
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kb	kilo-base pair
kDa	Kilodalton

## Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
mA	Milliampère
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev-Primer	Reverse-Primer
RNA	Ribodesoxyribonucleinacid
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse transcribed PCR
SBE	SMAD binding element
SDS	Sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat
SMAD	Small Mother Against Decapentaplegic
TAE	TRIS / Acetate / EDTA
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE	TRIS / Borate / EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCE	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transforming Growth Factor-β
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

## **2. Einleitung**

### **2.1. Herzinsuffizienz**

Herz-Kreislaferkrankungen sind in Deutschland und den anderen Industrieländern die häufigste Todesursache. Laut statistischem Bundesamt waren im Jahre 2011 40,2 % aller Todesursachen in Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu sehen und 92 % dieser Verstorbenen war 65 Jahre alt oder älter (Statistisches Bundesamt, 2012). Ursächlich an einer Herzinsuffizienz verstorben sind 8,05 % (Statistisches Bundesamt, 2012).

Die Prävalenz und die Inzidenz der Herzinsuffizienz sind altersabhängig und nehmen bis zum 80. Lebensjahr zu (Statistisches Bundesamt, 2012). Männer sind 1,5mal häufiger betroffen als Frauen. Das Risiko mit zunehmendem Lebensalter an einer diastolischen Herzinsuffizienz zu erkranken steigt bei Frauen im Vergleich zu Männern deutlich an (Hogg. K. et al., 2004).

Die Herzinsuffizienz ist definiert als eine Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck zu fördern (Herold Innere Medizin, Auflage 2013). Die WHO spricht von einer verminderten körperlichen Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung. Festzuhalten ist, dass die Herzinsuffizienz ein klinisch progressives Syndrom mit unterschiedlicher Ätiologie darstellt.

Die Herzinsuffizienz lässt sich nach unterschiedlichen klinischen und pathophysiologischen Kriterien einteilen. Anhand des Herzzeitvolumens unterscheidet man zwischen einer High-output-failure und einer Low-output-failure. Beim Low-output-failure kommt es zu einer Verminderung des Herzzeitvolumens aufgrund eines kardialen Pumpversagens. Dem steht das High-output-failure gegenüber. Hier ist das Herzminutenvolumen normal oder erhöht (Anand et al., 2001). Die Ursache liegt hier in einem pathologisch erhöhten Durchblutungsbedarf des Organismus wie es beispielsweise bei Anämie, Hyperthyreose und bei Sepsis / SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom) auftreten kann (Anand et al., 2001)

Anatomisch kann man zwischen einer Links-, Rechts- und Globalinsuffizienz unterscheiden. Klinisch unterscheidet man nach zeitlichem Verlauf zwischen einer akut dekompensierten Herzinsuffizienz und einer chronischen Herzinsuffizienz. Pathophysiologisch kennt man die systolische, die diastolische und die kombinierte Herzinsuffizienz.

Ätiologisch ist die koronare Herzkrankheit die häufigste Ursache für die Manifestation einer chronischen Herzinsuffizienz. Die arterielle Hypertonie stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung und Manifestation der Herzinsuffizienz dar (Kannel et al., 1988). Weitere Ursachen sind Kardiomyopathien, Vitien und Herzrhythmusstörungen (Cowie et al., 1999, Böhm et al., 2002).

Klinisch erfolgt am häufigsten die Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation der New York Heart Association. Die Unterteilung erfolgt nach dem subjektiven Symptom der Dyspnoe. In Tabelle 1 ist die NYHA-Klassifikation dargestellt.

## Einleitung

NYHA-Stadium	Subjektive Beschwerden bei Herzinsuffizienz
I	Beschwerdefreiheit, normale körperliche Belastung
II	Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
III	Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung
IV	Beschwerden in Ruhe

Tabelle 1: NYHA-Klassifikation

Eine weitere Klassifikation der Herzinsuffizienz stellt die ABCD-Gruppierung der American Heart Association (AHA) aus dem Jahre 2001 dar. Die Einteilung berücksichtigt neben den klinischen Symptomen der Herzinsuffizienz auch strukturelle Veränderungen. Somit werden hiermit bereits asymptomatische Patienten mit adaptiven Veränderungen erfasst. In Tabelle 2 ist die AHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz dargestellt.

Stadium	Beschwerden
Stadium A	Keine Symptome aber Risikofaktoren einer Herzinsuffizienz
Stadium B	Keine Symptome einer Herzinsuffizienz, aber Zeichen einer strukturellen Herzschiidigung
Stadium C	Strukturelle Herzschiidigung in Kombination mit Symptomen einer Herzinsuffizienz
Stadium D	Terminale Herzinsuffizienz

Tabelle 2: AHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz

Folgen der eingeschränkten Pumpfunktion des insuffizienten Herzens lassen sich in ein Vorwärtsversagen und Rückwärtsversagen einteilen. Durch das Vorwärtsversagen (forward failure) kommt es zu einem reduzierten Herzzeitvolumen mit Hypotonie und peripherer Minderperfusion. Das Rückwärtsversagen führt zu einer Stauung des venösen Blutes. Bei einer Linksherzinsuffizienz resultiert eine Lungenstauung bis zum Lungenödem. Bei einer Rechtsherzinsuffizienz resultieren periphere Ödeme und bei Persistenz kann sich eine Stauungsleber im Sinne einer Cirrhose cardiaque entwickeln. Im Vordergrund stehen somit die Symptome Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention (Hoppe et al., 2005)

Der Herzinsuffizienz stehen einige Kompensationsmechanismen gegenüber. Über neuroendokrine Aktivierung kommt es zu einer Sympathikusaktivierung mit Katecholaminausschüttung und einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Cohn et al., 1981). Anfangs kann durch diese Kompensationsmechanismen eine adäquate Hämodynamik gewährleistet werden. Angiotension II bewirkt über eine Vasokonstriktion und der daraus resultierenden Erhöhung des peripheren Widerstandes eine Erhöhung der Nachlast. Aldosteron vermittelt über eine Natrium und

## Einleitung

Wasserretention eine Erhöhung der Vorlast. Vasopressin bewirkt ebenfalls über eine Wasserretention eine Erhöhung der Vorlast. Auf Dauer verstärken die Kompensationsmechanismen über eine Erhöhung der Nachlast und Herzfrequenz die Progredienz der Erkrankung.

Die natriuretischen Peptide ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide) stellen ebenfalls einen Kompensationsmechanismus dar. Eine Dehnung der Vorhöfe führt zu einer ANP-Freisetzung und eine BNP-Freisetzung entsteht bei einer Dehnung der Ventrikel. BNP hat eine vasodilatatorische und natriuretische Wirkung. Der BNP-Spiegel korreliert mit der Schwere der Herzinsuffizienz. Studien belegen die Quantität des BNP als Prognosemarker bei Herztransplantationen und zur Letalitätsprognose (deFilippi et al., 2007). BNP Werte > 5000 pg/ml zeigen eine erhöhte Letalitätsrate (Rothenburger et al., 2004). Hohe NT-proBNP Werte korrelieren mit einer höheren NYHA-Gruppierung (Hunt PJ et al., 1997) und mit einer herabgesetzten ventrikulären Ejektionsfraktion.

Eine neurohumorale Aktivierung zur Kompensation der verminderten Organperfusion führt zur Hypertrophie. Hierbei spielen parakrine und autokrine Mechanismen eine Rolle (Hammond et al., 1979). Eine  $\alpha$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten der Ratte führt zu einer Hypertrophie-Induktion (Schlüter & Piper, 1992). Das Renin-Angiotension-Aldosteron-System ist ein wichtiger Hypertrophie-Induktor (Baker et al., 1992). Die Größenzunahme erfolgt durch Hypertrophie der Kardiomyozyten und nicht durch Mitosen. Gemäß dem Laplace'schen Gesetz stellt die ventrikuläre Hypertrophie einen Kompensationsmechanismus dar, um die Wandspannung zu reduzieren. Die Reduktion der Wandspannung geschieht durch Dickenzunahme der Ventrikel. Bei der chronischen Herzinsuffizienz unterscheidet man zwischen exzentrischer und konzentrischer Hypertrophie. Eine Volumenbelastung, wie sie beispielsweise bei Insuffizienzen der Taschenklappen vorliegt, führt zu exzentrischer Hypertrophie. Eine Druckbelastung, wie sie beispielsweise bei Stenosen der Taschenklappen vorliegt, führt zu konzentrischer Hypertrophie. In Abbildung 1 sind die unterschiedlichen Hypertrophieformen dargestellt.

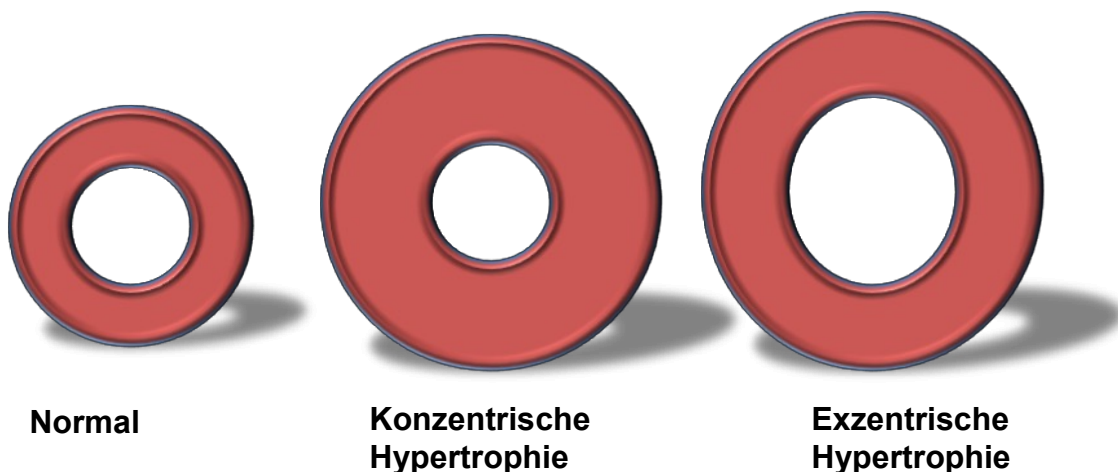


Abbildung 1: Darstellung der Hypertrophieformen im Vergleich zum Normalzustand

Aus der Hypertrophie-Induktion resultiert anfangs eine Erhöhung der Kontraktionskraft. Der Hypertrophie sind jedoch Grenzen gesetzt. Bei Überschreiten des kritischen Herzgewichtes (Linzbach, 1947) von circa 500 g ist keine ausreichende Oxygenierung der Kardiomyozyten mehr gegeben. Die Koronarreserven sind erschöpft und es kommt

## Einleitung

zu einer myokardialen Gefügedilatation des Herzens (Drexler et al., 1992). Durch die Dilatation erhöht sich dem Laplace'schen Gesetz folgend die Wandspannung, da der ventrikuläre Durchmesser zugenommen hat. Die ventrikuläre Dilatation bewirkt eine maximale Verlängerung der Sarkomere der Kardiomyozyten und führt zu einem Verlust der Wirksamkeit des Frank-Starling-Mechanismus (Packer, 1996). Ein Anstieg des enddiastolischen Volumens hat keinen positiven Einfluss mehr auf die ventrikuläre Auswurfleistung. Die Wandspannung ist nun zu hoch und das Herz nicht mehr in der Lage den Kreislauf adäquat aufrechtzuerhalten. Die Myokardhypertrophie korreliert mit einer sich entwickelnden chronischen Herzinsuffizienz, mit erhöhter Morbidität und Mortalität (Levy et al., 1990). In Abbildung 2 ist der Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz dargestellt.

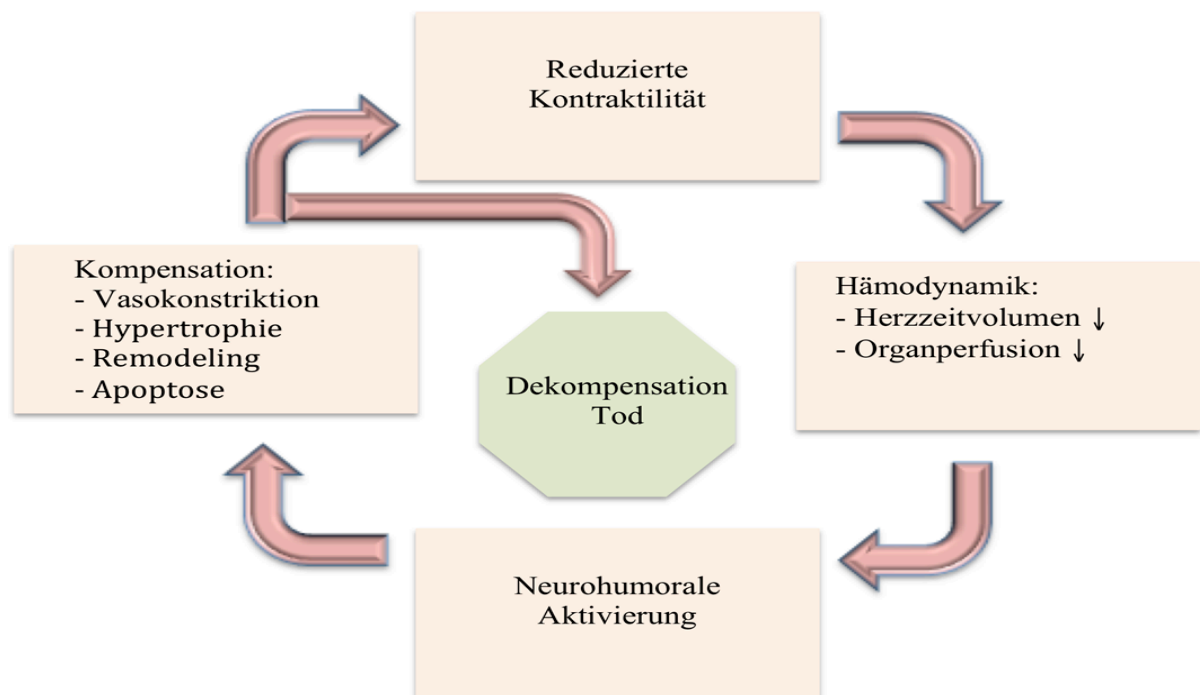


Abbildung 2: Circulus vitiosus bei chronischer Herzinsuffizienz

Neben den bereits erwähnten Kompensationsmechanismus der Hypertrophie laufen weitere Prozesse am insuffizienten Herzen ab. So kommt es bei chronisch aktivierten Kompensationsmechanismen zu strukturellen und molekularen Veränderungen. Der Vorgang dieser Veränderungen wird in seiner Gesamtheit als kardiales Remodeling bezeichnet. Diese Prozesse umfassen Hypertrophie, Fibrose und Änderung der Genexpression (Swynghedauw, 1999). Auch apoptotische Vorgänge und kontraktile Dysfunktion (Hein et al., 2003) sind am Remodeling beteiligt. Bei diesen Prozessen spielt auch der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  eine Rolle. TGF $\beta$ <sub>1</sub> wird nach Angiotensin-II-Stimulation gebildet und steht am Ende des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Schröder et al., 2006). Zu einer gesteigerten TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Bildung kommt es unter anderem

nach myokardialen Infarkten (Deten et al., 2001) und bei Kardiomyopathien (Hao et al., 1999).

Mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Steigerung der Apoptose am insuffizienten Herzen (Hein et al., 2003). Induktoren der kardialen Apoptose sind ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, eine Ischämie oder Reoxygenierung und ein aktiver Sympathikus, sowie eine gesteigerte ventrikuläre Wandspannung (Weil et al., 2006). Die Progredienz des myokardialen Zellverlustes kann somit wesentlich zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz und zur Aufrechterhaltung des Circulus vitiosus (Abbildung 2) beitragen.

## **2.2. Apoptose**

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Abfallen welcher Blätter von einem Baum und wird metaphorisch für den programmierten Zelltod benutzt (Kerr et al., 1972). Apoptose stellt einen komplexen Mechanismus des genetisch programmierten Zelltodes dar und spielt für den Organismus eine zentrale Rolle. Die Aufgaben der Apoptose liegen in der Beseitigung von geschädigten oder infizierten Zellen, ohne eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen. Im Laufe des Lebens ist die Apoptose für Differenzierungsprozesse, Wachstumsprozesse, Konstanthaltung von Organgrößen und Alterungsprozessen verantwortlich (Norbury et al., 2001). Der Apoptoseprozess ist energieabhängig. Apoptose kann in allen Körperzellen ablaufen. Eine Inhibition der Apoptose kann zu einer malignen Entartung führen (Wyllie, 1997). Mikroskopisch imponiert eine Zellschrumpfung (Kerr et al., 1972) und eine Kondensation des Chromatins (Elmore, 2007). Zellfragmente ergießen sich nicht in das Interstitium, sondern sind von intakten Zellmembranen umschlossen. Diese Fragmente werden auch apoptotic bodies genannt. Über Phagozytose werden sie durch Makrophagen entsorgt. Die beteiligten Makrophagen bilden keine Zytokine (Kurosaka et al., 2003) und der gesamte Mechanismus läuft ohne Induktion einer Entzündungsreaktion ab.

Die Induktion der Apoptose-Kaskade kann durch viele unterschiedliche intrazelluläre und extrazelluläre Faktoren erfolgen.

Ein energieunabhängiger Weg des Zelltodes ist die Nekrose. Im Gegensatz zur Apoptose imponieren hier eine Karyolyse und eine Schwellung der Zelle. Zellfragmente ergießen sich hier ins Interstitium und induzieren eine Entzündungsreaktion (Kerr et al., 1972).

### **2.2.1. Apoptosemechanismen**

Eine Apoptoseinduktion und die sich daran anschließenden komplexen Kaskaden stellen energieabhängige Prozesse dar (Elmore, 2007). Generell lassen sich zwei Apoptose-Signalwege unterscheiden. Man unterscheidet zwischen einem intrinsischen mitochondrialen Signalweg und einem extrinsischen (Death-Receptor-Pathway) Signalweg. Beide Signalwege haben eine gemeinsame Endstrecke.

## Einleitung

Der intrinsische Signalweg (siehe Abbildung 3) erfährt seine Induktion durch äußere Stimuli. Diese Stimuli können Strahlung, Hypoxie oder Toxine sein. Die Induktion führt zu einer Öffnung der Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore in den Mitochondrien. Die geöffneten Poren bewirken einen Ausfluss des an der Atmungskette beteiligten Cytochrom C in das Zytoplasma. Das Cytochrom C besitzt im Zytoplasma eine pro-apoptotische Wirkung (Saelens et al., 2004) und bewirkt eine Aktivierung der sich im Zytoplasma befindlichen Prokaspase 9.

Der extrinsische Signalweg (siehe Abbildung 3) erfordert eine Bindung und Interaktion eines Liganden mit einem transmembranen Rezeptor. Die Interaktion der Liganden mit dem Rezeptor induziert die Bildung des Death-Inducing-Signal-Komplex, der eine autokatalytische Aktivierung der Prokaspase 8 bewirkt (Kischkel et al., 1995).

Beide Signalwege bewirken eine Aktivierung der Kaspasen-Kaskade. Kaspasen sind Enzyme mit Proteasenaktivität. Die Effektorphase erfordert eine Aktivierung der Kaspasen 3, 6 und 7. Die Effektorphase imponiert durch morphologische zelluläre Veränderungen. Die Kaspasen bewirken eine Spaltung von intrazellulären Proteinen und als Resultat entsteht eine zelluläre Degradation.

Die beiden genannten Signalwege stellen keine unabhängigen Wege dar. Vielmehr besteht zwischen beiden Wegen eine Kommunikation und Interaktion auf molekularer Ebene (Igney et al., 2002)



## Einleitung

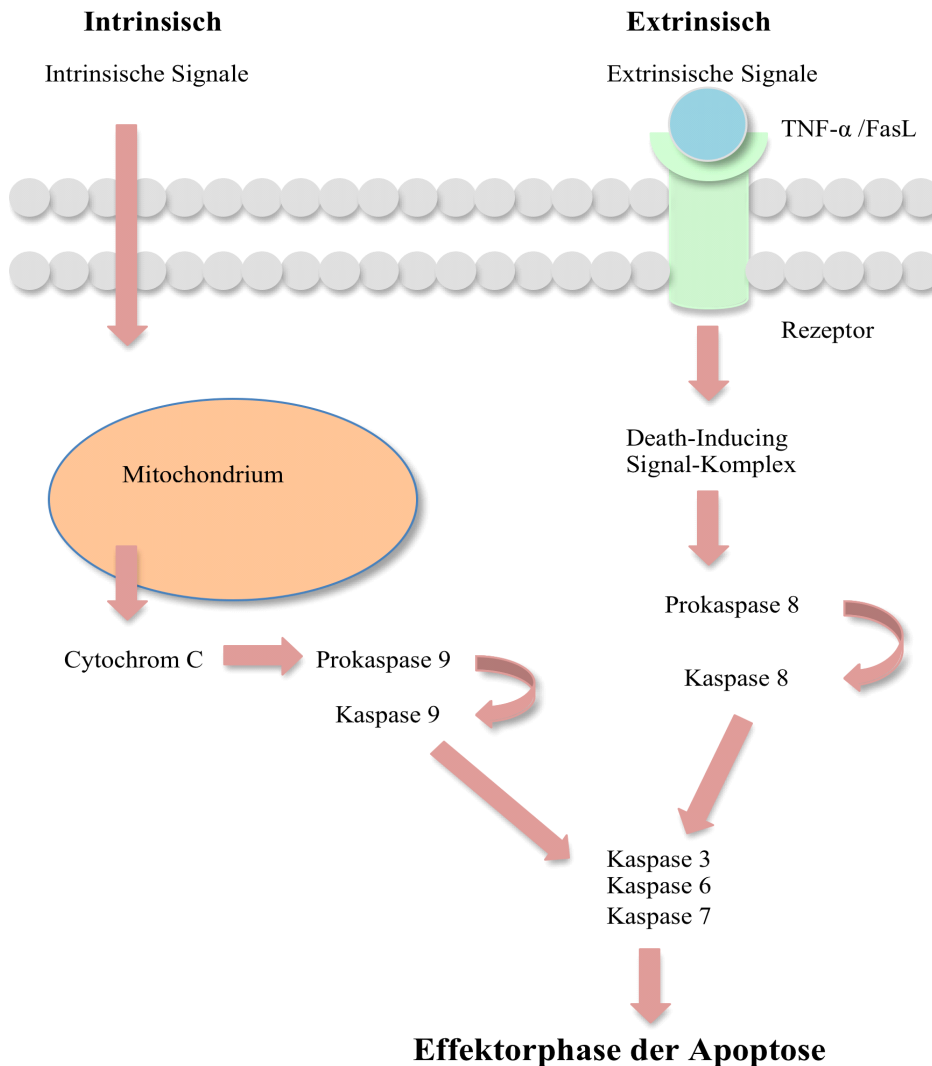


Abbildung 3: Darstellung der beiden apoptotischen Signalwege

Bekannte kardiale apoptotische Liganden transmembraner Rezeptoren sind FasL und TNF $\alpha$  (Ashkenazi et al., 1998). Als weitere wichtige Induktoren der Apoptose sind das Zytokin TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Euler-Taimor & Heger, 2006) und NO (Schneiders et al., 2005, Taimor et al., 2000, Taimor et al., 2001) zu nennen.

### 2.3. TGF $\beta$ -Superfamilie

Die TGF $\beta$ -Superfamilie stellt eine Gruppe mit über 30 Zytokinen dar. Hierbei handelt es sich um Proteindimere mit pleiotropen Funktionen (Kawabata et al., 1998). Zu den Mitgliedern gehören TGF $\beta$  mit seinen drei Isoformen (TGF $\beta$ <sub>1-3</sub>), die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Aktivine. BMPs erfüllen wichtige Funktionen bei der kardialen Entwicklung (Euler-Taimor & Heger, 2006). TGF $\beta$  erfüllt eine Vielzahl an Funktionen bei biologischen Prozessen. Zu diesen Funktionen gehören die Zellproliferation, embryonale Differenzierung, Immunantwort, Homöostase und Apoptose (Massague et al., 2000). Zur Bildung von TGF $\beta$  sind Kardiomyozyten,

Endothelzellen, Makrophagen und aktivierte B- und T-Lymphozyten befähigt und zugleich empfänglich für dessen Wirkungen (Dennler et al., 2002).

### 2.3.1. TGF $\beta$ <sub>1</sub> / SMAD-Signalweg des Herzens

TGF $\beta$ <sub>1</sub> interagiert über transmembrane Rezeptoren und vermittelt auf diesem Wege seine komplexen Wirkungen. Die transmembranen Rezeptoren bestehen aus heterotetrameren Komplexen, die sich aus unterschiedlichen Typ I- und Typ II-Rezeptoren zusammensetzen (Massague et al., 1998). Die transmembranen Rezeptoren besitzen Cystein-reiche extrazelluläre Domänen, eine transmembrane Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Serin / Threonin Kinase-Aktivität.

Eine Bindung von TGF $\beta$ <sub>1</sub> an den Rezeptor führt zur Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors (ALK 5) durch die konstitutiv aktive Rezeptor Typ II-Kinase. Die somit aktivierte phosphorylierte Rezeptor Typ I-Kinase aktiviert durch Phosphorylierung die für TGF $\beta$ <sub>1</sub> spezifischen intrazellulären Signalmoleküle. Die spezifischen intrazellulären Signalmoleküle stellt die Gruppe der SMAD-Proteine dar, die als intrazelluläre Signaleffektoren zu betrachten sind (Dennler et al., 2002).

Die Gruppe der SMAD-Proteine lässt sich in drei Klassen differenzieren. Zu unterscheiden sind rezeptoraktivierte SMAD-Proteine (R-SMADs), common SMADs (Co-SMADs) und inhibitorische SMADs (I-SMADs). R-SMADs sind die SMAD-Proteine SMAD1,2,3,5 und 8. SMAD4 ist ein Co-SMAD Protein. I-SMADs sind die SMAD-Proteine SMAD6 und 7.

SMAD-Proteine besitzen eine MH1- und MH2-Domäne. Die beiden Domänen erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Mit der MH1-Domäne interagieren die SMADs mit DNA und mit DNA-bindenden Motiven. Die MH2-Domäne hingegen interagiert mit SMAD-Proteinen und Rezeptoren (Chacko B.M. et al., 2004, Wu R.Y. et al., 1997). In Kardiomyozyten konnte die Expression aller SMAD-Klassen nachgewiesen werden (Heger et al., 2009).

Abbildung 4 zeigt die Signalkaskade im Herzen. TGF $\beta$ <sub>1</sub> bindet an den Rezeptorkomplex bestehend aus dem Rezeptor Typ II und I (ALK5) und bewirkt die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 zu P-SMAD2 und P-SMAD3. Unter Einbeziehung von SMAD4 entsteht ein heterotrimerer Komplex (Dennler et al., 2002). Es folgt eine Translokation des heterotrimeren Komplexes in den Nukleus und eine veränderte Transkription von Zielgenen (Euler-Taimor & Heger, 2006). SMAD7 als inhibitorisches SMAD Protein hemmt die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 (Nakao et al., 1997).

## Einleitung

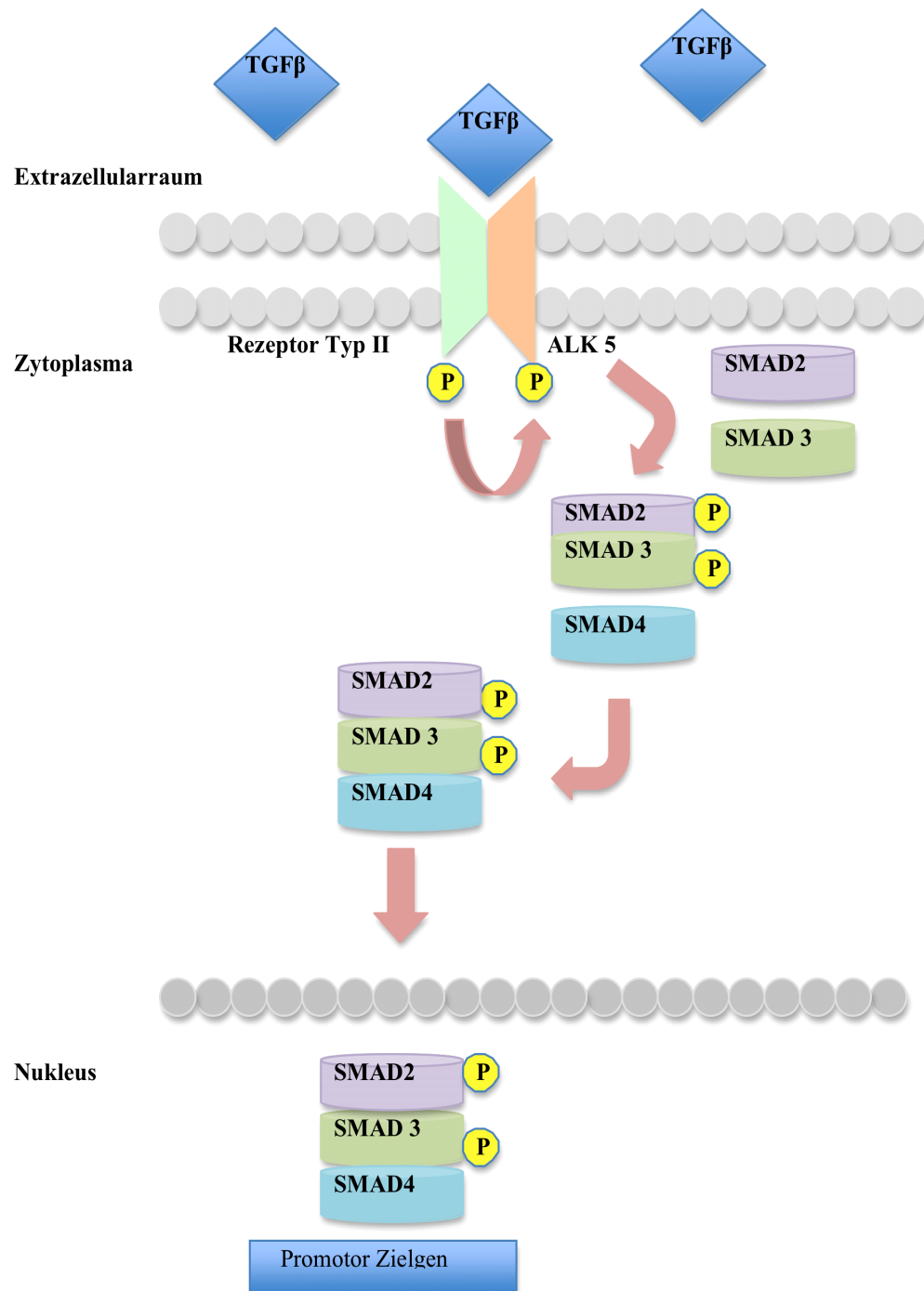


Abbildung 4: Darstellung des TGF- $\beta_1$ - Signalweges im Herzen

Eine Aktivierung der TGF $\beta_1$  / SMAD-Signalkaskade führt bei Kardiomyozyten zu einer Induktion der Apoptose (Schneiders et al., 2005). Hierbei kommt es zur Bildung und Translokation eines heterotrimeren Komplexes bestehend aus SMAD2 / SMAD3 und SMAD4 in den Nukleus. Hier werden Zielgene aktiviert.

Bei der TGF $\beta$ -induzierten Apoptose kommt es unter anderem zu einer SMAD-abhängigen Expression der Lipidphosphatase SHIP (Valderrama-Carvajal 2002). In Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass der TGF $\beta_1$ -induzierbare Transkriptionsfaktor TIEG1 über oxidativen Stress Apoptose vermittelt (Ribeiro & Gores 1999).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (Activator-Protein-1) kann mit dem heterotimeren SMAD-Komplex im Nukleus interagieren (Euler-Taimor & Heger, 2006) und Apoptose induzieren. Bei simultaner Anwesenheit und Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt es zu einer Induktion pro-apoptotischer Faktoren. Die SMAD-Proteine benötigen einen Kofaktor, um besser an die DNA zu binden. AP-1 ist ein Dimer bestehend aus Proteinen der bZIP Protein-Superfamilie, zu der die Jun-Proteine (JunB, c-Jun, JunD) und die Fos-Proteine gehören. Die simultane Aktivierung von AP-1 und SMAD-Proteinen könnte die Apoptose-Induktion im Rahmen der progredienten Herzinsuffizienz fördern.

Neben dem geschilderten SMAD-vermittelten Signalweg gibt es weitere TGF $\beta$ -induzierte Signalwege, die man auch als non-SMAD-pathway bezeichnet. Hierbei sind die c-Jun-N-terminal Kinase (JNK), die Extracellular Signal-Regulated Kinase (Erk) und die p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (Derynck et al., 2003) zu nennen. Auch die PI3-Kinase ist Bestandteil eines non-SMAD-pathways (Zhang, 2009).

### **2.3. Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid ist ein lipophiles Radikal, dessen Halbwertszeit wenige Sekunden beträgt. Aufgrund seines lipophilen Charakters kann NO Membranen per Diffusion frei passieren. NO kann als Radikal mit Proteinen chemische Reaktionen eingehen und damit regulatorisch auf physiologische und pathophysiologische Signalkaskaden einwirken (Wink et al., 1996). Im Jahre 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki erstmals die Rolle der Endothelzellen in Gefäßen bei Gefäßdilatation (Furchgott & Zawadzki, 1980). In Folgearbeiten identifizierte man eine vom Endothel freigesetzte dilatierende Substanz, die man EDRF (endothelium derived relaxing factor) bezeichnet (Ignarro et al., 1987). EDRF bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Es konnte gezeigt werden, dass EDRF und Stickstoffmonoxid identisch sind (Ignarro et al., 1987). NO wird substratspezifisch durch enzymatische Katalysation der terminalen Guanidgruppe aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Das erforderliche Enzym ist die NO-Synthase (Palmer & Moncada, 1989; Förstermann et al., 1993). In zwei Oxidationsschritten wird L-Arginin zu L-Citrullin umgesetzt. In einem ersten Oxidationsschritt wird L-Arginin mit molekularem Sauerstoff zu L-Hydroxyarginin umgesetzt. In einem zweiten Oxidationsschritt wird das gebildete L-Hydroxyarginin unter erneutem Einsatz von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid umgesetzt. An den Oxidationsschritten beteiligte Kofaktoren sind NADPH und Tetrahydrobiopterin.

#### **2.3.1. NO-Synthasen**

Die enzymatische Katalysation der NO-Produktion erfolgt durch die NO-Synthasen. In der Familie der NO-Synthasen unterscheidet man derzeit drei verschiedene Isoformen. Dies sind die neuronale NO-Synthase (nNOS), die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Bredt & Snyder, 1990). Die NO-Synthasen werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die nNOS wird vom *NOS I* Gen, die iNOS vom *NOS II* Gen und die eNOS vom *NOS III* Gen kodiert. Die Bezeichnungen

## Einleitung

sind historisch bedingt, da die eNOS zuerst in Endothel und die nNOS zuerst in Nervengewebe nachgewiesen wurde. Die neuronale und endotheliale NO-Synthase sind konstitutiv exprimierte Enzyme. Die iNOS hingegen wird beispielsweise im Rahmen der Infektabwehr durch Makrophagen induziert und wird nicht konstitutiv exprimiert. Die iNOS ist ein Enzym mit hoher Umsatzrate und zeigt eine High-Output-Kinetik (Nathan & Hibbs, 1991). Die Aktivität der iNOS ist nicht von Calcium abhängig und bleibt über wenige Tage konstant (Nathan & Hibbs, 1991; Nathan & Xie, 1994).

Die Aktivität der nNOS und eNOS unterliegt dem intrazellulären Calciumspiegel. Eine intrazelluläre Calciumerhöhung bewirkt eine Bildung des Calcium/Calmodulin-Komplexes. Hieraus resultiert eine Konformationsänderung der konstitutiv exprimierten NO-Synthasen. Das Enzym liegt nun in seiner aktiven Form vor (Schmidt et al., 1992; Försterman et al., 1995). Der Effekt dauert nur wenige Minuten an und die Umsatzrate ist niedriger. Es zeigt sich eine Low-Output-Kinetik.

Im Folgenden ist in Abbildung 5 ein Überblick über die Lokalisation der NO-Synthasen gegeben. Im kardiovaskulären Gewebe werden alle Isoformen exprimiert. Die NO-Synthasen unterscheiden sich jedoch in ihrer myokardialen und subzellulären Lokalisation. Es liegt eine unterschiedliche Kompartimentierung der NO-Synthasen vor (Hare & Stamler, 1999; Barouch et al., 2002; Hare, 2004). Die nNOS ist in den terminalen sympathischen (Schwarz et al., 1995) und parasymphatischen (Mohan et al., 2002) Nervenendigungen und in intrakardialen Neuronen (Sosunov et al., 1996) lokalisiert. In Herzen der Ratte dominiert die nNOS in den Atrien (Miethke et al., 2003). Während der Embryogenese liegt zwischen dem 9. und dem 14. Tag eine verstärkte iNOS-Expression vor, die abrupt abnimmt und zur Geburt verschwindet (Bloch et al., 1999). Während in Kardiomyozyten von intakten Herzen keine iNOS-Expression nachgewiesen werden kann, kommt es bei einer Schrittmacher-induzierten Herzinsuffizienz des Kaninchens zu einer erhöhten iNOS-Expression in den Kardiomyozyten (Aker et al., 2004).

In humanem Herzmuskelgewebe des linken Ventrikels liegt ein Lokalisationsgradient der eNOS vor, mit einem prädominierenden epikardialen Sitz gegenüber dem endokardialen Sitz (Brahmajothi & Campell, 1999). In humanem atrialen Myokard kann ebenfalls die eNOS nachgewiesen werden (Wei et al., 1996).

Bezüglich der subzellulären Lokalisation der NO-Synthase-Isoformen bestehen ebenfalls Unterschiede. Die nNOS konnte im sarkoplasmatischen Retikulum (Xu et al., 1999; Barouch et al., 2002) und im Sarkolemm (Damy et al., 2003, 2004; Xu et al., 2003) nachgewiesen werden. Die iNOS befindet sich nach Induktion hauptsächlich im Zytosol (Michel & Feron, 1997) und konnte in den Mitochondrien und dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran (Xu et al., 2003) nachgewiesen werden. Die eNOS ist bevorzugt in den Caveolen lokalisiert (Feron et al., 1996). Im sarkoplasmatischen Retikulum konnte keine eNOS nachgewiesen werden (Xu et al., 1999).

## Einleitung

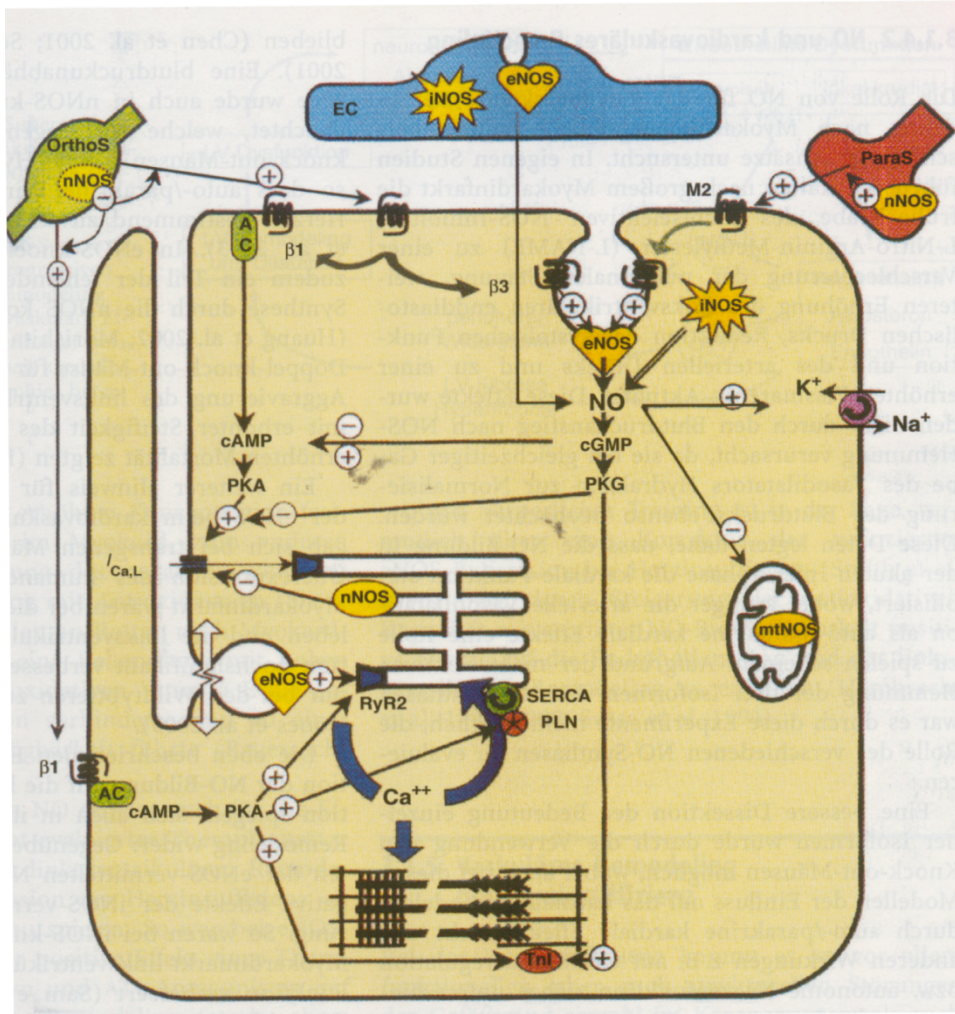


Abbildung 5: Übersicht über die Lokalisation der NO-Synthasen in Kardiomyozyten (Ganten und Ruckpaul: Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Springer Verlag 2006)

Auch die Mitochondrien enthalten NO-Synthasen (Brown, 2003; Kanai & Peterson, 2004). Sowohl die iNOS und eNOS (Zanella et al., 2004; Gonzales et al., 2005), als auch die nNOS (Hare, 2003) konnten in den Mitochondrien lokalisiert werden. Es handelt sich somit hierbei um keine neue Isoform, sondern um eine importierte posttranslational modifizierte, bereits bekannte Isoform.

Die drei Isoformen verfügen über eine gemeinsame Grundstruktur. Die Grundstruktur besteht aus einer Oxygenase-Domäne mit einer Häm-, L-Arginin- und Tetrahydrobiopterin-Domäne und einer Reduktase-Domäne mit FMN-, FAD- und NADPH-Domäne. Die Oxygenase-Domäne wird mit der Reduktase-Domäne durch eine Calcium/Calmodulin-Bindungsdomäne verbunden. Alle Isoformen bilden in der aktiven Form Homodimere aus.

Die regulatorischen Mechanismen der eNOS sind komplex. Eine Regulation kann durch Lipidierung, einen Calcium / Calmodulin abhängigen Mechanismus, direkte Protein-Protein Interaktion, Phosphorylierung, O-Glykosylierung und die Verfügbarkeit von Substrat und Cofaktoren erfolgen (Fulton et al., 2001; Flemming & Busse, 2003).

Eine Besonderheit der eNOS im unphosphorylierten Zustand ist die membrangebundene Lage in Caveolen. Phosphorylierung kann eine Translokation der eNOS in das Cytoplasma bewirken (Michel et al., 1993). Die Aktivität der eNOS kann

## Einleitung

durch Phosphorylierung von Serin und Threonin reguliert werden. Eine Phosphorylierung von Serin 617, Serin 635 und Serin 1177 führt zu einer Aktivierung der eNOS. Eine Phosphorylierung von Threonin 495 durch die Proteinkinase C oder die AMPK (Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase) bewirkt bei Abwesenheit von Calcium eine Hemmung der eNOS (Schulz, 2005).

Trotz der konstitutiven Expression der eNOS konnte bereits gezeigt werden, dass die eNOS auch transkriptionell reguliert ist. Erhöhter Scherstress in Endothelzellen induziert eine eNOS-Expression (Sessa, 1994).

	nNOS	eNOS	iNOS
Expression	konstitutiv	konstitutiv	induzierbar
Molekulargewicht	160 kD	135 kD	130 kD
Lokalisation	cytosolisch	membrangebunden cytosolisch	cytosolisch
Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin Abhängigkeit	Ja	Ja	Nein
NO-Freisetzung	pmol	pmol	nmol
Biologische Wirkung	neuronale Signalkaskaden, Erektion	Vasodilatation, thrombozytäre Aggregationshemmung	inflammatorische Prozesse, Cytotoxizität, DNA-Schädigung

Tabelle 3: Differenzierung der NO-Synthasen

### 2.3.2. Physiologische Rolle von NO

Trotz seiner erstaunlich simplen molekularen Struktur, nimmt NO in vielen Signalkaskaden eine wichtige Rolle ein. Dies erklärt auch die Wahl von NO zum Molekül des Jahres 1992 (Culotta & Koshland Jr, 1992).

Durch Aktivierung des Endothels durch Scherkräfte und Blutfluss kommt es zu einem physiologischen, NO-abhängigen, vasodilatatorischen Effekt mit dem Ziel der Regulation von Blutfluss und Blutdruck (Moncada, 1992). Bei der Versorgung des akuten Koronarsyndroms nutzt man die vasodilatierende Wirkung von NO-Donatoren, um die kardiale Vorlast zu senken und das akut geschädigte Herz zu entlasten. Hierfür nutzt man organische Nitrate und andere Nitrovasodilatoren wie Natriumprussid-Natrium und Isosorbid-5-mononitrat (ISMN-5) (Ahlner et al., 1991).

Auch im Zentralnervensystem spielt NO eine wichtige Rolle, bei der Signaltransduktion an Glutamat Rezeptoren (Moncada et al., 1989). Im Rahmen der Immunabwehr erfüllt NO eine zytotoxische und zytostatische Funktion (Sherman et al., 1991).

NO spielt auch bei der kardialen Apoptose eine wichtige Rolle (Schneiders et al., 2005). Beispielsweise bei myokardialen Infarkten, dekompensierter Herzinsuffizienz und bei Remodelling Prozessen. Unter Verwendung von AP-1- und SMAD-Decoy-Oligonukleotiden lässt sich die NO-induzierte Apoptose inhibieren (Taimor et al., 2001).



Viele physiologische Effekte von NO werden durch das cyclische Nukleotid cGMP vermittelt (Waldmann & Murad 1987; Dierks & Burstyn 1996). NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase (soluble guanylyl cyclase, sGC), welche mit der membranständigen Guanylatcyclase und der Adenylatcyclase zur Familie der Nukleotid-Cyclasen gehört. Physiologische Aktivatoren der sGC sind NO und Kohlenstoffmonoxid CO (Furchgott & Jothianandan, 1991). Es gibt jedoch auch andere Angriffspunkte von NO. So kann NO auch über andere zelluläre Elemente wie transmembranäre Ionenkanäle unter Umgehung der sGC seine Wirkung vermitteln (Bolotina et al., 1994; Xie et al., 1996). Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen cGMP-abhängigen und einen cGMP-unabhängigen Signaltransduktionsweg für NO gibt (Hu et al., 1997; Xie et al., 1996).

### 2.3.3. Rolle der NO-Synthasen am Herzen

Aktuell liegt eine Vielzahl an Veröffentlichungen über die Rolle der nNOS und eNOS und deren modulatorische Wirkung auf die Herzfunktion vor. Teilweise sind diese Veröffentlichungen von widersprüchlicher Natur.

Die nNOS verfügt über einen negativ chronotropen Effekt, der einerseits über eine verminderte präsynaptische Noradrenalinfreisetzung und andererseits über eine vermehrte vagale Aktivität durch vermehrte Acetylcholinfreisetzung vermittelt wird (Paton et al., 2002; Sears et al., 2004). Desweiteren hat die nNOS einen negativ inotropen Effekt, durch Hemmung des Calcium-Einstroms (Ashley et al., 2002). Während eines Myokardinfarktes ist sowohl die nNOS-Expression, als auch die Aktivität im infarzierten und nicht-infarzierten Gewebe erhöht (Takimoto et al., 2002). Ein möglicher protektiver Effekt der nNOS zeigt sich aufgrund der Tatsache, dass die nNOS vagale Effekte verstärken kann und unter selektiver Inhibition der nNOS es zu einem Anstieg der Herzfrequenz kommt (Takimoto et al., 2002). Bei einer durch Myokardinfarkt induzierten Herzinsuffizienz ist die nNOS überreguliert und es findet eine Translokation vom sarkoplasmatischem Retikulum zum Sarkolemm bei der Ratte (Damy et al., 2003; Bendall et al., 2004) und auch beim Menschen (Damy et al., 2004) statt.

In der akuten Phase eines Myokardinfarktes ist die Expression der eNOS unverändert (Prabhu et al., 2000) oder vorübergehend erhöht (Horinaka et al., 2004). Die Aktivität der myokardialen eNOS scheint in den ersten 3 Tagen nach einem Myokardinfarkt unverändert zu sein (Wildhirt et al., 1997; Takimoto et al., 2002). In der chronischen Phase eines Myokardinfarktes ist die kardiale eNOS-Expression (de Frutos et al., 2001; Damy et al., 2003) und die Aktivität (Bauersachs et al., 1999; Damy et al., 2003; Ratajczak et al., 2003) konstant vermindert. Interessanterweise gibt es eNOS-Polymorphismen wie den Glu298Asp Genotyp, welcher mit einem erhöhtem Risiko für die Koronare Herzkrankheit (Casas et al., 2004), Koronarspasmen (Chang et al., 2003) und mit einem erhöhtem Todesrisiko (Gorchakova et al., 2003) einhergeht. Herzen von eNOS Knockout (-/-) Mäusen zeigen schlechte systolische und diastolische Parameter, eine verminderte Kapillardichte, ein hypertrophes Remodeling und eine erhöhte 4 Wochen Mortalität nach Myokardinfarkt im Vergleich zu Herzen von Wildtyp Mäusen (Scherrer-Crosbie et al., 2001).

Die Calcium-unabhängige iNOS ist Teil des angeborenen Immunsystems und verantwortlich für proinflammatorische Effekte. TNF $\alpha$  und Interleukin-1 führen zu einer iNOS-Induktion (Ungureanu-Longrois et al., 1995b). Im myokardialen



Infarktgebiet ist die iNOS-Expression (Takimoto et al., 2000) und Aktivität (Wildhirt et al., 1997) zwei bis drei Tage nach Infarkt erhöht. Bei Patienten mit SIRS (systemic inflammatory response syndrome) trägt eine Aktivierung der iNOS im Myokard zu einem septischen Schock bei (Ungureanu-Longrois et al., 1995a). Auf der anderen Seite sind auch protektive Effekte der iNOS beschrieben. Die iNOS-vermittelte NO-Freisetzung induziert eine Aktivierung der konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 mit Synthese des protektiven Prostaglandin E2 (Devaux et al., 2001).

### **2.4. PI3-Kinase**

Die Gruppe der Phosphoinosit-3-Kinasen (PI3-Kinasen) gehört zu den Lipidkinasen und wird in allen eukaryontischen Zellen exprimiert. Die PI3-Kinasen nehmen durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen an der zellulären Signaltransduktion teil (Engelman et al., 2006) und sind an der Regulation von Wachstum, Zellmetabolismus und Mitose beteiligt (Cantley, 2002; Katso et al., 2001; Vivanco & Sawyers, 2002).

Die Familie der PI3-Kinasen stellt eine Proteinfamilie dar, welche sich in 3 unterschiedliche Klassen einteilen lässt (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999; Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003). PI3-Kinasen der Klasse I können noch in die Klasse IA und IB differenziert werden und besitzen insgesamt vier katalytische Isoformen (Vanhaesebroeck et al., 2005). Die Klasse II und III sind bisher weniger genau charakterisiert und es ist bis jetzt nur jeweils eine Isoform bekannt.

Die PI3-Kinase spielt auch im Rahmen der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion eine Rolle (Yi et al., 2005). Neben der SMAD-Aktivierung gibt es auch einige non-SMAD Signalwege. An einem dieser non-SMAD Signalwege ist die PI3 Kinase beteiligt. In Epithelzellen konnte eine Interaktion und Aktivierung der PI3-Kinase durch den TGF- $\beta$ -Rezeptor-Typ I gezeigt werden (Yi et al., 2005).

In menschlichen Lungenepithelzellen konnte nach Stimulation mit TGF- $\beta_1$  eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalweges gezeigt werden (Lin et al., 2007). Es konnte eine Phosphorylierung der Proteinkinase Akt gezeigt werden, die mit dem PI3-Kinase-spezifischen Inhibitor Ly294002 supprimierbar war. Die Proteinkinase Akt kann Einfluss auf die Regulation der eNOS nehmen und die eNOS an den Aminosäuren Ser-1177 und Ser-617 phosphorylieren und aktivieren (Mount et al., 2007).

Wenngleich die PI3-Kinase primär in anti-apoptotischen Signalwegen eine Rolle spielt, so ergeben sich Hinweise, dass die PI3-Kinase über die Interaktion mit der Proteinkinase Akt sowohl an apoptotischen als auch an anti-apoptotischen Signalwegen beteiligt ist (Sánchez-Capelo, 2005). Ebenso konnte eine Interaktion der Proteinkinase Akt mit SMAD 3 gezeigt werden (Sánchez-Capelo, 2005).

## 2.5. Fragestellung

Im Herzen findet man bei längerer Druckbelastung einen Übergang von einer kompensierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz, einhergehend mit einer erhöhten TGF $\beta$ -Expression und Apoptose-Induktion. In adulten Kardiomyozyten führt die Stimulation mit TGF $\beta_1$  zur Apoptose mit SMAD-Aktivierung (Euler-Taimor & Heger, 2006), die auch bei einer Gabe von Stickstoffmonoxid (NO) zu beobachten ist (Schneiders et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von NO für die TGF $\beta_1$ -induzierte Apoptose zu untersuchen. Hierbei sollte evaluiert werden, ob es sich um zwei voneinander getrennte apoptotische Wege handelt, oder ob die NO-Freisetzung mit der TGF $\beta_1$ -vermittelten Apoptose positiv korreliert und eine kausale Bedeutung in diesem TGF $\beta_1$ -vermittelten Signalweg hat (Abbildung 6).

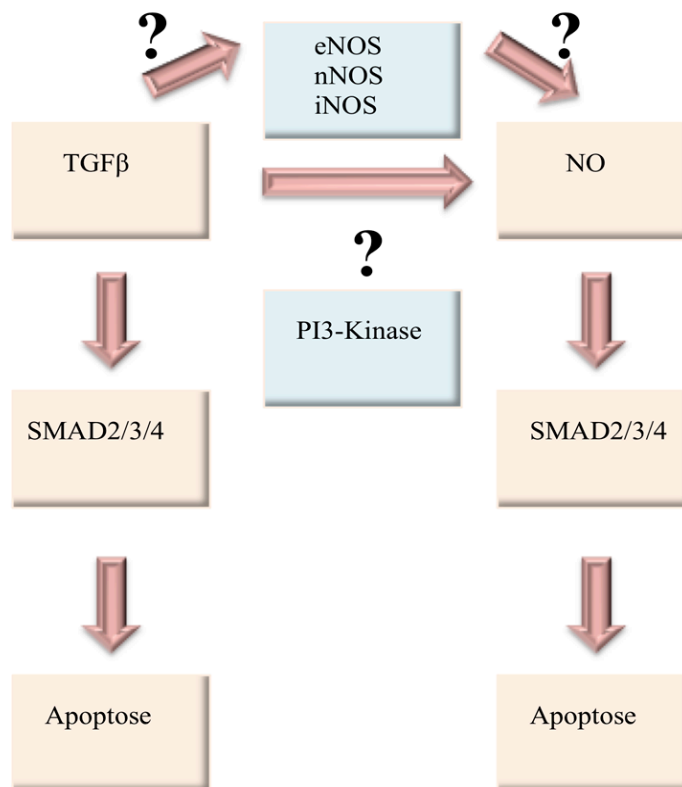


Abbildung 6: Darstellung der Fragestellung ob ein Zusammenhang zwischen NO-induzierter Apoptose und TGF $\beta_1$ -induzierter Apoptose besteht.

Ein weiteres Ziel war es, die verantwortliche NO-Synthase, die für den TGF $\beta_1$ -abhängigen NO Anstieg verantwortlich ist, zu charakterisieren (Abbildung 6). Desweiteren sollten die Signalwege der TGF $\beta_1$ -/NO-induzierten Apoptose genauer analysiert werden

### **3. Material**

#### **3.1. Versuchstiere**

Es wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten im Alter von drei bis vier Monaten mit einem Lebendgewicht von 300-400 g verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht des Physiologischen Institutes in Gießen. Die Versorgung der Tiere erfolgte mit Wasser und Standardfutter von Altromin® ad libitum.

#### **3.2. Chemikalien**

6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hamburg
APS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Coomasie Brilliant Blue G 250	Merck, Darmstadt
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz	Sigma, Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
HOECHST Farbstoff 33253	Sigma, Taufkirchen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim

## Material

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid ( $CaCl_2$ )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfat ( $CuSO_4$ )	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4 \times 7 H_2O$ )	Roth, Karlsruhe
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natrium-Acetat	Riedel, Hannover
Natrium-Carbonat ( $Na_2CO_3$ )	Roth, Karlsruhe
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$ )	Roth, Karlsruhe
Natrium-Hydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	AppliChem, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau-S-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton x-100	AppliChem, Darmstadt
Trizol	PEQLAB, Erlangen
Trypsin	PAA, Cölbe
TWEEN 20	Applichem, Darmstadt

### 3.3. Substanzen, Antikörper, Inhibitoren und Enzyme

Reverse Transcription-Kit	Qiagen, Hilden
Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix	Thermo Fisher Scientific Surrey, UK
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	PEQLAB, Erlangen
100 bp DNA - Marker	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Rainbow Molecular Weight Marker	Bio-Rad, München
anti P-SMAD rabbit # 3101	Cell signaling, Danvers, USA
anti SMAD2 mouse # 3103	Cell signaling, Danvers, USA
anti Vinculin mouse # V0131	Sigma, Taufkirchen
anti Rabbit IgG, HRP-linked # 111-035-003	Dianova, Hamburg
anti Mouse IgG, HRP-linked # 7076	Cell signaling, Danvers, USA
pNOS3 (Ser 1177): sc12972	Santa Cruz
anti Goat Fluorescein # 605-4213	Biomol
Oligonukleotide AP-1	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonukleotide SBE	Invitrogen, Karlsruhe
TGFβ <sub>1</sub> Porcine Plateletts	Merck, Darmstadt
SB431542	Cayman Chemical Compagny, Michigan USA
Ly294002	Merck, Darmstadt
Wortmannin	Merck, Darmstadt
1400W	Calbiochem Merck, Darmstadt
TFA	Calbiochem Merck, Darmstadt
ETU	Calbiochem Merck, Darmstadt
Laminin	Roche Applied Science, Mannheim
DAF-FM	Invitrogen, Karlsruhe
Caspase-Glo® 3/7	Promega, Mannheim

### 3.4. Primer für real-time RT-PCR

Die aufgeführten Primer mit ihren aufgelisteten Nukleotidsequenzen wurden in der real-time RT - PCR (Firma Invitrogen, Karlsruhe) benutzt.

Aktin	GAA GTG TGA CTG TGA CAT CCG	fw-Primer Sequenz
	TGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA	rev-Primer Sequenz
18s-rRNA	QT 00199374	Qiagen, Hilden
SMAD7	AGA GGC TGT GTT GCT GTG	fw-Primer Sequenz
	CAT CGG GTA TCT GGA GTA AGG	rev-Primer Sequenz

## Material

DAPK1	TGA GAA TGT GAG CGT GAG GAG	fw-Primer Sequenz
	GAG CAG TGT AGG TGG TGA GAC	rev-Primer Sequenz
Tieg1	CGG AGA AGA ACC CAC ATA ATG	fw-Primer Sequenz
	GAA GGC ACA GCA AAG TCA TAC	rev-Primer Sequenz
SHIP	AAG AGG TGG AGA ATG TCA AG	fw-Primer Sequenz
	TCA GCA GAG GAG GAA CAG	rev-Primer Sequenz

### **3.5. Oligonukleotide für Retardation Assay**

Die aufgeführten Oligonukleotide mit ihren aufgelisteten Nukleotidsequenzen wurden beim Electrophoretic Mobility Shift Assay verwendet.

AP1-1	GAT CCG CTT GAT GAG TCA GCC GGA A
AP1-2	TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG GAT C
SBE 1	GTA CAT TGT CAG TCT AGA CAT ACT
SBE 2	AGT ATG TCT AGA CTG ACA ATG TAC

### **3.6. Puffer, Lösungen, Medien und Ansätze**

#### Powell-Medium

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

#### CCT-Kulturmedium

M199	x ml
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM

## Material

Taurin	5 mM
Penicillin	100 IU / ml
Streptomycin	100 IU / ml
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	10 $\mu$ M
Hepes	36 g / 10 l

### Vorplattiermedium

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

### Vorplattiermedium bei Arbeiten mit Coverslips

CCT - Medium	20ml
Penicillin / Streptomycin	400 $\mu$ l
Laminin	24 $\mu$ l

### Ausplattier- und Waschmedium für Kardiomyozyten

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

### RIPA-Stocklösung

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

### RIPA-Puffer

RIPA-Stocklösung	945 $\mu$ l
PMSF 0,1M	10 $\mu$ l
EDTA 0,2 M	5 $\mu$ l
$\beta$ -Glycerolphosphat, 400mM	100 $\mu$ l

### 10 x PBS

KCl	2,68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM

## Material

NaCl	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,09 mM

### Quantitative Proteinbestimmung (LOWRY-Assay)

#### Lowry-Lösung 1

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

#### Lowry-Lösung 2

1 M Kupfersulfat	1,25 g
Aqua bidest.	Ad 1l

#### Lowry-Lösung 3

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

#### Lowry-Lösung 4

NaOH, 1N	4g
Aqua bidest.	Ad 1l

#### Lowry-Lösung 5

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

#### Lowry-Reagenz A

Lowry-Lösung 1	200 µl
Lowry-Lösung 2	200 µl
Lowry-Lösung 3	19,6 ml

#### Acrylamid 30%

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



## Material

### Westernblot-Trenngel (10%)

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

### Westernblot-Sammelgel

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

### Westernblot-Laufpuffer

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

### 4 x Lämmli-Puffer

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

### Immunoblot-Verfahren:

#### Kathodenpuffer A

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

## Material

### Anoden-Puffer B

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

### Anoden-Puffer C

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

### 10 x TBS

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
pH 7,4	

### Waschpuffer für Westernblot

TWEEN 20	0,1 % (vol / vol)
1 x TBS	Ad 1l

### Westernblot-Blocklösung

Magermilchpulver	5g
1 x TBS	100 ml
TWEEN 20	500 µl

### Antikörper-Lösung

BSA oder Magermilchpulver (MMP)	5g
1 x TBS	100ml
TWEEN 20	500 µl

### Retardation-Assay-Storagepuffer

NaCl	300 mM
KCl	50 mM
HEPES, pH 7,5	10 mM
EDTA	10 mM
DTT	1 mM

## Material

PMSF	1 mM
Glycerol	20 %

### Retardation-Assay-Schwellungspuffer

Tris / HCl, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
DTT	1 mM

### Retardation-Assay-Homogenisierungspuffer

Tris / HCl, pH 7,9	10 mM
Saccharose	300 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,3 % (wt / vol)

### Bradford-Reagenz

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

### Retardation-Assay-Gel

Acrylamid / Bisacrylamid	4 ml
5 x TBE-Puffer	4 ml
Glycerin	1 ml
Aqua bidest.	ad 40 ml
TEMED	34 µl
APS 10%	200 µl

### real-time RT-PCR:

#### 1 x TAE

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

## Material

### Agarosegel für PCR-Gel-Elektrophorese

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

### PCR-Marker

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

### PCR-Auftragspuffer

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

## **3.7. Geräte und Laborbedarf**

### 3.7.1. Zellpräparation und Zellkultur

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Langendorff-Apparatur	Eigenbau Physiologie Gießen
Gewebehacker	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau

### 3.7.2. Westernblot

Spacer	Hoefler, Amersham, USA
Kamm	Hoefler, Amersham, USA
Glasplatten	Hoefler, Amersham, USA
Plattenklemme	Hoefler, Amersham, USA
Hamilton-Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Elektrophoresekammer	Hoefler, Amersham, USA
Blotkammer	Hoefler, Amersham, USA
Laboflex-Silikon-Schlauch	Kronlab, Dinslaken
Filterpapier	Biotec, Fischer, Reiskirchen

## Material

CHEMI-SMART <sup>TH</sup> 5100	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Netzgerät, Biometra	Biometrische Analytik, Göttingen
Nitrocellulose Transfer-Membran	Whatman GmbH, Dassel
Trockenpapiere Universal	BIOTECH-Fischer GmbH, Reiskirchen

### 3.7.3. Caspase 3/7-Assay

24 Wellplatten	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Microplate reader Tecan infinite 200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

### 3.7.4. Retardation-Assay

Fluoreszenz-Molecular-Imager	BioRad, München
Glasmörser	B. Braun, Melsungen
Hamiltonspritze ( 50 µl )	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefer Elektrophoresekammer	Hoefer, Amersham, USA
Netzgerät Typ Biometra	Biometrische Analytik, Göttingen
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid

### 3.7.5. real-time RT-PCR

Thermo-Cycler	Techne LTD, UK
iCycler	BioRad Laboratories GmbH, München
UV-Strata-Linker 2400	Stratagene, USA
NanoDropND-1000 UV/Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pellet-Pestle-Motor	Kimble, Chase, USA
Pellet-Pestle	Kimble, Chase, USA
0,2 ml Thermo-Strip	Thermo Fisher, UK

### 3.7.6. DAF-Assay

CCD-Kamera	TILL Photonics, Gräfeling
Dichroid-Spiegel	Olympus, Hamburg
Emissionsfilter	Olympus, Hamburg
Monochromator	TILL Photonics, Gräfeling
Xenon-Lampe	TILL Photonics, Gräfeling
Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus, Hamburg

## Material

### 3.7.7. Sonstige Geräte

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Laborwaage	Mettler Toledo, Schweiz
Magnet-Heizrührer	IKA Works Inc., USA
Pipetten	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
pH-Meter	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Aqua bidest.-Anlage	Heraeus-Schott GmbH, Hanau
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	IKA Works Inc., USA
Millipore-Anlage	Millipore S.A.S., Frankreich
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizblock (Dry Block DB 3 D)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Heizblock (Dry Block DB 2 A)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Microplate reader Tecan infinite 200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Schüttler Type Polymax 2040	Heidolph, Schwabach

### 3.7.8. Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Millipore S.A.S., Frankreich
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Coverslips	Menzel, Braunschweig
Falcons	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Handschuhe Größe M	Nobaglove-Latex, Wetter
Kryotubes	Simport Plastics, Kanada
24-Wellplatten	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
96-Wellplatten	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
24-Wellplatten schwarz	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Frischhaltefolie	Aldi Süd, Mühlheim

### 3.8. Software

Microsoft Windows 2003	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2003	Microsoft Corp., USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft Corp., USA
Quantity One 4.3.1.	Bio-Rad Laboratories, USA
Magellan 6.6.2009	Tecan, Crailsheim
Nanodrop ND-1000 3.5.1.	Labview, USA

## Material

SPSS Version 20	SPSS GmbH Software, München
Till Vision	TILL Photonics, Gräfeling

## **4. Methoden**

### **4.1. Zellkultur von ventrikulären Kardiomyozyten**

#### **4.1.1. Präparation von ventrikulären Kardiomyozyten**

Die Präparation der Rattenherzen und die Isolation der Kardiomyozyten wurde nach der Methode von Schlüter et al. (2005) durchgeführt. Powell-Medium wurde in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und durch Begasung mit Carbogen eine Stabilisierung des pH-Wertes gewährleistet. Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde mit autoklaviertem Aqua bidest und anschließend mit Powell-Medium gespült. Im Anschluss wurde die Anlage luftblasenfrei mit 80 ml Powell-Medium befüllt.

Die Anästhesie der Ratten erfolgte unter dem Abzug in einem mit Isofluran (4%) befüllten Glasbehälter. Nach ca. zwei bis drei Minuten stellte sich eine ausreichende Narkosetiefe ein.

Die Ratten wurden durch Hyperextension des Rückenmarkes getötet und eine Thorakotomie durchgeführt. Das Herzlungenpaket wurde entnommen und in eine mit 0,9 % Kochsalzlösung gefüllte Petrischale überführt. Das Herzlungenpaket wurde vom Lungengewebe befreit und die Aorta ascendens dargestellt. Durch Kanülierung der Aorta ascendens mittels einer Glaskanüle erfolgte der Anschluss des Herzens an die Perfusionsanlage. Durch retrograde Perfusion des Herzens mit 40 ml Powell-Medium wurde das sich noch im Herzen befindende Blut ausgespült. Unter Zugabe von 10 ml Kollagenase in das Reservoir, welches noch 40 ml Powell-Medium beinhaltete, erfolgte eine Perfusion des Herzens für 30 Minuten bei 37 °C (1 Tropfen / Sekunde). Nach Beendigung der Perfusion wurde sowohl das aortale, als auch das atriale Gewebe entfernt. Das ventrikuläre Gewebe wurde auf ein Uhrglas transferiert, und 2mal mittig inzidiert und mit einem Gewebehacker mit einer Schnittbreite von 0,7 mm längs und quer zerkleinert. Das ventrikuläre Zellgemisch wurde in einem Teflongefäß bei 37 °C im Wasserbad mit 30 ml Perfusionslösung und 10 ml Kollagenase unter Carbogenbegasung mit einer Pipette durchmischt und für 5 Minuten nachverdaut, bis eine ausreichende Homogenisierung eintrat. Das homogenisierte Zellgemisch wurde durch eine Nylongase (Porendiameter 200 µm) filtriert und im Anschluss in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für drei Minuten bei 400 UpM zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus Endothelzellen, Fibroblasten und Kollagenase, wurde abgesaugt. Zu den Kardiomyozyten wurden 15 ml auf 37 °C erwärmtes Powell-Medium und 500 µl CaCl<sub>2</sub> (100 mM) zugegeben. Nun wurden die Kardiomyozyten für eine Minute bei 300 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Bei fachgerechter Durchführung wurde eine Zellpopulation von 40-60 % stäbchenförmigen intakten Kardiomyozyten gewonnen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter permanenter Einhaltung einer sterilen Arbeitsweise.



### 4.1.2. Vorinkubation der Zellkulturschalen

Am Vortag der Präparation erfolgte die Vorbereitung der Zellkulturschalen. Hierfür wurden die Zellkulturschalen mit Vorplattiermedium im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Das im Vorplattiermedium enthaltene FCS gewährleistete eine optimale Anheftung der Kardiomyozyten an dem Schalenboden. Bei Arbeiten mit Coverslips wurde statt FCS Laminin verwendet, um eine Anheftung der Kardiomyozyten an diesem amorphen Feststoff zu erreichen. Unmittelbar vor dem Transfer der Kardiomyozyten wurde das Vorplattiermedium abgesaugt.

### 4.1.3. Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die gewonnenen Kardiomyozyten wurden unmittelbar in ein Fläschchen mit 37 °C warmen Ausplattiermedium transferiert und durch dezentes Schwenken und Pipettieren vermischt. Pro Herz wurde ein Volumen von 24 ml Ausplattiermedium verwendet. Durch äußerst vorsichtiges Pipettieren wurden die Kardiomyozyten in die abgesaugten Zellkulturschalen überführt.

### 4.1.4. Kultivierung der Kardiomyozyten

Im Anschluss an das Ausplattieren wurden die Schalen für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Intakte Kardiomyozyten zeigten mikroskopisch eine Anheftung am Schalenboden bzw. Coverslip. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, indem das Ausplattiermedium abgesaugt und durch ebenfalls auf 37 °C erwärmtes Waschmedium ersetzt wurde. Dezente Schwenkbewegungen garantierten eine Separation von intakten haftenden und nicht haftenden geschädigten Kardiomyozyten. Es erfolgte eine Absaugung des Waschmediums und eine erneute Zugabe von Waschmedium. Diese Waschschrte führten zu einer Entfernung nicht anhaftender Zellen und unter mikroskopischer Kontrolle konnte ein Gehalt von ungefähr 90% haftender, stäbchenförmiger, vitaler Kardiomyozyten verifiziert werden. Die gewonnen Kardiomyozyten wurden für die nachfolgenden Versuche eingesetzt.

## **4.2. Apoptosebestimmung**

Als Nachweisverfahren der Apoptose wurden in dieser Arbeit zwei Methoden gewählt. Ein Nachweisverfahren der frühen apoptotischen Vorgänge stellt der Caspase 3/7-Assay dar. Als spätes apoptotisches Nachweisverfahren wurde die HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung gewählt.

### 4.2.1. Caspase 3/7-Assay

Aktivitätsmessungen der cytoplasmatischen Kaspasen 3 und 7 ermöglichen frühe apoptotische Vorgänge der Apoptosekaskade nachzuweisen. Die Kaspaseaktivierung der apoptotischen Kardiomyozyten lässt sich mittels Chemilumineszenz-Detektion messen. Kardiomyozyten wurden auf schwarzen 24-Well-Platten mit transparentem Boden ausplattiert (1 ml / Well) und bei 37 °C kultiviert. Damit die Zellen am Wellboden haften, wurde 1 µl Laminin pro ml Vorplattiermedium benutzt. Die Zellen wurden je nach Bedingung stimuliert und nach einer Stimulationszeit von sechs Stunden gemessen (siehe Tabelle 4). Hierfür wurde das sich in den Wells befindende Medium bis auf 200 µl abgesaugt und 200 µl des prolumineszenten Caspase 3/7 Substrates in jedes Well gegeben. Lichtgeschützt durch zwei Plastikschaalen wurden die Wells für eine Stunde in den Brutschrank bei 37 °C gestellt und im Anschluss gemessen. Der Reaktionsmechanismus beruht auf einer im Substrat enthaltenen Tetrapeptidsequenz (DEVD), die von aktivierten Kaspasen gespalten wird. Das entstandene Aminoluziferin wird durch Luziferasen gespalten und das hierbei entstehende chemilumineszente Signal kann mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers detektiert werden (Abbildung 7). Da die Zellzahl trotz äquivalenter Ausplattierolumina einer gewissen Schwankung unterliegt, wurde im Anschluss an die Aktivitätsmessung eine Proteinmengenbestimmung nach LOWRY (siehe 4.3.2.) der jeweiligen Wells durchgeführt und ein Quotient gebildet. Der Quotient dient einer Korrektur des Aktivitätssignals und bezieht dieses auf den Proteingehalt und näherungsweise auf die tatsächliche Zellzahl.

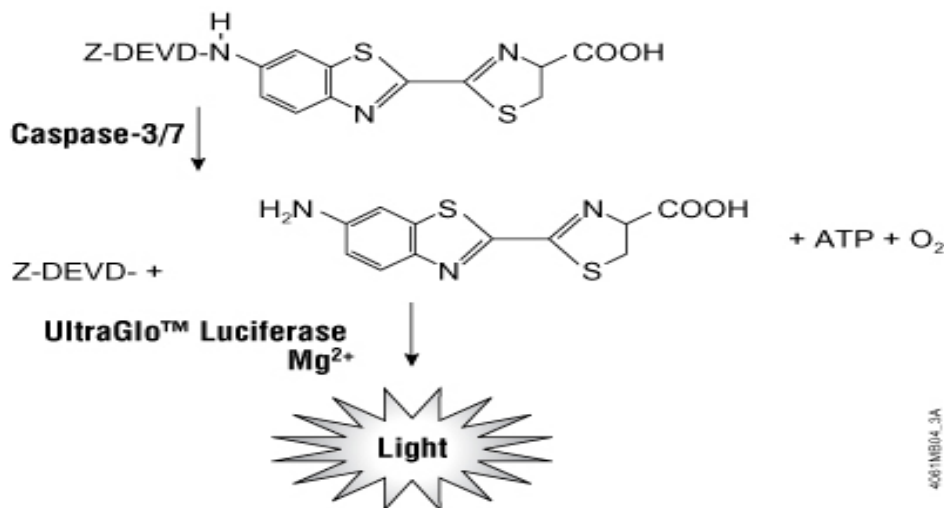


Abbildung 7: Reaktionsschema zur Messung der Caspase- 3/7 Aktivität ( Quelle [www.promega.com](http://www.promega.com) )

Im Folgenden sind in Tabelle 4 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet:

	Vorinkubation	Inkubation
Kontrolle	15min ohne Inhibitor	6h ohne TGFβ <sub>1</sub>
TGFβ <sub>1</sub>	15min ohne Inhibitor	6h mit TGFβ <sub>1</sub> : 1 µg/L

## Methoden

Inhibitor	15min mit Inhibitor	6h ohne TGF $\beta_1$
Inhibitor + TGF $\beta_1$	15min mit Inhibitor	6h mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu$ g/L

Tabelle 4: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibition aller NO-Synthasen wurde der Inhibitor ETU (1  $\mu$ M) eingesetzt.  
Zur Inhibition des ALK5-Rezeptors wurde der Inhibitor SB431542 (1  $\mu$ M) eingesetzt.  
Zur Inhibition der PI3-Kinase wurde der Inhibitor Ly294002 (10  $\mu$ M) eingesetzt.

### 4.2.2. HOECHST 33258 / Propidiumiodid-Färbung

Ein Charakteristikum der späten Effektorphase der Apoptose stellt die Kondensation des Chromatins dar. Ein quantitatives Verfahren zur Analyse apoptotischer Vorgänge stellt der HOE-Assay dar.

Der Farbstoff HOECHST 33258 ist ein membrangängiger, das Chromatin blau-färbender Farbstoff. Propidiumiodid hingegen ist ein nicht-membrangängiger Farbstoff, der das Chromatin nur, sofern die Zelle nicht mehr intakt ist, rot färbt. Propidiumiodid wird bei einer Wellenlänge von 510-550 nm, HOECHST 33258 bei einer Wellenlänge von 340-360 nm angeregt.

Intakte Kardiomyozyten imponieren durch längliche blau-gefärbte Kerne und durch eine stäbchenförmige Gesamtzellmorphologie. Apoptotische Kardiomyozyten hingegen zeigen einen Verlust der stäbchenförmigen Gesamtzellmorphologie und abgerundete, blau-gefärbte Kerne. Nekrotische Kardiomyozyten imponieren ebenfalls durch den Verlust der stäbchenförmigen Gesamtzellmorphologie und durch blaue abgerundete Kerne. Gleichzeitig ist die geschädigte Membran auch für Propidiumiodid permeabel und die abgerundeten Kerne leuchten bei entsprechender Anregungswellenlänge auch rot (siehe Abbildung 8).

Zur Differenzierung von intakten, apoptotischen und nekrotischen Zellen und zur Bestimmung der Apoptoserate bei unterschiedlichen Bedingungen wurden Kardiomyozyten auf Zellkulturschalen wie in Kapitel 4.1. beschrieben kultiviert. Nach erfolgter Stimulation (siehe Tabelle 5) wurden die Kulturschalen, die ein Volumen von ein ml Medium beinhaltenen, mit fünf  $\mu$ l HOECHST 33258 und fünf  $\mu$ l Propidiumiodid angefärbt und nach einer viertel Stunde Inkubationszeit unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Pro Kulturschale wurden jeweils zweihundert Kardiomyozyten nach den Kriterien intakt, apoptotisch und nekrotisch differenziert. Der prozentuale Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde auf die Gesamtzahl n=200 bezogen.

## Methoden

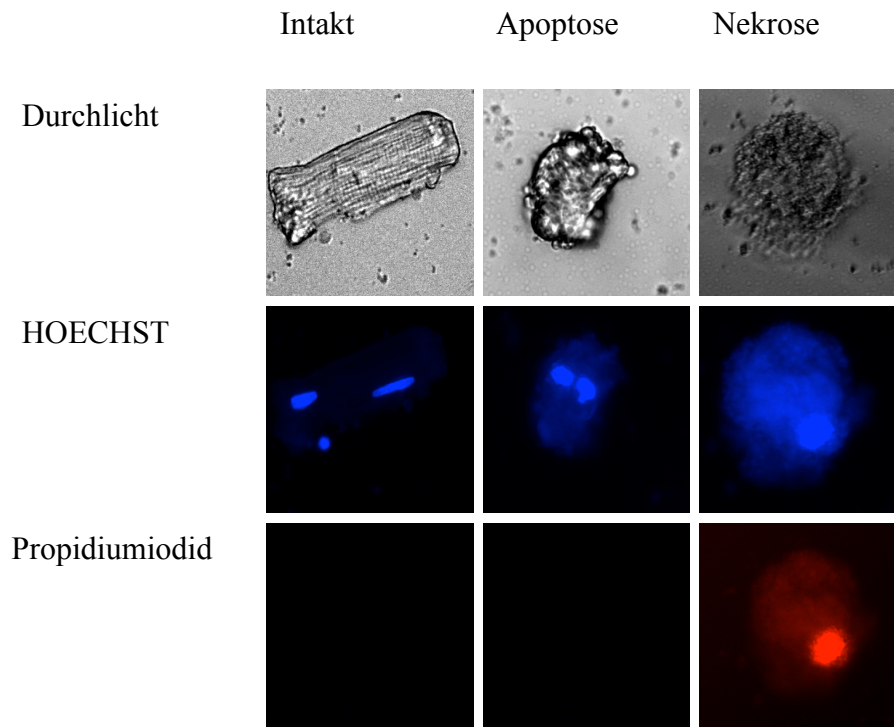


Abbildung 8: Differenzierung von intakten, apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten mittels einer HOECHST 33528 / Propidiumiodid-Färbung.

Im Folgenden sind in Tabelle 5 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet:

	Vorinkubation	Inkubation
Kontrolle	30 min ohne Inhibitor	24 h ohne TGF $\beta_1$
TGF $\beta_1$	30 min ohne Inhibitor	24 h mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$
Inhibitor	30 min mit Inhibitor	24 h ohne TGF $\beta_1$
Inhibitor + TGF $\beta_1$	30 min mit Inhibitor	24 h mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$

Tabelle 5: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibition des ALK5-Rezeptors wurde der Inhibitor SB431542 (1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Zur Inhibition der PI3-Kinase wurde der Inhibitor Ly294002 (10  $\mu\text{M}$ ) und der Inhibitor Wortmannin (100 nM) eingesetzt.

### 4.3. Western-Blot

#### 4.3.1. Gesamtproteinisolation mittels RIPA-Puffer

Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 4.1. präpariert und in Kulturschalen kultiviert. Die Kardiomyozyten wurden nach erfolgter Stimulation für zwei Stunden inkubiert und im Anschluss geerntet (siehe Tabelle 6). Ziel der Gesamtproteinisolation ist es, die zellulären Proteine zu isolieren.

Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und mit zwei ml eiskaltem 1 x PBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des PBS-Puffers wurden 200 µl RIPA-Puffer in die Kulturschalen gegeben. Detergentien im Puffer ermöglichen eine Permeabilisierung der Zellmembran, Lösung von Proteinen und eine Hemmung der Proteinaggregation. Des Weiteren beinhaltet der RIPA-Puffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren. Mit einem Zellschaber wurden die haftenden Kardiomyozyten sorgfältig gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Es wurden fünf µl Benzonase (50 U/ml) und vier µl Magnesiumchlorid (130 mM) zugegeben. Die Benzonase als Endonuklease wird durch Magnesiumchlorid aktiviert und degradiert enthaltene DNA und RNA. Ein Hand-Homogenisator unterstützt mechanisch die Lyse. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gelagert und dann für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert und das Zellpellet wurde verworfen.

Im Folgenden sind in Tabelle 6 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet:

	Vorinkubation	Inkubation
Kontrolle	30 min ohne Inhibitor	2 h ohne TGFβ <sub>1</sub>
TGFβ <sub>1</sub>	30 min ohne Inhibitor	2 h mit TGFβ <sub>1</sub> : 1 µg/L
Inhibitor	30 min mit Inhibitor	2 h ohne TGFβ <sub>1</sub>
Inhibitor + TGFβ <sub>1</sub>	30 min mit Inhibitor	2 h mit TGFβ <sub>1</sub> : 1 µg/L

Tabelle 6: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibition des ALK5-Rezeptors wurde der Inhibitor SB431542 (1 µM) eingesetzt.

#### 4.3.2. Quantitative Proteinbestimmung LOWRY-Assay

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden durch einen Lowry-Assay (Noble et al., 2009) bestimmt. Eine Standard-Verdünnungsreihe bestehend aus BSA in Aqua bidest. gelöst, wurde mit den Konzentrationen 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg BSA / ml hergestellt.

Der Ansatz für die Standardreihe (siehe Tabelle 7) und der Ansatz für die Probenbestimmung (siehe Tabelle 8) wurden in Eppendorf-Gefäße pipettiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Arbeitsschritt bilden die Proteine mit den zweiwertigen Kupfer-Ionen Komplexe. Anschließend wurden in jeden

## Methoden

Ansatz 100  $\mu\text{l}$  der Lösung 5 gegeben und nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Das Kupfer wirkt in diesem Schritt als Oxidationsmittel und reduziert das gelbe Folin-Ciocalteu'sche Phenolreagenz zu Molybdänblau. Aus jedem Eppendorf-Gefäß wurden zwei Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte befüllt, um eine Doppelbestimmung durchzuführen. Zur Analyse der Protein-Konzentration wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 578 \text{ nm}$  photometrisch gemessen. Durch die bekannten Protein-Konzentrationen der Standard-Verdünnungsreihe und den ermittelten Extinktionswerten, konnte eine Standardgerade erstellt werden und mit Hilfe der Standardgerade konnte die Protein-Konzentration der Proben bestimmt werden. Die bekannte Proteinkonzentration der Proben ermöglichte es äquivalente Proteinmengen einzusetzen.

RIPA Puffer	10 $\mu\text{l}$
Standard-Verdünnungsreihe	50 $\mu\text{l}$
Lösung 4	50 $\mu\text{l}$
Reagenz A	500 $\mu\text{l}$

Tabelle 7: Ansatz der Standard-Verdünnungsreihe

Probe	10 $\mu\text{l}$
Aqua bidest.	50 $\mu\text{l}$
Lösung 4	50 $\mu\text{l}$
Reagenz A	500 $\mu\text{l}$

Tabelle 8: Ansatz der Probe

### 4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ermöglicht mittels eines elektrischen Feldes die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Der Probenansatz wurde für zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Das im Probenansatz enthaltene DTT ist ein Reduktionsmittel, das Cysteinreste vor unerwünschter Oxidation schützt und somit der Proteininstabilität dient. Das im Gel enthaltene SDS bindet an die Proteine, hebt die Tertiärstruktur auf und bildet mit den denaturierten Proteinen einen stark negativen Komplex. Im elektrischen Feld bewegt sich der negative Komplex zur Anode und die negative Ladung korreliert proportional zur Masse des Proteins (Westermeier, 2011).

Die Gelelektrophorese wurde nach Lämmli durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, bei der das verwendete Polyacrylamid-Gel aus zwei unterschiedlichen Gelen besteht. Das Sammelgel hat große Poren und dient dem Bündeln der Proteine. Es führt zu schärfer abgegrenzten Banden. Das Trenngel hat feinere Poren und trennt die Proteine entsprechend dem Molekulargewicht auf.

Die Gelkammer wurde aus zwei Glasplatten, zwei Spacern, einem Silikonschlauch und Klammern nach sorgfältiger Reinigung zusammengesetzt. Die Kammer wurde zunächst mit Trenngel befüllt und um Luftblasen zu vermeiden, mit 0,1% SDS überschichtet. Nach einer Stunde war das Trenngel auspolymerisiert und das 0,1% SDS aus der

## Methoden

Kammer gekippt. Die Kammer wurde mit Sammelgel aufgefüllt und der Gelkamm unter Vermeidung von Luftblasen eingeführt. Nach einer halben Stunde war auch das Sammelgel auspolymerisiert und das Gel konnte in die Kammer gesetzt werden. Zuvor wurden der Kamm und der Silikonschlauch entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x Lauffuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit einer Hamilton-Spritze sorgfältig gespült. Die erste Tasche wurde mit 15 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Rainbow-Marker) gefüllt. Die weiteren Taschen wurden mit den Probenansätzen (siehe Tabelle 9) befüllt. Bei 200 Volt Spannung wurden die Proteine im elektrischen Feld nach Molekulargröße aufgetrennt, bis nach ca. drei Stunden die Lauffront durchgelaufen war. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Proben	45 µl
4 x Lämmli-Puffer	15 µl
DTT, 0,5 M	1,5 µl

Tabelle 9: Probenansätze für die SPS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

### 4.3.4. Immunoblot-Verfahren

Mit dem Semi-Dry-Blot-Verfahren wurden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es werden jeweils 3 Filterpapiere mit einer deckungsgleichen Größe wie die Membran und das Gel in den Kathodenpuffer A und die Anoden-Puffer B und C eingelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde in Anodenpuffer B eingelegt. Das Gel wurde aus den Glasplatten entnommen und das Sammelgel abgetrennt. Nun wurden die Filterpapiere, die Membran und das Gel deckungsgleich in einer Blotkammer aufeinander geschichtet und darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen, denn diese behindern den Transfer der Proteine. Der Blotkammerdeckel wurde aufgesetzt und der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei einer Stromstärke von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran entnommen und die kDa-Größen der bekannten Molekulgrößenmarker und die Taschen mit den jeweiligen Bedingungen mit einem Kugelschreiber beschriftet. Anschließend wurde die Membran für eine Minute in Ponceau-S-Lösung geschwenkt und der überflüssige Farbstoff mit Wasser entfernt. Der Farbstoff bindet reversibel unspezifisch Proteine. Die transferierten Proteine können so dargestellt werden und dienen als Erfolgskontrolle. Um den Farbstoff zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1 x TBS gewaschen. Die Membran wurde mit einer Blocklösung (5 % Magermilchpulver in 1 x TBS / TWEEN 20) für eine Stunde abgesättigt, mit dem Zweck der Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Nach der Absättigung wurde die Membran dreimal mit Waschlösung gewaschen und die Erstantikörper-Lösung (Tabelle 10) mit Antikörpern auf die Membran gegeben. Die Membran wurde über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen und mit der Zweitantikörper-Lösung (Tabelle 11) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen. Die Membran konnte jetzt mit dem ChemiSmart-System im nächsten Schritt analysiert werden.

## Methoden

1. Antikörper	Verdünnung	gelöst in
pSMAD2	1:1000	Antikörper-Lösung (BSA)
SMAD2	1:1000	Antikörper-Lösung (MMP)
Vinculin	1:1000	Antikörper-Lösung (MMP)

Tabelle 10: Herstellung der Erstantikörper-Lösung

2. Antikörper	Verdünnung	gelöst in
anti rabbit IgG	1:5000	Antikörper-Lösung (MMP)
anti mouse IgG	1:2000	Antikörper-Lösung (MMP)

Tabelle 11: Herstellung Zweitantikörper-Lösung

### 4.3.5. ChemiSmart-System

Mit dem ChemiSmart-System kann die Intensität eines chemilumineszenten Signals detektiert werden. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen (Protein) und stellt selbst wiederum mit seinem Fc-Fragment ein Antigen für den Zweitantikörper dar. Der Zweitantikörper ist an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Der Erstantikörper bzw. das gesuchte Antigen (Protein) können somit indirekt detektiert werden. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, welches Licht emittiert. Diese Chemilumineszenz kann mit einer CCD-Kamera und dem ChemiSmart-System gemessen und analysiert werden. Die Membran wurde für eine Minute mit zwei ml ECL-Lösung inkubiert. Dieser Arbeitsschritt erfolgte im abgedunkelten Raum. Anschließend wurde die Membran auf eine Glasplatte überführt und die Chemilumineszenz mit dem ChemiSmart-System detektiert und die Daten mit dem Programm QuantityOne analysiert. Die Proteinexpression von pSMAD 2 wurde mit der Proteinexpression der unphosphorylierten Form SMAD 2 durch Quotientenbildung analysiert. SMAD 2 wurde auch durch Quotientenbildung auf Vinculin bezogen.



## 4.4. Retardation Assay

### 4.4.1. Kernextraktion

Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 4.1. präpariert und in Kulturschalen kultiviert. Die Kardiomyozyten wurden nach erfolgter Stimulation für sechs Stunden inkubiert und im Anschluss geerntet (siehe Tabelle 12). Dafür wurden die Kardiomyozyten mit einem sterilen Schaber von der Zellkulturschale abgeschabt und mit dem Medium in ein Falcon transferiert. Es folgte ein Zentrifugationssschritt von drei Minuten bei 3000 UpM. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem ml 1 x PBS resuspendiert. Die Resuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert und erneut für drei Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes, konnte das Zellpellet sofort der Kernextraktion unterzogen werden, oder im Eisschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Das Zellpellet wurde in 400  $\mu\text{l}$  Schwellungspuffer gelöst und sorgfältig in Suspension gebracht. Die Eppendorf-Gefäße wurden im Anschluss 40 Minuten auf Eis gelagert und nach Ablauf der Zeit zehn Minuten bei 900 UpM in einer  $4^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer überführt und unter Anwendung eines Potters die Zellen lysiert. Nach vollständiger Lyse der Proben, wurden diese für zehn Minuten bei 900 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde in 40  $\mu\text{l}$  Storagepuffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt und gelegentlich mit dem Vortexer durchmischt. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut der Vortexer benutzt und für fünf Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Kernextrakten wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Um den Proteingehalt der Proben zu ermitteln, wurde der Bradford-Test durchgeführt. Die Proben wurden im Eisschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Im Folgenden sind in Tabelle 12 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet:

	Vorinkubation	Inkubation
Kontrolle	30 min ohne Inhibitor	2 h ohne TGF $\beta_1$
TGF $\beta_1$	30 min ohne Inhibitor	2 h mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$
Inhibitor	30 min mit inhibitor	2 h ohne TGF $\beta_1$
Inhibitor + TGF $\beta_1$	30 min mit Inhibitor	2 h mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$

Tabelle12: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibitor der PI3-Kinase wurde der Inhibitor Ly294002 (10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

#### 4.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Protein-Gesamtmenge wurde mittels des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bradford (Noble et al., 2009) bestimmt. Die Farbintensität korreliert mit der Protein-Konzentration, da der Farbstoff mit den Proteinen einen Komplex bildet. Für die Protein-Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl der Kernextraktions-Proben im Doppelansatz in eine 96 – Well Mikrotiterplatte gegeben. Eine Standard-Verdünnungsreihe von BSA in 0,01 % SDS gelöst, wurde mit den folgenden Konzentrationen 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg BSA / ml hergestellt. Von der Verdünnungsreihe wurde ebenfalls eine Doppelbestimmung in die 96– Well Mikrotiterplatte pipettiert. Jedes Well wurde anschließend mit 200 µl Bradford-Reagenz befüllt. Zur Analyse wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$  photometrisch gemessen. Durch die bekannten Protein-Konzentrationen der Standard-Verdünnungsreihe und den ermittelten Extinktionswerten, konnte eine Standardgerade erstellt werden. Mit Hilfe der Standardgerade konnte die Protein-Konzentration der Kernextraktionsproben bestimmt werden. Die bekannte Proteinkonzentration der Proben ermöglichte es äquivalente Proteinmengen einzusetzen.

#### 4.4.2. Markierung der Oligonukleotide

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in Aqua bidest. gelöst, in äquimolaren Mengen vermischt und im Thermo Cycler auf 98 °C erhitzt. Ein langsames Abkühlen ermöglicht das Durchlaufen der Schmelz- und Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide und durch komplementäre Sequenzen konnte sich ein Doppelstrang im Sinne einer Hybridisierung bilden. Es wurden die Oligonukleotide AP1-1, AP1-2 und SBE-1, SBE-2 verwendet. Der Fluoreszenzmarkierungsansatz (Tabelle 13) wurde in ein braunes Eppendorf-Gefäß pipettiert und für fünfzehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 M EDTA (pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt. Die erzeugten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide standen nun der Gelelektrophorese zur Detektion der spezifisch bindenden Proteine zur Verfügung.

10 X NEB-Puffer	5 µl
CoCl <sub>2</sub> (2,5mM)	5 µl
hybridisierte Oligonukleotide (10µM)	20 ng
Cy3-dCTP (10mM)	2,5 µl
Terminale Transferase (20U/µl)	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Tabelle 13: Fluoreszenzmarkierungsansatz

### 4.4.3. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde das Kammersystem zusammengebaut und die Glasplatten mit Ethanol (90%) gereinigt. Die Gelkammer wurde am Boden durch Parafilm abgedichtet und an einer Plattenhalterung eingespannt. Das Gel wurde luftblasenfrei eingefüllt. In das noch flüssige nicht polymerisierte Gel wurde ein Kamm ebenfalls luftblasenfrei eingeführt. Das Gel wurde zum Kühlen für eine Stunde in einen Kühlschrank bei 4 ° C gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel in die bereits mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebaut und der Kamm wurde vorsichtig entfernt. Die entstandenen Taschen wurden, nachdem auch der obere Teil der Kammer mit 0,5 x TBE-Puffer befüllt war, mit einer Hamilton-Pipette durchgespült. Mit einem Edding-Marker wurden die Taschen auf der Glasplatte markiert. Sorgfältig wurden alle Luftblasen entfernt und für eine halbe Stunde ein Vorlauf des Gels bei 60 mA im Kühlschrank gestartet. Tabelle 14 zeigt die Zusammensetzung der Probenansätze. Für diese ist der in Tabelle 15 gezeigte MIX 1 erforderlich.

#### Probenansatz

Probe	x µl
TXN	10 – x µl
Mix 1	7,5 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Probenansatzes

#### Mix 1

dIdC	0,5 µl
TXN	7 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung Mix 1

Der Probenansatz wurde in braune Eppendorfgefäße pipetiert und für 15 Minuten bei 30°C auf einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden zu jedem Probenansatz 2,5 µl Mix 2 (siehe Tabelle 16) gegeben und für 30 Minuten erneut bei 30 °C inkubiert.

#### Mix 2

Fluoreszenzmarkierungs-Ansatz	1,5 µl
TXN	1 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung Mix 2

Die Reaktionsansätze wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Die Kammer wurde für zwei Stunden bei 150 mA in den dunklen Kühlschrank gestellt. Im abgedunkelten Raum wurde das Gel aus der Kammer ausgebaut und die Glasplatten mit

Ethanol (90%) gereinigt. Analysiert wurden die Gele mit dem Fluoreszenz-Imager. Die Ergebnisse wurden mit der Software Quantity One densitometrisch ausgewertet.

### **4.5. RT-PCR**

#### **4.5.1. Zellernte von Kardiomyozyten und Isolierung von Gesamt-RNA**

Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 4.1. beschrieben präpariert und in Kulturschalen kultiviert. Die Kardiomyozyten wurden nach erfolgter Stimulation (siehe Tabelle 17) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss für die Zellernte mit einem sterilen Schaber von der Zellkulturschale abgeschabt und mit dem Medium in ein Falcon transferiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von drei Minuten bei 3000 UpM. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 x PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von drei Minuten und 3000 UpM, gefolgt vom Absaugen des Überstandes. Im nächsten Schritt wurde das Pellet mit Trizol bearbeitet. Das im Trizol beinhaltete Guanidinisothiocyanat ist ein chaotropes Salz, das Proteine und auch RNAsen denaturiert und inaktiviert. Das enthaltene Phenol senkt den pH-Wert und entfernt Proteine. Im saueren Phenol werden kleine DNA-Fragmente gelöst. Die größeren DNA-Fragmente sammeln sich in der Interphase. Die RNA befindet sich im wässrigen Überstand. Auf das Zellpellet werden 500 µl Trizol gegeben und mit dem Homogenisator bearbeitet und für drei Minuten gevortext. Nun werden 100 µl Chloroform in das Eppendorf-Gefäß gegeben. Das Chloroform ist ein organisches Lösungsmittel und dient ebenfalls der Denaturierung von Proteinen. Diese sammeln sich in der organischen Phase und Interphase. Nach Zugabe des Chloroforms folgte ein Zentrifugationsschritt von fünfzehn Minuten bei 4 °C und 12000 UpM. Die RNA befindet sich jetzt größtenteils in der oberen Phase und wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses Eppendorf-Gefäß wurde zuvor mit UV-Licht bestrahlt, um eine Kontamination mit unerwünschten Nukleinsäuren zu vermeiden. Eine dem jeweiligen abpipetierten Überstand äquivalente Menge Isopropanol wurde in das Eppendorf-Gefäß gegeben, um eine Präzipitation der RNA zu erreichen. Die Proben wurden über Nacht bei -20 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C für fünfzehn Minuten bei 12000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und 500 µl 70 % Ethanol in das Eppendorf-Gefäß gefüllt. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 4 °C für fünfzehn Minuten bei 12000 UpM. Der Überstand wurde entsorgt und die Eppendorf-Gefäße sorgfältig getrocknet. Das entstandene Pellet wurde in DEPC-Wasser, das RNase frei ist gelöst und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die isolierte RNA konnte jetzt bei -80 °C gelagert werden.

Im Folgenden sind in Tabelle 17 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet:

## Methoden

	Vorinkubation	Inkubation
Kontrolle	30 min ohne Inhibitor	24 h ohne TGF $\beta$ <sub>1</sub>
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	30 min ohne Inhibitor	24 h mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> : 1 $\mu$ g/L
Inhibitor	30 min mit Inhibitor	24 h ohne TGF $\beta$ <sub>1</sub>
Inhibitor + TGF $\beta$ <sub>1</sub>	30 min mit Inhibitor	24 h mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> : 1 $\mu$ g/L

Tabelle 17: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibition der PI3-Kinase wurde der Inhibitor Ly294002 (10  $\mu$ M) eingesetzt

### 4.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mittels UV-Spektrophotometrie mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 ermittelt. Das UV-Spektralphotometer wurde vor der Probenmessung mit Aqua bidest. kalibriert. Die Messung erfolgte in einem Wellenlängenspektrum von  $\lambda = 260$  nm bis  $\lambda = 280$  nm. Für eine RNA-Konzentrationsmessung war ein Probenvolumen von 1,5  $\mu$ l erforderlich.

### 4.5.3. Gel-Elektrophorese der RNA-Proben

Die Gelelektrophorese der isolierten RNA diente zur Qualitätskontrolle des Isolationsprozesses. RNA kann mittels der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt werden. Ein Qualitätsmerkmal der Isolation ist das Erscheinen von 2 Banden ribosomaler RNA, der 18S- und 28S-rRNA. Es wurden jeweils fünf  $\mu$ l der Isolate in einem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Agarosegel durch Aufkochen gelöst und im Anschluss das SYBRsafe dazupipettiert, in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm eingeführt. Nachdem das Gel erhärtet war, wurde der Kamm gezogen und die Kammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt. Die RNA-Proben mit bekannter Konzentration wurden mit 1,5  $\mu$ l Auftragspuffer gemischt und die Taschen wurden befüllt. Eine Tasche wurde mit 100 bp Marker befüllt. Die Auftrennung nach Größe erfolgte bei einer Spannung von 90 mA für eine halbe Stunde. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBRsafe® angefärbten Nukleinsäuren konnten fotografiert und nach Größenaufteilung und Fluoreszenzintensität analysiert werden.

### 4.5.4. DNase-Behandlung und Erstellen von cDNA

Mit Hilfe des Quanti Tect Reverse-Transkription-Kit® konnten die Arbeitsschritte des DNase-Verdau und der reversen Transkription in einem Arbeitsschritt durchgeführt werden. Die hierfür eingesetzten Eppendorf-Gefäße wurden mir dem UV-Stratalinker einer UV-Behandlung unterzogen, um eine Kontamination zu verhindern. Der cDNA-Ansatz (siehe Tabelle 18) wurde in UV-behandelte Eppendorf-Gefäße pipettiert und für fünf Minuten bei 42 °C im Thermo-Cycler inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe der Reaktionsmix (siehe Tabelle 19) gegeben und die Proben wurden zur cDNA-

## Methoden

Synthese bei 42 °C für fünfzehn Minuten, gefolgt von einem Denaturierungsschritt von drei Minuten, bei 95 °C inkubiert.

Die Proben wurden bei – 80 °C gelagert. Die cDNA wurde vor den PCR-Experimenten 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

### cDNA - Ansatz

Probe 1 µg	x µl
gDNA –Wipeout-Buffer	2 µl
Aqua bidest.	12-x µl

Tabelle 18: Zusammensetzung des cDNA Ansatzes

### Reaktionsmix

Reverse Transkriptase	1 µl
RT-Puffer 5x	4 µl
RT-Primer-Mix (300mM)	1 µl

Tabelle 19: Zusammensetzung Reaktionsmix

### 4.5.5. Aktin-PCR und Gel-Elektrophorese

Als Erfolgskontrolle der RNA–Isolation und der cDNA–Synthese wurde eine Aktin–PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese durchgeführt, um nachzuweisen, dass die Proben keine genomische DNA enthalten. Hierfür wurde das Housekeeping–Gen Aktin ausgewählt. Die verwendeten Primer, die zu zwei durch ein Intron getrennte Exons komplementär sind, ermöglichen eine Unterscheidung zwischen cDNA und genomischer DNA. Der cDNA fehlt im Gegensatz zur genomischen DNA das Intron. Enthält die Probe auch genomische DNA, so entsteht in der PCR ein zweites größeres Fragment.

Von jeder Probe wurde der folgende Ansatz (Tabelle 20) hergestellt

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

Tabelle 20: Zusammensetzung Probenansatz

## Methoden

Es wurde das folgende Programm im Thermocycler durchgeführt:

Zyklus 1	1x
	93 °C für 5 Minuten
Zyklus 2	25x
	93 °C für 1 Minute
	60 °C für 1 Minute
	72 °C für 1 Minute
Zyklus 3	1x
	72 °C für 15 Minuten

Tabelle 21: Darstellung des verwendeten Programms

Die Gelelektrophorese der Proben wurde wie bereits unter 4.5.3. beschrieben durchgeführt und das Agarosegel unter UV-Licht mit einer Kamera fotografiert und mit dem Programm Quantity-One analysiert.

### 4.5.6. real-time RT-PCR

Die real-time RT-PCR ist eine quantitative Echtzeit-PCR und kann mit Hilfe einer DNA-Polymerase einen gewünschten DNA-Abschnitt der bereits synthetisierten cDNA exponentiell amplifizieren. Im Gegensatz zur konventionellen PCR (Mullis et al., 1986) ermöglicht sie eine Quantifizierung. Das Prinzip der real-time RT-PCR (Tabelle 22) beruht auf repetitiven Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C, Annealing temperaturabhängig von der Primersequenz und Elongation bei 72 °C. Während der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA gespalten und es liegt einzelsträngige DNA vor. Im Anschluss folgt das Annealing. Hier binden die spezifischen Primer an ihre komplementäre DNA-Sequenz. Die Elongation führt zu einer semikonservativen Doppelstrangbildung durch die DNA-Taq-Polymerase. In der Regel besteht eine PCR aus 15 – 45 Zyklen.

Auflistung der spezifischen Annealing-Temperaturen der eingesetzten Primer.

Primer	Annealing-Temperatur
18s rRNA	59,8 °C
SMAD 7	60,8 °C
DAPK1	63 °C
Tieg 1	63 °C
SHIP	61,5 °C
Aktin	62C

Tabelle 22: Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer

Während der PCR kommt es zu einem exponentiellen Wachstum, da sich in jedem Zyklus das eingesetzte Material durch die DNA-Polymerase, die Primer und die Nukleotide verdoppelt. Das Wachstum erreicht jedoch ab einer gewissen Zyklenzahl

## Methoden

einen Plateau-Effekt und verlangsamt sich, da die Primer verbraucht werden. Die PCR ermöglicht somit eine exponentielle Amplifikation von DNA. Durch den Einsatz des Cyanin-Farbstoffes SYBR FAST konnte eine Quantifizierung der synthetisierten DNA durchgeführt werden, da sich der Farbstoff an doppelsträngige DNA anlagert und sich somit die Fluoreszenz proportional zur Menge der synthetisierten DNA-Menge verhält. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen.

Da der Farbstoff auch unspezifische Amplifikate anfärbt, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um spezifische DNA von unspezifischer zu unterscheiden. Am Ende der real-time RT-PCR werden die Amplifikate von 50 °C schrittweise um 1 °C auf 98 °C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Sobald die für die spezifische Sequenz benötigte Schmelztemperatur erreicht ist, kommt es zu einer Denaturierung des Doppelstranges und der gesamte Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Es kommt zu einer starken Fluoreszenzabnahme. Grundsätzlich ist die Schmelztemperatur der DNA von der Basenzusammensetzung und der Länge abhängig. Die Schmelzpunkte von spezifischen und unspezifischen Amplifikaten unterscheiden sich und können somit voneinander unterschieden werden. Abbildung 9 zeigt exemplarisch den Verlauf einer Schmelzkurve.

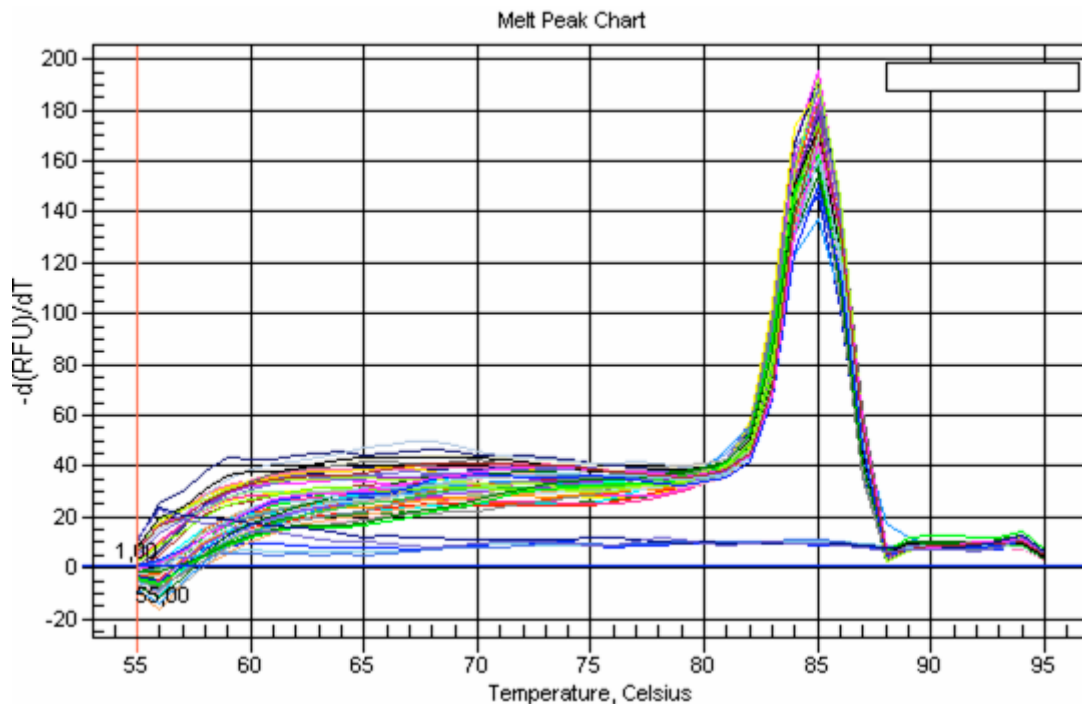


Abbildung 9: Darstellung von Schmelzkurven unterschiedlicher Proben bei Amplifikation mit gleichen Primern. Der Fluoreszenzabfall mit Peak liegt bei 85 °C.

Die PCR-Stripes wurden mit den PCR-Ansätzen befüllt, wobei von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Der SYBR Fast qPCR Master-Mix® beinhaltet Reaktionspuffer, Nukleotide, DNA-Polymerase,  $MgCl_2$ , Stabilisatoren und den fluoreszierenden Farbstoff (Tabelle 23). Die real-time RT-PCR erfolgte im Thermocycler (Tabelle 23).



## Methoden

### Proben-Ansatz

Probe	2 µl
Primer reverse (300 mM)	0,6 µl
Primer forward (300mM)	0,6 µl
Aqua bidest.	6,8 µl
SYBR Green SuperMix®	10 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung Probenansatz

### Aufführung des real-time RT-PCR Laufprogrammes:

Zyklus 1	1x
	95 °C für 15 Minuten
Zyklus 2	45x
Denaturierung	95 ° für 30 Sekunden
Annealing	x °C für 30 Sekunden
Amplifikation	72 °C für 30 Sekunden
Zyklus 3	100x
Schmelzkurve	50°C – 100 °C je 10 Sekunden

Tabelle 24: Darstellung des verwendeten Programms

Die Ergebnisse wurden nach der Methode von Pfaffl et al., (2010) ausgewertet. Die relative Expression des Zielgens wurde ins Verhältnis zur relativen Expression eines Referenzgens gesetzt. Das Referenzgen wird auch als Housekeeping-Gen bezeichnet und stellt ein Gen dar, das in den Kardiomyozyten exprimiert wird, jedoch nicht durch die Versuchsbedingungen reguliert wird. Bei den durchgeführten Versuchen wurde 18s rRNA als Housekeeping-Gen verwendet.

Das detektierte Fluoreszenz-Signal muss einen Schwellenwert (Threshold) überschreiten, um sicher vom Hintergrund unterschieden werden zu können. Die DNA-Konzentration steigt mit den Zyklen exponentiell an und der Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem die Kurve den Threshold schneidet. In Abbildung 10 ist der Verlauf der Exponentialkurven dargestellt. Der Ct-Wert verhält sich zur DNA-Konzentration zu Beginn der RT-PCR umgekehrt proportional. Je kleiner der Ct-Wert desto höher war die DNA-Konzentration zu Beginn der real-time RT-PCR. Durch die Doppelbestimmung konnten die Mittelwerte gebildet werden. Aus dem Zielgen und dem Housekeeping-Gen wurde die Differenz gebildet und der  $\Delta Ct$ -Wert ermittelt.

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

Die relative Expression wurde nach folgender Formel berechnet:

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

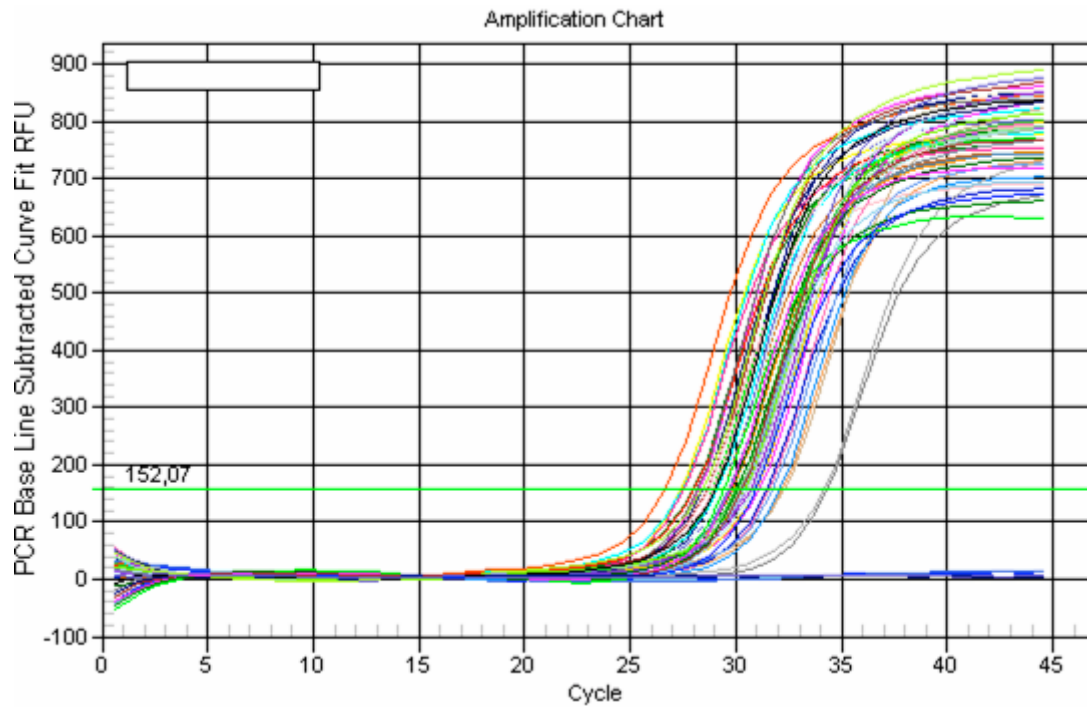


Abbildung 10: Darstellung des Fluoreszenz-Verlaufs verschiedener Proben unter Einsatz eines gleichen Primers (Aktin). Die Exponentialkurven der Proben schneiden den Threshold (hellgrüne horizontale Linie) am entsprechenden Ct-Wert.

### **4.6. NO-Messung mittels DAF-FM Assay**

#### **4.6.1. Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen**

Die Messung der kardiomyozytären intrazellulären NO-Freisetzung erfolgte mit einem Video-Imaging-System auf Basis der Fluoreszenzmikroskopie. Die passende Wellenlänge der fluoreszierenden Substanz wurde mit Hilfe einer Xenonlampe und dem passenden Monochromator erzeugt. Ein dichroider Spiegel lenkt das monochromatische Licht auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen. Durch denselben Spiegel gelangt auch das von den Kardiomyozyten emittierte Fluoreszenzlicht und wurde über einen Emissionsfilter von einer Kamera detektiert. Das System verfügt auch über eine Heizplatte, um den lebenden Kardiomyozyten für die Messung eine Temperatur von 37 °C zu garantieren. Für die NO-Messungen erzeugte die Kamera zehn Bilder in einer Minute. Die über die Kamera aufgenommenen Bilder konnten durch die Vernetzung mit einem Computersystem und der TillVision Software aufgezeichnet und ausgewertet werden.

#### **4.6.2. DAF-FM**

Die Messung der NO-Freisetzung beruht auf der Bildung eines fluoreszierenden Moleküls. Die Messung der intrazellulären NO-Konzentration wurde mittels des NO-spezifischen DAF-FM-Diacetat Farbstoffes bestimmt. DAF-FM-Diacetat ist

## Methoden

zellpermeabel und wird intrazellulär im Cytoplasma von Esterasen hydrolysiert. Das entstandene DAF-FM ist ein ionisiertes leicht fluoreszierendes Molekül, das nicht mehr zellpermeabel ist. DAF-FM reagiert mit NO, wodurch das stark fluoreszierende Benzotriazol-Derivat DAF-FM-Triazol und das Oxidationsprodukt  $N_2O_3$  entsteht (Abbildung 11). Die Anregung von DAF erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 498$  nm und das Emissionsmaximum lag bei  $\lambda_{\text{em}} = 515$  nm.

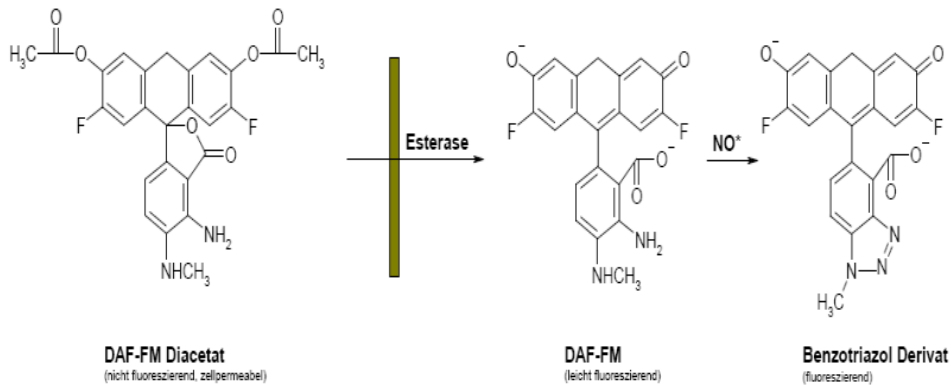


Abbildung 11: Reaktionsschema zum Nachweis von Stickstoffmonoxid (Quelle [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

### 4.6.3. NO-Messungen

Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 4.1. präpariert und auf Coverslips kultiviert. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen, wurde auf einem abgeflamten Coverslip, der sich in einer Kulturschale befand, ein deckungsgleicher Delrin-Ring gesetzt und im Anschluss die auszuplattierende Zellsuspension in den Ring überführt. Für eine bessere Haftung der Kardiomyozyten auf der amorphen Oberfläche wurde statt FCS Laminin verwendet. Es wurde anstelle des Vorplattiermediums Waschmedium mit Laminin im Verhältnis 1:1000 verwendet. Für die Messung wurden die Kardiomyozyten mit  $5 \mu\text{g/ml}$  DAF-FM in Waschmedium beladen und 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Kardiomyozyten zweimal für jeweils 20 Minuten mit CCT-Medium gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Coverslips in eine Perfusionskammer eingebaut. Bei diesem Versuch handelt es sich um ein geschlossenes System. Es wurde nicht perfundiert. Eine eingebaute Heizplatte garantierte eine optimale Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten der Messungen wurden mit dem Kamera-System aufgezeichnet. Die erste viertel Stunde jeder Messung erfolgte zur Detektion der durchschnittlichen physiologischen basalen NO-Freisetzung der jeweiligen gemessenen Zellen. Die ermittelte unstimulierte basale NO-Freisetzungsrates diente als Kontrolle, um sie mit darauf folgenden stimulierten NO-Freisetzungsrates derselben Zellen durch Quotientenbildung zu vergleichen. Anschließend wurde über 60 Minuten gemessen.

In Tabelle 25 sind die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet. Abbildung 12 zeigt beladenen Kardiomyozyten im Rahmen einer Messung.

## Methoden

	Vorinkubation	Inkubation
Inhibitor	15 min mit Inhibitor	45 min ohne TGF $\beta_1$
TGF $\beta_1$	15 min ohne Inhibitor	45 min mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$
Inhibitor + TGF $\beta_1$	15 min mit Inhibitor	45 min mit TGF $\beta_1$ : 1 $\mu\text{g/L}$

Tabelle 25: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Zur Inhibition aller NO-Synthasen wurde der Inhibitor ETU (1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.  
Zur Inhibition der iNOS wurde der Inhibitor 1400W (100 nM) eingesetzt.  
Zur Inhibition der nNOS wurde der Inhibitor TFA (100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.  
Zur Inhibition des ALK5-Rezeptors wurde der Inhibitor SB431542 (1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.  
Zur Inhibition der PI3-Kinase wurde der Inhibitor Ly294002 (10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

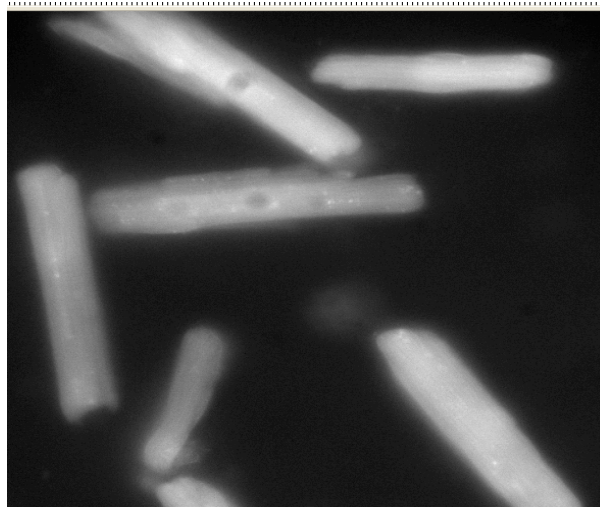


Abbildung 12: Vitale Kardiomyozyten unter dem Imaging-System im DAF-Assay

### **4.7. Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, mittels Antikörper Proteine und ihre Lage in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle zu erkennen. Bei dem hier angewandten Verfahren handelt es sich um ein indirektes Antikörpernachweisverfahren. Der Primärantikörper band spezifisch die phosphorylierte Form der eNOS, deren Phosphorylierung am Serin 1177 erfolgte. Der Sekundärantikörper war mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und bindet das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Mittels eines Fluoreszenzmikroskopes kann dies sichtbar gemacht werden.

Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 4.1. präpariert und auf Coverslips kultiviert. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen, wurde auf einen abgeflamten Coverslip, der sich in einer Kulturschale befand, ein deckungsgleicher Delrin-Ring gesetzt und im Anschluss die auszuplattierende Zellsuspension in den Ring überführt. Für eine bessere Haftung der Kardiomyozyten auf der amorphen Oberfläche wurde statt FCS Laminin verwendet. Es wurde anstelle des Vorplattiermediums Waschmedium mit Laminin im Verhältnis 1:1000 verwendet. Die Kardiomyozyten wurden den Bedingungen entsprechend stimuliert (siehe Tabelle 26) und in einer Kinetik nach fünf, zehn und

## Methoden

fünfzehn Minuten weiterbearbeitet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Kardiomyozyten mit eiskaltem Methanol fixiert und für 30 Minuten im Eisschrank bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurde das Methanol abgesaugt und die Kardiomyozyten mit einer Blocklösung (1x PBS / 3% BSA) in einer Schale für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Coverslips aus der Schale entnommen und auf mit Parafilm ausgelegten Deckel gelegt. Hierauf wurden 400 µl einer 1:50 Verdünnung des Primärantikörpers mit der Blocklösung gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Coverslips wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen und erneut auf die mit Parafilm ausgelegten Deckel gelegt. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:250 mit der Blocklösung angesetzt und hiervon jeweils 400 µl auf die Coverslips gegeben. Die Inkubation für eine Stunde erfolgte im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Erneut wurden die Coverslips dreimal mit 1 x PBS gewaschen, mit einem Fön getrocknet und mit einem Einbett-Medium auf Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden bei -20 °C aufbewahrt. Die Arbeiten erfolgten im abgedunkelten Raum. Eine quantitative Analyse des Fluoreszenzgehaltes erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop und der Software TillVision.

Im Folgenden sind in Tabelle 26 die jeweiligen Bedingungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgelistet

	Inkubation
Kontrolle	ohne TGFβ <sub>1</sub>
TGFβ <sub>1</sub>	5min mit TGFβ <sub>1</sub> : 1 µg/L, 3 µg/L, 10 µg/L 10min mit TGFβ <sub>1</sub> : 1 µg/L, 3 µg/L

Tabelle 26: Darstellung der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Um eine zeit- und konzentrationsabhängige Kinetik nachweisen zu können, wurden Inkubationszeiten von 5 und 10 Minuten gewählt und TGFβ<sub>1</sub> Konzentrationen von 1 µg/L, 3 µg/L und 10 µg/L.

Desweiteren wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Diese wurde wie die Kontrolle inkubiert, jedoch nur mit dem Zweitantikörper und nicht zuvor mit dem spezifischen Erstantikörper markiert.

### **4.8. Statistik**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts aus n verschiedenen Kardiomyozyten-Präparationen dargestellt. Die Analyse der Stichproben erfolgte durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test (SNK). Ein konventioneller t-Test wurde bei Experimenten angewendet, die lediglich aus zwei Gruppen bestanden. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. $TGF\beta_1$ induziert eine NO-Freisetzung und Apoptose

$TGF\beta_1$  und NO führen beide über eine Aktivierung von SMAD-Transkriptionsfaktoren zur Apoptose. Dies führt zur Hypothese, dass NO ein Bestandteil der  $TGF\beta_1$ -Signalkaskade sein könnte.

Um zu überprüfen, ob eine Stimulation mit  $TGF\beta_1$  in adulten Kardiomyozyten zur NO-Freisetzung führt, wurden isolierte Kardiomyozyten mit einem Farbstoff (DAF-FM) beladen, mit dem die NO-Freisetzung mittels Fluoreszenz gemessen werden konnte. Der Versuch wurde unter Kontrollbedingungen ohne  $TGF\beta_1$ -Stimulation und mit  $TGF\beta_1$ -Stimulation (1  $\mu\text{g/L}$ ) über 120 Minuten durchgeführt.

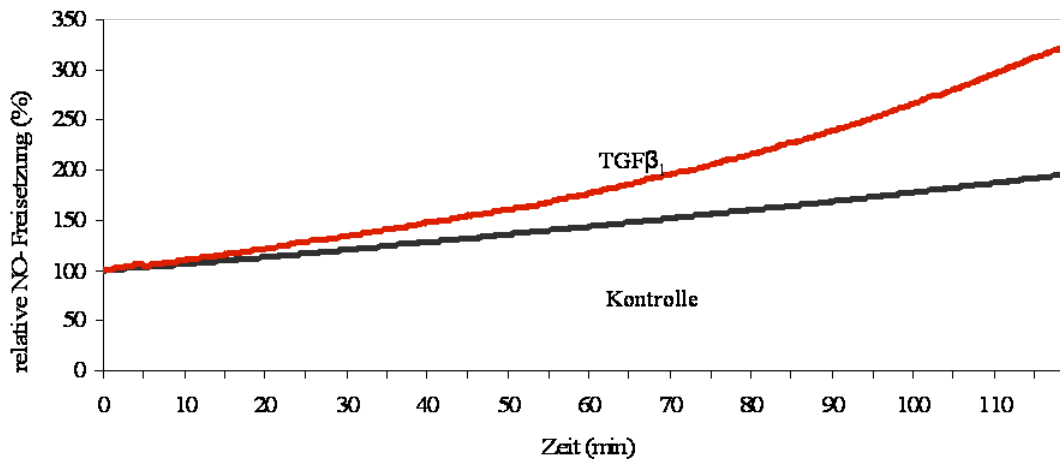


Abbildung 13: Kardiomyozyten wurden sowohl mit 1  $\mu\text{g/L}$   $TGF\beta_1$  als auch ohne  $TGF\beta_1$ -Stimulation inkubiert und die NO-Freisetzung mittels des fluoreszierenden Farbstoffs DAF-FM-Diacetat bestimmt und über 120 Minuten gemessen. Gezeigt ist die relative NO-Freisetzung zweier repräsentativer Einzelmessungen.

Abbildung 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der relativen NO-Freisetzung zweier repräsentativer Einzelmessungen unter Kontrollbedingungen ohne  $TGF\beta_1$ -Stimulation und unter  $TGF\beta_1$ -Stimulation. Die Ergebnisse der repräsentativen Einzelmessungen ergaben die ersten Hinweise auf eine erhöhte kardiomyozytäre NO-Freisetzung unter  $TGF\beta_1$ -Stimulation.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde dieser Versuch mit Kardiomyozyten unterschiedlicher Zellpräparationen wiederholt und die Ergebnisse einem t-Test unterzogen.

## Ergebnisse

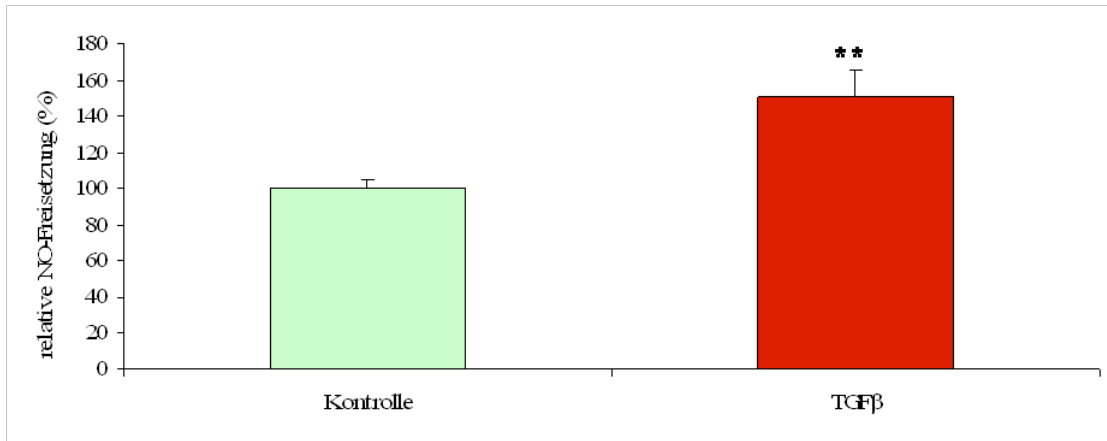


Abbildung 14: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 120 Minuten nach Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> und unter Kontrollbedingung ohne TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von n= 19-24 Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Das Signifikanzniveau beträgt nach t-Test (\*\*\*) p= 0,0038.

Abbildung 14 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der relativen NO-Freisetzung unter Kontrollbedingung mit 100 ± 5,1% und der relativen NO-Freisetzung unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation mit 150,77 ± 14,85%. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die gemessene NO-Freisetzung unter Kontrollbedingung.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine kardiomyozytäre TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation eine NO-Freisetzung induziert.

Um die Frage zu klären, ob die NO-Freisetzung unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation auf die Aktivierung von NO-Synthasen zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt der Inhibitor ETU gewählt. ETU ist zellpermeabel und inhibiert kompetitiv alle drei Isoformen der NO-Synthasen (Southan, 1995). Somit kann unter Einsatz von ETU die Frage geklärt werden, ob die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte NO-Freisetzung durch die Aktivierung von NO-Synthasen vermittelt wird. Eine Differenzierung der unterschiedlichen NO-Synthase-Isoformen ist mit ETU jedoch nicht möglich.

Es wurde erneut die NO-Freisetzung von Kardiomyozyten in Zellkultur mittels des Farbstoffs DAF-FM gemessen. Gemessen wurde über eine Stunde die NO-Freisetzung unter Einsatz von TGFβ<sub>1</sub> (1 µg/L), ETU (1µM) und der Kombination mit einer Vorinkubation von ETU für 15 Minuten und anschließender TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation.

## Ergebnisse

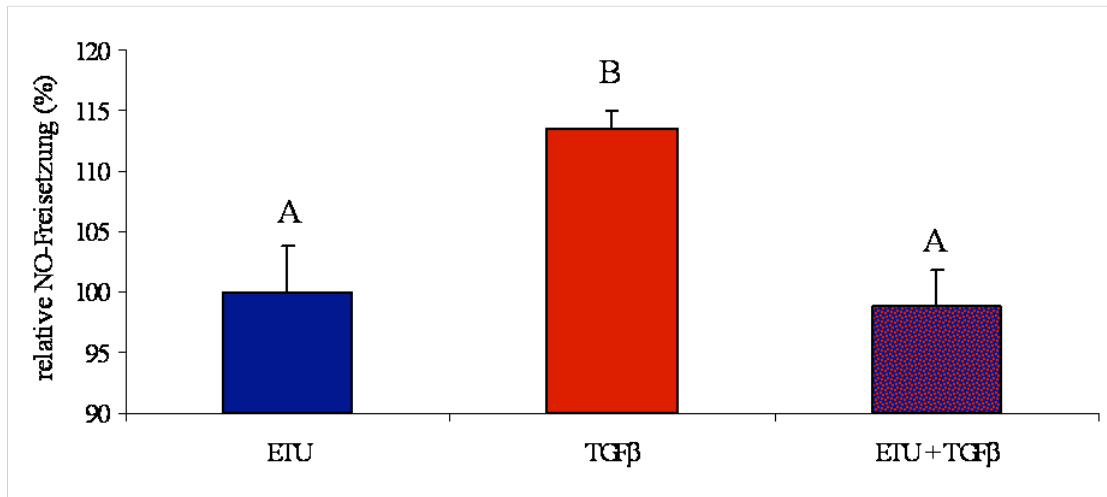


Abbildung 15: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 60 Minuten nach Stimulation mit  $TGF\beta_1$  und je nach Bedingung mit viertelstündiger Vorinkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor ETU ( $1\mu M$ ). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil des NO-Synthase-Inhibitors ETU. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von  $n= 9-13$  Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p<0,05$ ).

Abbildung 15 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der NO-Freisetzung unter  $TGF\beta_1$ -Stimulation mit  $113,48 \pm 1,45\%$  und der NO-Freisetzung unter dem NO-Synthase-Inhibitor ETU mit  $100 \pm 3,77\%$  und der Kombination aus ETU und  $TGF\beta_1$  mit  $98,77 \pm 3,14\%$ . Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die gemessene NO-Freisetzung unter ETU-Gabe.  $TGF\beta_1$  induziert eine NO-Freisetzung, die mit dem NO-Synthase-Inhibitor ETU hemmbar ist. Welche NO-Synthase für die NO-Freisetzung nach  $TGF\beta_1$ -Stimulation verantwortlich ist, lässt sich jedoch nicht sagen, da alle 3 NO-Synthase-Isoformen mit ETU supprimierbar sind.

### **5.2. $TGF\beta_1$ induziert Apoptose über NO-Freisetzung**

Im nächsten Schritt gilt es zu klären, ob die  $TGF\beta_1$ -induzierte und NO-Synthase vermittelte NO-Freisetzung zu Apoptose führt. Dass  $TGF\beta_1$  zur Apoptose führt, konnten bereits einige Veröffentlichungen belegen (Schneiders, 2005; Heger, 2009). Ebenfalls bekannt ist die apoptotische Wirkung von NO bei Kardiomyozyten (Taimor, 2000; Taimor, 2001; Schneiders, 2005; Heger, 2011). Im Folgenden wird als Nachweis der frühen Apoptose die Caspase 3/7-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Um zu prüfen, ob die NO-Synthase-vermittelte NO-Freisetzung nach  $TGF\beta_1$ -Stimulation zu Apoptose führt, werden im folgenden Versuch erneut die NO-Synthasen mit dem Inhibitor ETU blockiert.



## Ergebnisse

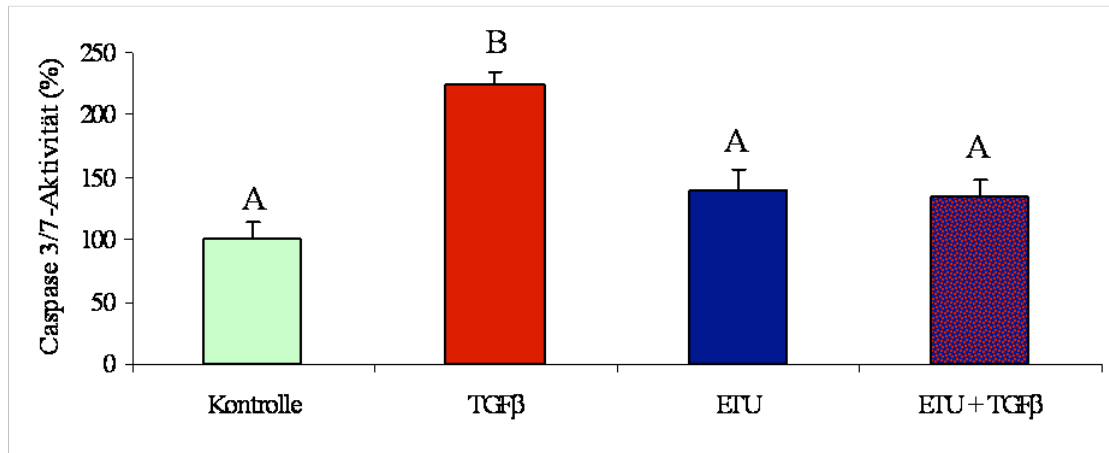


Abbildung 16: Darstellung der Caspase 3/7-Aktivität nach sechsständiger Stimulation mit  $TGF\beta_1$  ( $1\mu g/L$ ) und je Bedingung 15 Minuten Vorinkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor ETU ( $1\mu M$ ) in Kardiomyozyten. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Lumineszenz wurde mittels Photometer (Microplate reader Tecan infinite 200) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 16 ist die Caspase 3/7-Aktivität der unterschiedlichen Bedingungen nach 6-stündiger  $TGF\beta_1$ -Inkubation dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Caspase 3/7-Aktivität unter Stimulation mit  $TGF\beta_1$  mit  $225,33 \pm 10,16\%$  und der Kontrolle mit  $100 \pm 14,41\%$ , der Inhibition mit ETU mit  $139,08 \pm 17,80\%$  und der Kombination aus ETU und  $TGF\beta_1$  mit  $135,14 \pm 12,94\%$ . Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Caspase 3/7-Aktivität der Kontrolle. Somit kann bestätigt werden, dass  $TGF\beta_1$  ein Apoptose-Induktor von Kardiomyozyten ist. Desweiteren zeigt sich eine Hemmung der  $TGF\beta_1$ -induzierten Apoptose mittels des unspezifischen NO-Synthase Inhibitors ETU. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass NO in dem  $TGF\beta_1$ -induzierten Signalweg, der zur Apoptose führt, involviert ist.

Als nächsten Schritt gilt es die verantwortliche Isoform der NO-Synthasen zu identifizieren, zu charakterisieren und mögliche Aktivierungsformen nachzuweisen.

### 5.3. Charakterisierung der NO-Synthase

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass NO in der  $TGF\beta_1$ -induzierten Apoptose eine Rolle spielt und die NO-Freisetzung mittels NO-Synthasen vermittelt wird, gilt es nun die verantwortliche Isoform zu identifizieren. Um zu überprüfen, ob die iNOS für die NO-Freisetzung verantwortlich ist, wird der iNOS-spezifische Inhibitor 1400W eingesetzt. Die NO-Freisetzung wird erneut mittels des DAF-FM-Assays gemessen. Die Versuchsdurchführung und die Bedingungen sind identisch zu den bereits beschriebenen NO-Messungen mit ETU als Inhibitor.

## Ergebnisse

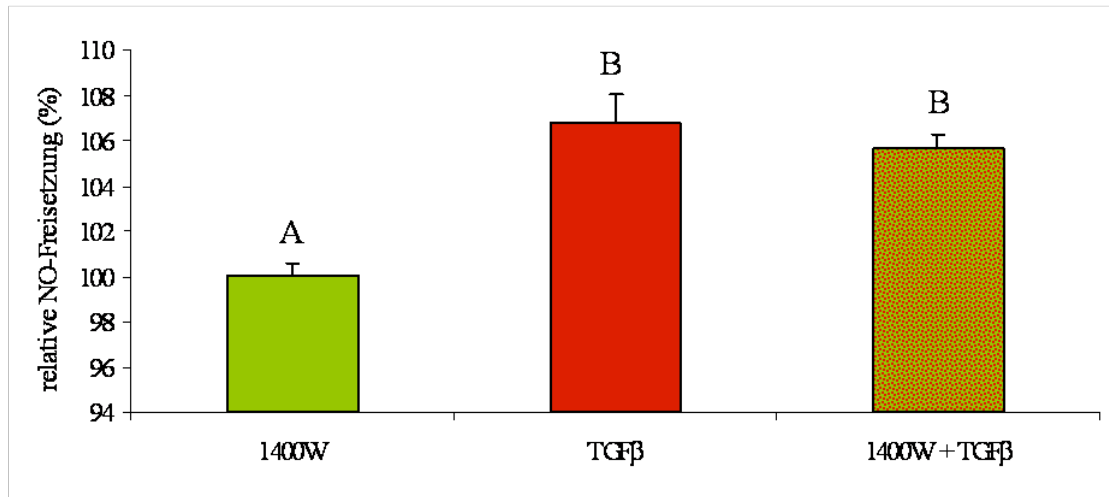


Abbildung 17: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 60 Minuten nach Stimulation mit  $\text{TGF}\beta_1$  und je nach Bedingung mit viertelstündiger Vorinkubation mit dem iNOS-Inhibitor 1400W (100nM). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil des iNOS-Inhibitors 1400W. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von  $n=7-9$  Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p<0,05$ ).

In Abbildung 17 ist die NO-Freisetzung bezogen auf die 1400W Gruppe in den ersten 60 Minuten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der NO-Freisetzung unter Inhibition mit 1400W mit  $100 \pm 0,58\%$  und der Stimulation mit  $\text{TGF}\beta_1$  mit  $106,83 \pm 1,19\%$  sowie der Kombination von 1400W und  $\text{TGF}\beta_1$  mit  $105,65 \pm 0,63\%$ . Dies zeigt dass die iNOS nicht an der  $\text{TGF}\beta_1$ -induzierten NO-Freisetzung beteiligt ist, da sie nicht durch 1400W supprimierbar ist. Als verantwortliche NO-Synthasen kommen somit nur noch die eNOS oder nNOS in Frage.

Im nächsten Schritt wurde der gleiche Versuchsaufbau wie bereits bei den NO-Messungen mit den Inhibitoren ETU und 1400W gewählt. Zur Inhibition der nNOS wurde der spezifische Inhibitor TFA verwendet.

## Ergebnisse

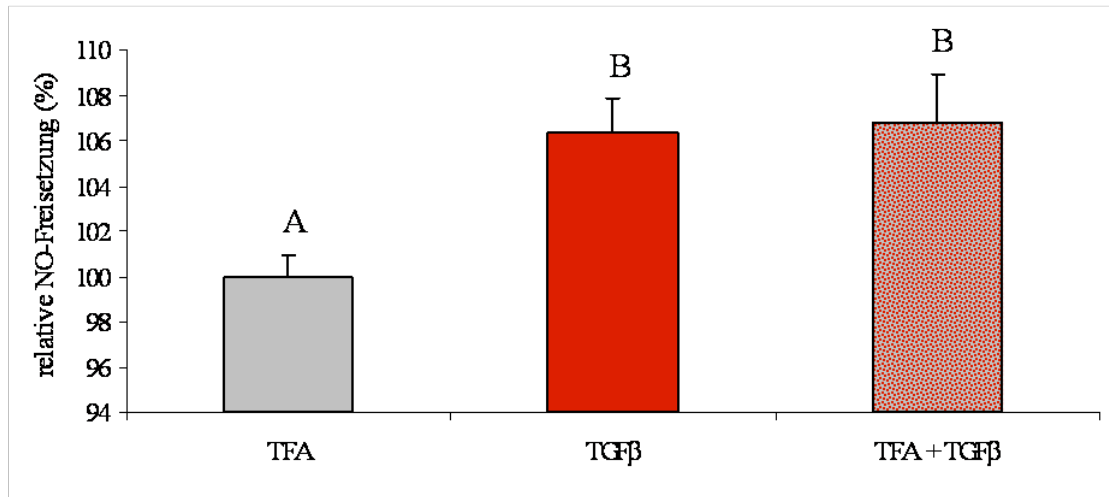


Abbildung 18: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 60 Minuten nach Stimulation mit  $TGF\beta_1$  und je nach Bedingung mit viertelstündiger Vorinkubation mit dem nNOS-Inhibitor TFA ( $100\mu M$ ). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil des nNOS-Inhibitors TFA. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von  $n = 7-10$  Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 18 ist die NO-Freisetzung bezogen auf die TFA Gruppe in den ersten 60 Minuten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der NO-Freisetzung unter Inhibition mit TFA mit  $100 \pm 0,96\%$  und der Stimulation mit  $TGF\beta_1$  mit  $106,37 \pm 1,46\%$  sowie der Kombination von TFA und  $TGF\beta_1$  mit  $106,81 \pm 2,12\%$ . Dies zeigt, dass die nNOS nicht an der  $TGF\beta_1$ -induzierten NO-Freisetzung beteiligt ist, da sie nicht durch TFA supprimierbar ist. Somit wurden die iNOS und die nNOS als verantwortliche Isoform ausgeschlossen und es rückt die eNOS in den Fokus. Da es keinen spezifischen Inhibitor der eNOS gibt, musste die Fragestellung im Ausschlussverfahren beantwortet werden.

Als nächster Schritt wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft, ob eine Stimulation von Kardiomyozyten mit  $TGF\beta_1$  eine Aktivitätssteigerung der eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177 bewirkt.

## Ergebnisse

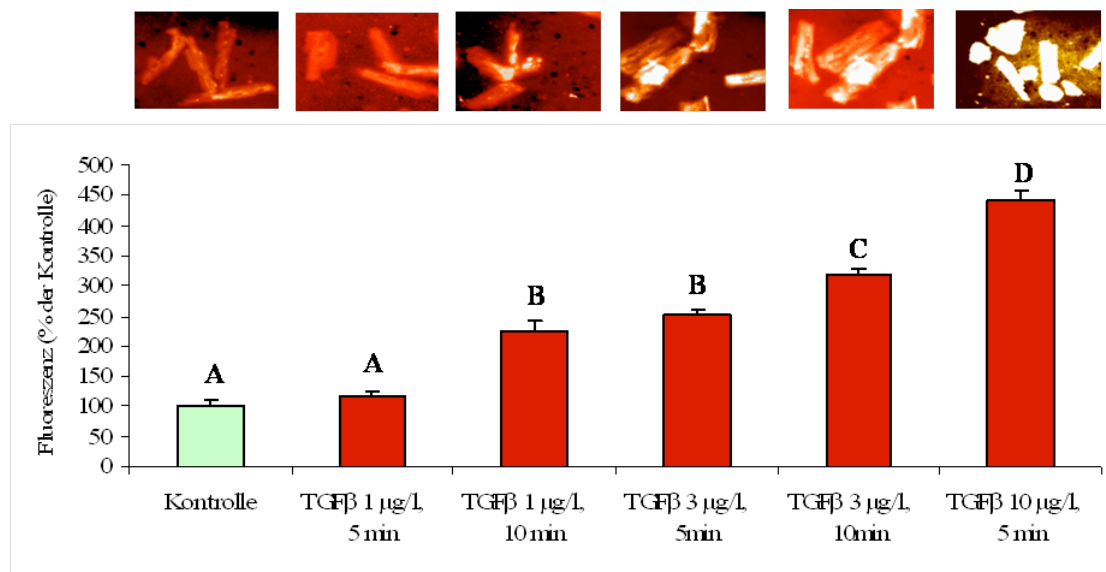


Abbildung 19: Immunfluoreszenz: Quantitative Darstellung der eNOS-Phosphorylierung in Kardiomyozyten nach 5 und 10 Minuten Stimulation mit unterschiedlicher TGFβ<sub>1</sub>-Konzentration (1 µg/L, 3 µg/L und 10 µg/L). Dargestellt ist der Mittelwert aus verschiedenen Anzahlen von Zellen (n= 20-25) und der Standardfehler. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Oben: Repräsentative Zellen. Unten: Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p<0,05).

Mittels Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper gegen die phosphorylierte Form der eNOS an Serin 1177 und einem Sekundärantikörper gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers wurde überprüft, ob eine Stimulation von Kardiomyozyten mit TGFβ<sub>1</sub> eine Aktivitätssteigerung der eNOS bewirkt. Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die Kinetik der Aktivitätssteigerung durch Phosphorylierung zeit- und konzentrationsabhängig ist, wurden neben einer Kontrolle die Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> für fünf und zehn Minuten durchgeführt und es wurden TGFβ<sub>1</sub>-Konzentrationen von 1µg/L, 3µg/L und 10µg/L verwendet.

Abbildung 19 zeigt eine zeitabhängige und TGFβ<sub>1</sub>-konzentrationsabhängige Aktivitätssteigerung der eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177. Im Vergleich zur Kontrolle mit 100 ± 11,2% und der Gruppe, die für 5 Minuten mit 1µg/L TGFβ<sub>1</sub> stimuliert wurde, mit 116,09% ± 8,36%, zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Bei den Gruppen, die ebenfalls für 5 Minuten stimuliert wurden, jedoch mit 3µg/L TGFβ<sub>1</sub> mit 250 ± 11,46% und mit 10µg/L TGFβ<sub>1</sub> mit 442,31 ± 13,22% zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Die Aktivitätssteigerung der eNOS ist von der TGFβ<sub>1</sub>-Konzentration abhängig. Die Dauer der TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation wirkt sich ebenfalls auf die Aktivitätssteigerung der eNOS aus. Bei den Gruppen die für 10 Minuten stimuliert wurden mit 1µg/L TGFβ<sub>1</sub> mit 223,31 ± 20,39% und mit 3µg/L TGFβ<sub>1</sub> mit 320,3 ± 9,17% zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied.

Dies unterstreicht den zeit- und konzentrationsabhängigen Charakter der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Aktivitätssteigerung der eNOS.

Nachdem die verantwortliche NO-Synthese identifiziert ist, gilt es nun auf TGFβ<sub>1</sub>-Rezeptorebene den Signalweg genauer zu analysieren und nach der eNOS phosphorylierenden Kinasen zu suchen.

## 5.4. Rezeptorabhängiger Signalweg

TGF $\beta$ <sub>1</sub> kann seine intrazelluläre Wirkung sowohl über SMAD-Proteine (Heger et al., 2009), als auch über sogenannte non-SMAD-Pathways (Derynck et al., 2003 ; Zhang, 2009) vermitteln. Beim SMAD-Pathway führt die Bindung von TGF $\beta$ <sub>1</sub> an den Rezeptor zu einer Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors (ALK5) durch die konstitutiv aktive Rezeptor Typ II-Kinase. Der aktivierte TGF $\beta$ -Rezeptor-Subtyp I (ALK5) phosphoryliert SMAD2 und SMAD3. Durch Phosphorylierung dieser SMAD-Proteine kommt es zu einer Translokation des Komplexes bestehend aus P-SMAD2/3 und SMAD4 in den Kern. Hier wirkt der Komplex als Transkriptionsfaktor genregulatorisch und aktiviert apoptotische Zielgene.

Als Inhibitor des TGF $\beta$ -Rezeptor-Subtyps I wurde der ALK5-Rezeptorantagonist SB 431542 gewählt. Es soll untersucht werden, ob der TGF $\beta$ -Rezeptor-Subtyp I (ALK5) an der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten NO-Freisetzung und der Apoptose beteiligt ist.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des ALK5-Rezeptorantagonisten SB 431542 wurden zunächst Western Blots durchgeführt, die die Phosphorylierung von SMAD2 und seine Hemmung durch SB431542 zeigen sollten.

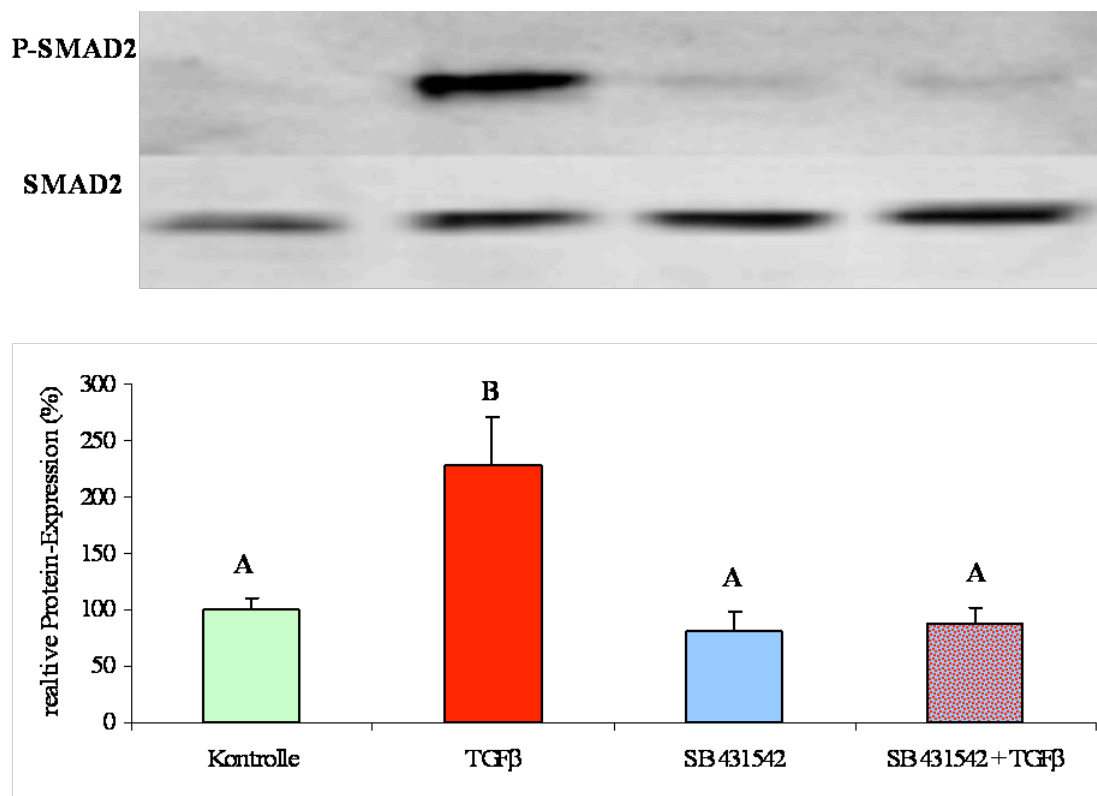


Abbildung 20: Relative P-SMAD2-Expression nach 2-stündiger Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> (1 $\mu$ g/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 (1 $\mu$ M) in Kardiomyozyten. Immunoblot aus 80  $\mu$ g Gesamtprotein normiert auf SMAD2. Oben: Repräsentative Darstellung eines Blots. Unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Abbildung 20 zeigt über dem Diagramm einen repräsentativen Western Blot mit den Zielproteinen SMAD2 und P-SMAD2. Mittels Quotientenbildung kann die relative P-SMAD2 Expression dargestellt werden. In Abbildung 22 sieht man einen signifikanten Unterschied zwischen der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Gruppe mit einer relativen P-SMAD2-Expression von  $227,77 \pm 42,9$  % und den drei Gruppen bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 10,24$ %, der SB431542-Gruppe mit  $80,27 \pm 17,29$ % und der Gruppe mit der Kombination aus SB431542 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit  $88,08 \pm 12,83$ %. Somit ist die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Phosphorylierung von SMAD2 ALK5-Rezeptor-vermittelt, denn der Inhibitor SB431542 blockiert den SMAD-Pathway.

Um sicherzustellen, dass nur die Phosphorylierung von SMAD2 zu P-SMAD2 TGF $\beta$ <sub>1</sub>-vermittelt ist, wurde die relative SMAD2-Expression berechnet, indem man sie durch Quotientenbildung mit einem stabil exprimierten Protein wie Vinculin vergleicht.

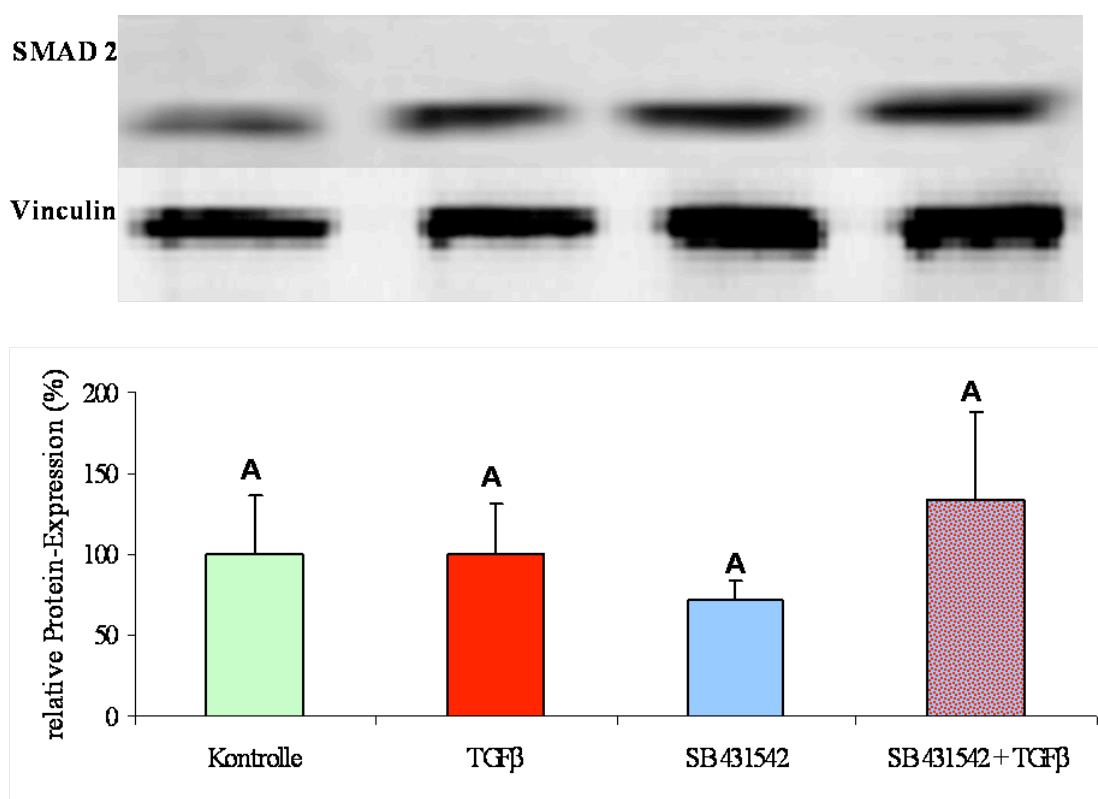


Abbildung 21: Relative SMAD 2-Expression nach 2-stündiger Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> (1 $\mu$ g/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 (1 $\mu$ M) in Kardiomyozyten. Immunoblot aus 80  $\mu$ g Gesamtprotein normiert auf Vinculin. Oben: Repräsentative Darstellung eines Blots. Unten: Quantitative Auswertung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (  $p < 0,05$ ).

Abbildung 21 zeigt über dem Diagramm einen repräsentativen Western Blot mit den Zielproteinen SMAD2 und Vinculin. Mittels Quotientenbildung kann somit die relative SMAD2-Expression berechnet werden. Im Diagramm in Abbildung 23 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 35,82$ %, der TGF $\beta$ <sub>1</sub> Gruppe mit  $99,65 \pm 31,81$ %, der SB431542-Gruppe mit  $71,45 \pm 11,74$ % und der Gruppe mit der Kombination aus SB431542 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit  $133,52 \pm 54,78$ %. Somit ist die Expression von SMAD2 nicht ALK5-Rezeptor-abhängig, sondern nur die Phosphorylierung von SMAD2 zu P-SMAD2.

## Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob die  $TGF\beta_1$ -induzierte Apoptose ALK5-Rezeptor-abhängig ist, wurden Apoptosenachweise angewendet. Der Caspase 3/7 Assay stellt einen frühen Apoptosenachweis dar, der HOE-Assay einen späten Apoptosenachweis.

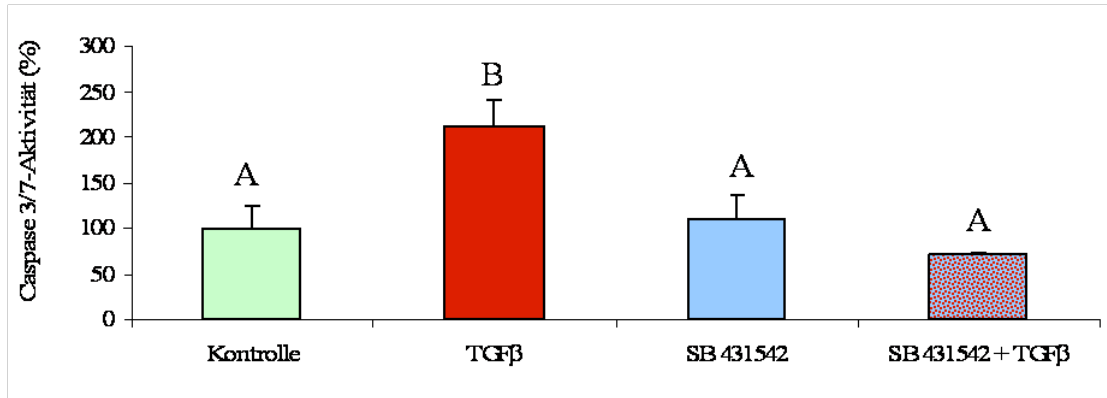


Abbildung 22: Darstellung der Caspase 3/7 Aktivität nach sechsstündiger Stimulation mit  $TGF\beta_1$  ( $1\mu\text{g/L}$ ) und je Bedingung 15 Minuten Vorinkubation mit dem ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 ( $1\mu\text{M}$ ) in Kardiomyozyten. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Lumineszenz wurde mittels Photometer (Microplate reader Tecan infinite 200) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Zur Überprüfung der Frage, ob die  $TGF\beta_1$ -induzierte Apoptose ALK5 vermittelt ist, wurden Kardiomyozyten je nach Bedingung stimuliert und ein Caspase 3/7-Assay durchgeführt.

In Abbildung 22 ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Caspase 3/7-Aktivität der  $TGF\beta_1$ -Gruppe mit  $212,54 \pm 28,6\%$  und den anderen 3 Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 23,93\%$ , der SB431542-Gruppe mit  $110,48 \pm 26,3\%$  und der Gruppe mit der Kombination aus SB431542 und  $TGF\beta_1$  mit  $72,24 \pm 2,06\%$ , dargestellt. Es kann somit gezeigt werden, dass die  $TGF\beta_1$ -induzierte Apoptose ALK5-Rezeptor vermittelt ist.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde der HOE-Assay als zweiter Apoptosenachweis gewählt.

## Ergebnisse

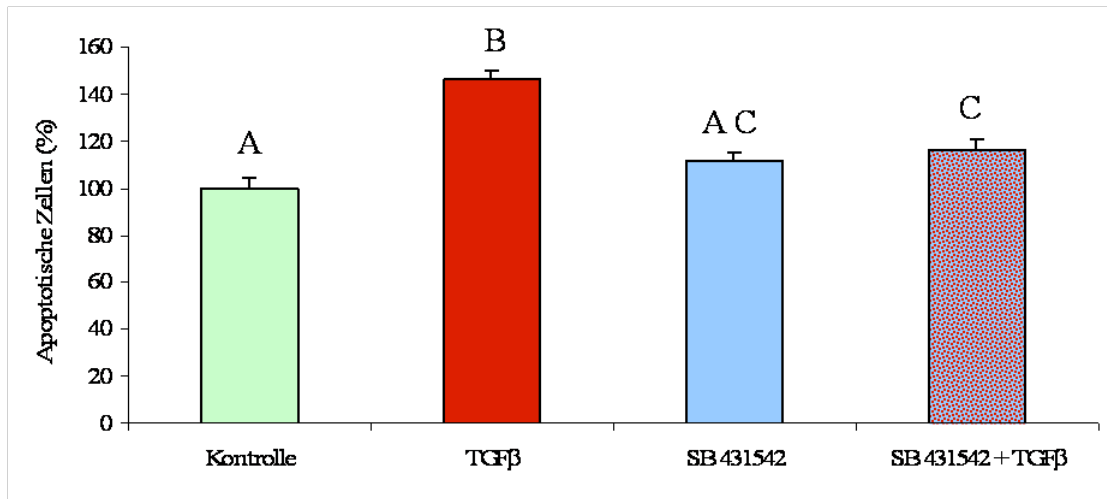


Abbildung 23: Chromatinkondensation: Anteil apoptotischer adulter Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1µg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 ( 1 µM). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Auszählung und Differenzierung erfolgte mittels HOECHST / Propidiumiodid Färbung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 10 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p < 0,05).

Im Caspase 3/7-Assay konnte bereits gezeigt werden, dass die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte Apoptose ALK5-Rezeptor vermittelt ist. Jetzt wurden die Kardiomyozyten je nach Bedingung stimuliert und im HOE-Assay die Apoptoserate bestimmt. Die apoptotischen Zellen wurden prozentual auf die Kontrolle bezogen. Abbildung 23 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle mit 100 ± 4,31% und der TGFβ<sub>1</sub>-Gruppe mit 146,06 ± 3,99%. Sowohl die Gruppe, die nur mit SB431542 stimuliert wurde mit 111,2 ± 3,85%, als auch die Gruppe mit der Kombination aus SB431542 und TGFβ<sub>1</sub> mit 115,77 ± 4,65%, unterscheiden sich signifikant von der TGFβ<sub>1</sub>-Gruppe. Die Gruppe mit der Kombination aus TGFβ<sub>1</sub> und ALK5 Inhibitor unterscheidet sich jedoch auch signifikant von der Kontrolle. Es zeigt sich, dass die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte Apoptose ALK5-Rezeptor-vermittelt ist. Wenngleich der Inhibitor die Apoptoserate bei Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> nicht auf Kontrollniveau reduzieren kann.

Mit dem zweiten Apoptosenachweisverfahren konnte somit bestätigt werden, dass die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte Apoptose ALK5-Rezeptor vermittelt ist.

Um zu überprüfen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem ALK5-Rezeptor und der NO-Freisetzung unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation besteht, wurde die NO-Freisetzung erneut im DAF-Assay unter der Verwendung des ALK5-Rezeptor-Inhibitors gemessen.



## Ergebnisse

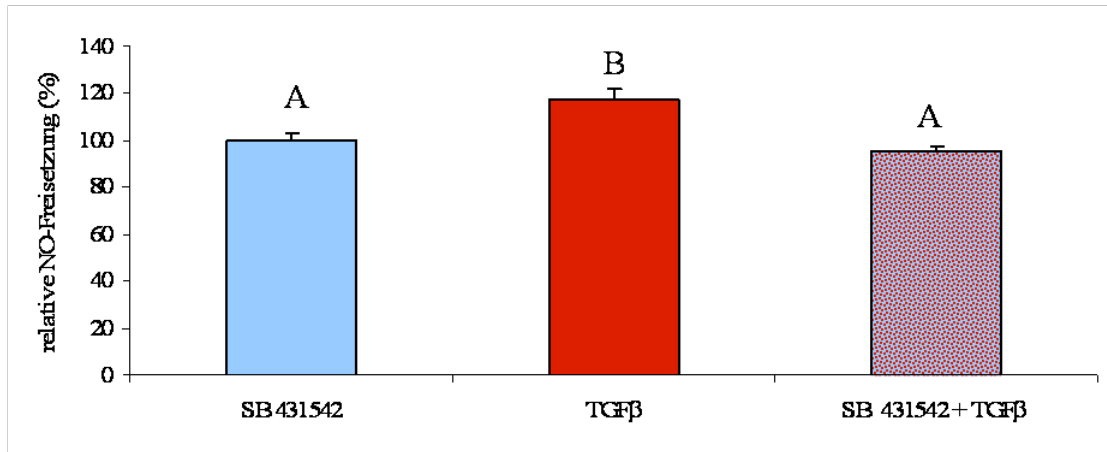


Abbildung 24: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 60 Minuten nach Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> und je nach Bedingung mit viertelstündiger Vorinkubation mit dem ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 (1μM). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil des ALK5-Rezeptor-Inhibitors SB431542. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von n= 8-10 Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p<0,05).

In Abbildung 24 ist die NO-Freisetzung bezogen auf die SB431542-Gruppe in den ersten 30 Minuten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der NO-Freisetzung unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit 117,44 ± 4,36% und den beiden Gruppen, bestehend aus der SB431542-Gruppe mit 100 ± 3,41%, sowie der Gruppe mit der Kombination aus SB 431542 und TGFβ<sub>1</sub> mit 95,07 ± 2,47%. Die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte NO-Freisetzung ist somit ALK5-Rezeptor-vermittelt, da sie mit SB431542 supprimierbar ist.

### **5.5. Verbindung zwischen Rezeptor und NO-Synthase**

Nachdem bereits die eNOS als verantwortliche NO-Synthase-Isoform und deren Aktivierungsform geklärt werden konnte und auch eine Beteiligung des ALK5-Rezeptors in diesem TGFβ<sub>1</sub>-vermittelten Signalweg nachgewiesen werden konnte, gilt es nun die für die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte Phosphorylierung der eNOS an Serin 1077 verantwortliche Kinase zu finden. Eine mögliche Kinase stellt die PI3-Kinase dar (Mount, 2006).

Um zu überprüfen, ob die PI3-Kinase in den Signalweg der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Apoptose involviert ist, wurden Ly294002 und Wortmannin als Inhibitoren der PI3-Kinase verwendet.

Im Folgenden wurden zunächst die beiden Apoptosenachweisverfahren Caspase 3/7-Assay und HOE-Assay durchgeführt.

## Ergebnisse

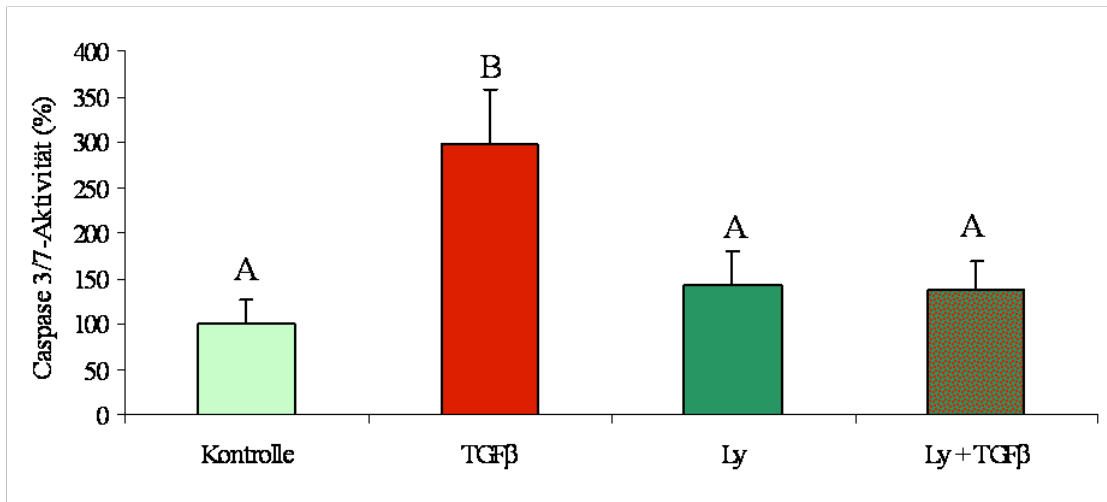


Abbildung 25: Darstellung der Caspase 3/7-Aktivität nach sechsständiger Stimulation mit  $\text{TGF}\beta_1$  ( $1\mu\text{g/L}$ ) und je nach Bedingung 15 Minuten Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 ( $10\mu\text{M}$ ) in Kardiomyozyten. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Lumineszenz wurde mittels Photometer (Microplate reader Tecan infinite 200) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 11 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 25 ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Caspase 3/7-Aktivität der  $\text{TGF}\beta_1$ -Gruppe mit  $298, \pm 59,43\%$  und den anderen 3 Gruppen bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 25,86\%$ , der Ly294002-Gruppe mit  $142,27 \pm 36,96\%$  und der Gruppe mit der Kombination aus Ly294002 und  $\text{TGF}\beta_1$  mit  $137,61 \pm 31,84\%$  dargestellt. Im frühen Apoptosenachweisverfahren kann somit gezeigt werden, dass die PI3-Kinase an der  $\text{TGF}\beta_1$ -induzierten Apoptose beteiligt ist und dass Ly294002 zu einer Hemmung der  $\text{TGF}\beta_1$ -induzierten Apoptose führt.

Mit dem HOE-Assay als spätes Apoptosenachweisverfahren sollen nun die Ergebnisse aus dem Caspase 3/7-Assay bestätigt werden.

## Ergebnisse

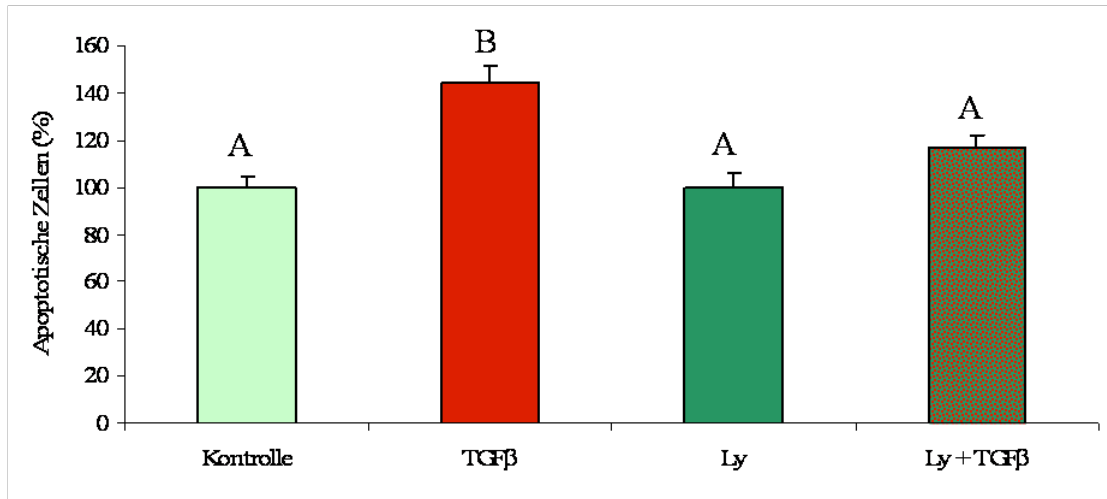


Abbildung 26: Chromatinkondensation: Anteil apoptotischer adulter Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub> Stimulation (1µg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly 294002(10 µM). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Auszählung und Differenzierung erfolgte mittels HOECHST / Propidiumiodid Färbung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 10 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p < 0,05).

Zur Inhibition der PI3-Kinase wurde erneut der Inhibitor Ly294002 verwendet. Die apoptotischen Zellen wurden prozentual auf die Kontrolle bezogen. Abbildung 26 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der TGFβ<sub>1</sub>-Gruppe mit 144,78 ± 6,35% und den drei anderen Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit 100 ± 4,63 %, der Ly294002-Gruppe mit 99,57 ± 6,06% und der Gruppe mit der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit 116,52 ± 5,53%. Die Ergebnisse bestätigen, dass die PI3-Kinase in der Signalkaskade der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Apoptose eine Rolle spielt und dass Ly294002 die TGFβ<sub>1</sub>-induzierte Apoptose hemmt.

Zur zusätzlichen Überprüfung der Ergebnisse wurde der HOE-Assay mit Wortmannin wiederholt. Wortmannin ist ebenfalls ein PI3-Kinase-Inhibitor.

## Ergebnisse

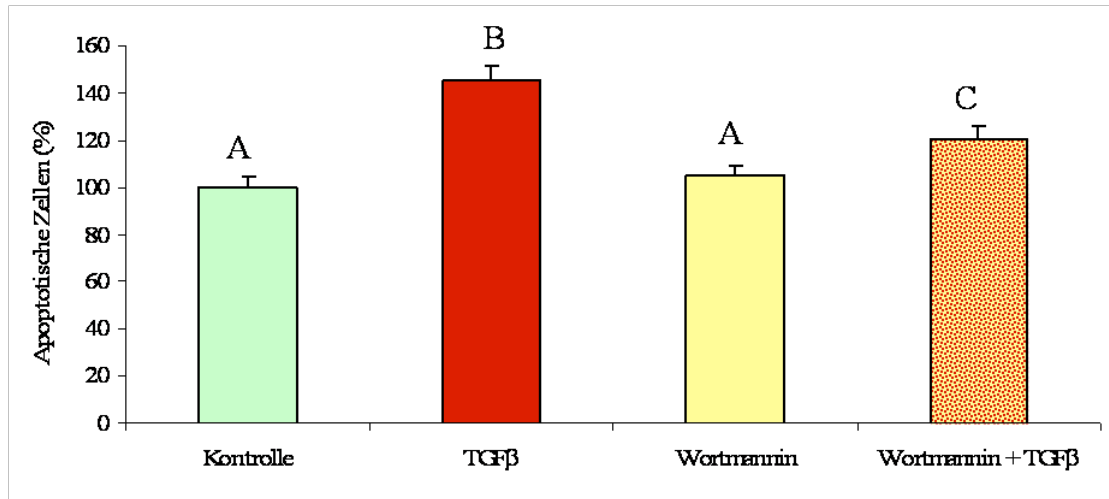


Abbildung 27: Chromatinkondensation: Anteil apoptotischer adulter Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub> Stimulation (1µg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nM). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Auszählung und Differenzierung erfolgte mittels HOECHST / Propidiumiodid-Färbung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 12 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p < 0,05).

Abbildung 27 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der TGFβ<sub>1</sub>-Gruppe mit  $145,39 \pm 6,04\%$  und der Kontrolle mit  $100 \pm 4,63\%$  und der Wortmannin-Gruppe mit  $104,8 \pm 3,91\%$ . Signifikant zu allen bereits erwähnten Gruppen unterscheidet sich die Kombination aus Wortmannin und TGFβ<sub>1</sub> mit  $120,60 \pm 4,99\%$ . Somit kann bestätigt werden, dass die PI3-Kinase an der Signalkaskade der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Apoptose beteiligt ist, denn Wortmannin führt ebenfalls zu einer Hemmung der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Apoptose.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die NO-Freisetzung unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation durch Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 supprimierbar ist und die PI3-Kinase möglicherweise an der Aktivierung der eNOS beteiligt ist.

## Ergebnisse

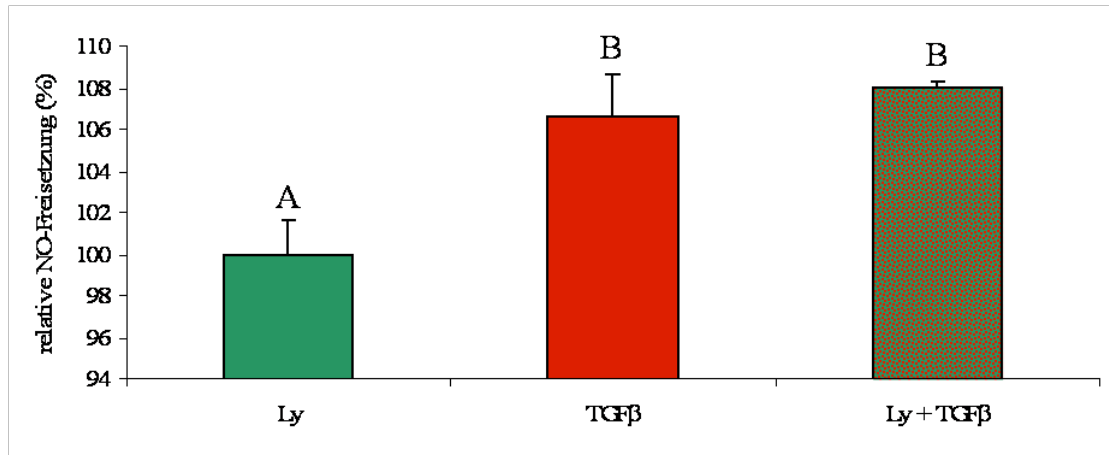


Abbildung 28: Quantitative Darstellung der NO-Freisetzung in adulten vitalen Kardiomyozyten in den ersten 60 Minuten nach Stimulation mit  $TGF\beta_1$  und je nach Bedingung mit viertelstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 ( $10\mu M$ ). Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil des PI3-Kinase-Inhibitors Ly294002. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unterschiedlichen Zellpräparationen mit einer Gesamtzahl von  $n=10-15$  Kardiomyozyten je Bedingung und dem zugehörigen Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p<0,05$ ).

In Abbildung 28 ist die NO-Freisetzung bezogen auf die Ly294002-Gruppe in den ersten 60 Minuten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der NO-Freisetzung unter Stimulation mit Ly294002 mit  $100 \pm 1,66\%$  und den beiden Gruppen bestehend aus der  $TGF\beta_1$ -Gruppe mit  $106,65 \pm 2,02\%$  sowie der Gruppe mit der Kombination aus Ly294002 und  $TGF\beta_1$  mit  $108,04 \pm 0,28\%$ . An der  $TGF\beta_1$ -induzierten NO-Freisetzung ist die PI3-Kinase somit nicht beteiligt, wenngleich sie im ALK5-rezeptorabhängigen Signalweg der  $TGF\beta_1$ -induzierten Apoptose involviert ist.

Da die PI3-Kinase interessanterweise eine Rolle bei der  $TGF\beta_1$ -induzierten Apoptose spielt, die über die Transkriptionsfaktoren SMAD und AP1 vermittelt wird, gilt es im nächsten Schritt die Bindungsaktivität von den  $TGF\beta_1$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD unter Stimulation mit  $TGF\beta_1$  unter Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 zu überprüfen.

## 5.6. Bindungsaktivität

Im nächsten Schritt wurde die Bindungsaktivität von den TGF $\beta_1$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren AP1 und SMAD unter Stimulation mit TGF $\beta_1$  und unter Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 untersucht.

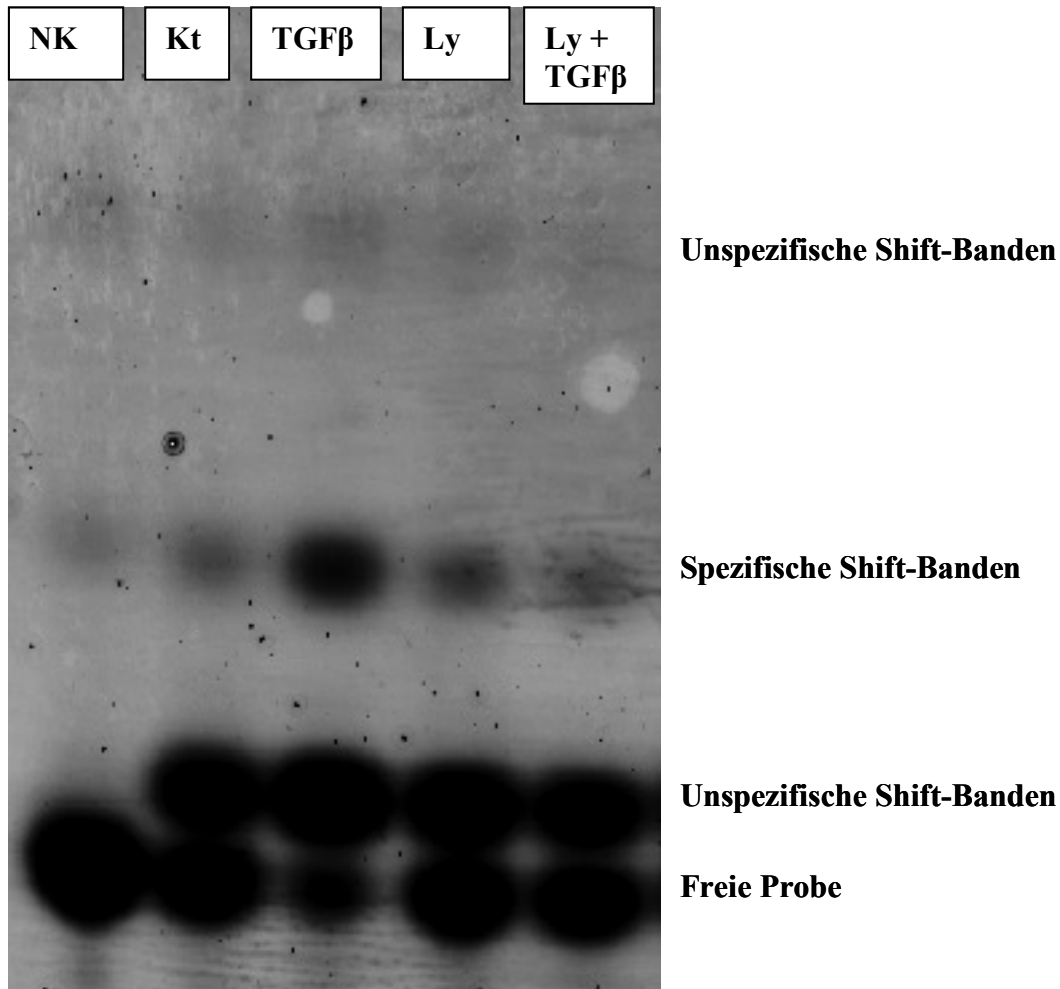


Abbildung 29: Repräsentative Darstellung der AP1-Bindungsaktivität eines Versuchstages mit einer Negativkontrolle (NK), einer Kontrolle (Kt), einer Stimulation mit TGF $\beta_1$ , einer Inhibition mit Ly 294002 und der Kombination aus Ly294002 und TGF $\beta_1$ .

Abbildung 29 zeigt ein repräsentatives Gel, an dem die AP1-Bindungsaktivität mit einer Negativkontrolle, einer Kontrolle, der Stimulation mit TGF $\beta_1$ , der Inhibition der PI3 Kinase mit Ly294002 und der Kombination aus Ly294002 und TGF $\beta_1$  untersucht wurde.

Es ist in Abbildung 29 zu sehen, dass die Bindungsaktivität unter TGF $\beta_1$  zunimmt, denn es zeigt sich die stärkste spezifische Shift-Bande unter TGF $\beta_1$ -Stimulation.

## Ergebnisse

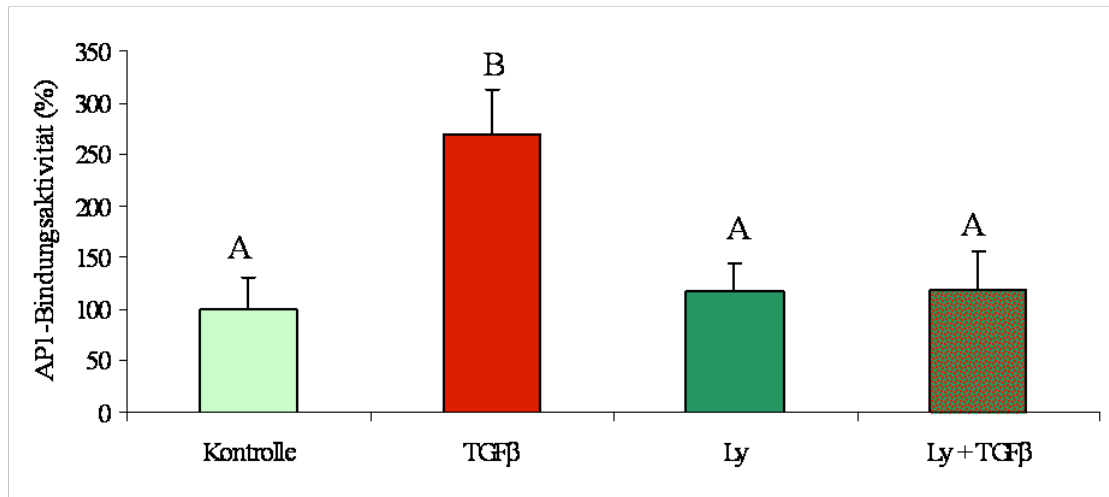


Abbildung 30: Darstellung der AP1-Bindungsaktivität nach 2-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1μg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 (10μM) in Kardiomyozyten. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p<0,05).

In Abbildung 30 ist die AP1-Bindungsaktivität nach 2-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AP1-Bindungsaktivität unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit 270,24 ± 42,4% und den drei anderen Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit 100 ± 30,69%, der Ly294002-Gruppe mit 117,56 ± 27,49% und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit 118,82 ± 37,46%. Eine Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> erhöht somit die AP1-Bindungsaktivität. Die Inhibition der PI3-Kinase durch Ly294002 vermag die AP1-Bindungsaktivität, die durch TGFβ<sub>1</sub> erhöht wird, auf Kontrollniveau zu senken.

Die PI3-Kinase ist somit wichtig für die Aktivierung von AP1 unter TGFβ<sub>1</sub>.

Im nächsten Schritt wird die ebenfalls TGFβ<sub>1</sub>-abhängige SMAD-Bindungsaktivität untersucht.

## Ergebnisse

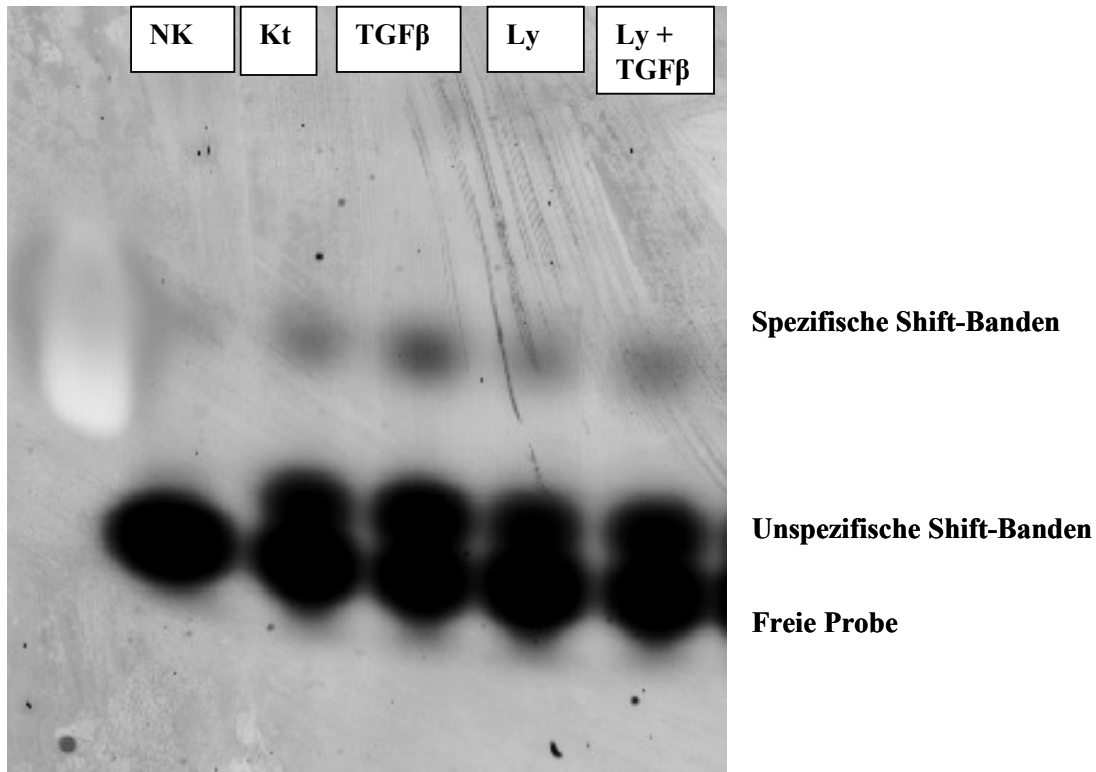


Abbildung 31: Repräsentative Darstellung der SMAD-Bindungsaktivität eines Versuchstages mit einer Negativkontrolle (NK), einer Kontrolle (Kt), einer Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub>, einer Stimulation mit Ly 294002 und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub>.

Abbildung 31 zeigt ein repräsentatives Gel, an dem die SMAD-Bindungsaktivität mit einer Negativkontrolle, einer Kontrolle, der Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub>, der Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> untersucht wurde.

Es ist in Abbildung 31 zu sehen, dass die Bindungsaktivität unter TGFβ<sub>1</sub> zunimmt, denn dort zeigt sich die stärkste spezifische Shift-Bande unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation.



## Ergebnisse

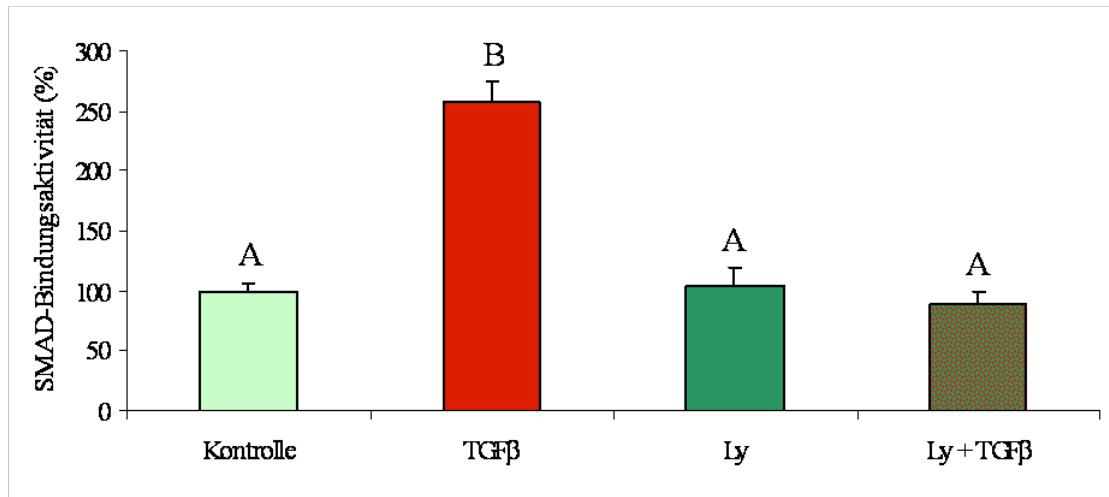


Abbildung 32: Darstellung der SMAD-Bindungsaktivität nach 2-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1µg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 (10µM) in Kardiomyozyten. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p<0,05).

In Abbildung 32 ist die SMAD-Bindungsaktivität nach 2-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der SMAD-Bindungsaktivität unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit 257,27 ± 17,23% und den drei anderen Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit 100 ± 6,60%, der Ly294002-Gruppe mit 104,87 ± 14,00% und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit 88,75 ± 10,22%. Eine Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> erhöht somit die SMAD-Bindungsaktivität. Die Inhibition der PI3-Kinase durch Ly294002 vermag die SMAD-Bindungsaktivität, die durch TGFβ<sub>1</sub> erhöht wird, auf Kontrollniveau zu senken

Die PI3-Kinase ist somit wichtig für die Aktivierung von SMAD unter TGFβ<sub>1</sub>.

Somit konnte gezeigt werden, dass die TGFβ<sub>1</sub>-abhängige Steigerung der Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD durch Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 gesenkt werden kann.

Die PI3-Kinase ist somit Bestandteil des TGFβ<sub>1</sub>-Pathways.

Im nächsten Schritt wird die Rolle der PI3-Kinase im Rahmen der TGFβ<sub>1</sub>-induzierten Apoptose weiter untersucht. Ziel ist es, die Aktivität von TGFβ<sub>1</sub>-abhängigen Genen unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> und unter Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 zu untersuchen, um die Rolle der PI3-Kinase besser zu charakterisieren.

## 5.7. PCR

Es gibt eine Vielzahl an TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängigen Genen. Hierzu gehören SMAD7, DAPK, SHIP und Tieg1. Im nächsten Schritt wird die Aktivität von TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängigen Genen unter Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> und unter Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 untersucht.

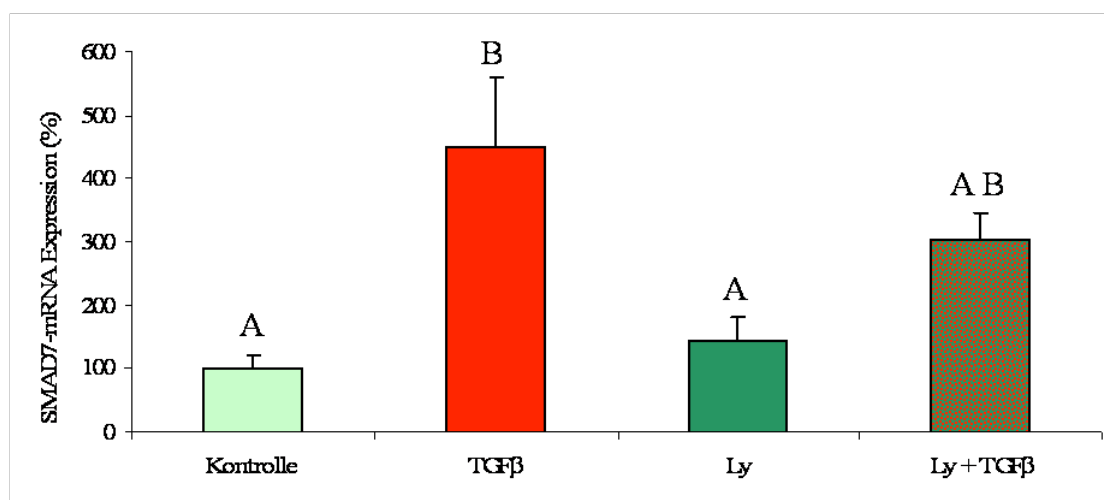


Abbildung 33: Quantitative real-time RT-PCR. Relative SMAD7-mRNA-Expression in Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGF $\beta$ <sub>1</sub> Stimulation (1 $\mu$ g/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 (10 $\mu$ M). Die real-time RT-PCR Ergebnisse sind normiert auf 18S rRNA. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 33 ist die SMAD7-mRNA-Expression dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der SMAD7-mRNA-Expression unter Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit  $451,16 \pm 109,44\%$  und den beiden Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 20,15\%$  und der Ly294002-Gruppe mit  $143,97 \pm 36,57\%$ . Die Kombination aus Ly294002 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit  $303,62 \pm 42,33\%$  unterscheidet sich nicht signifikant, weder von der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Gruppe, noch von der Kontrolle und der Ly294002-Gruppe. Es konnte somit gezeigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> eine signifikante Erhöhung der SMAD7-RNA-Expression bewirkt. Eine Inhibition der PI3-Kinase unter TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation bewirkt eine Reduktion der SMAD7 mRNA-Expression, jedoch nicht auf Kontrollniveau.

## Ergebnisse

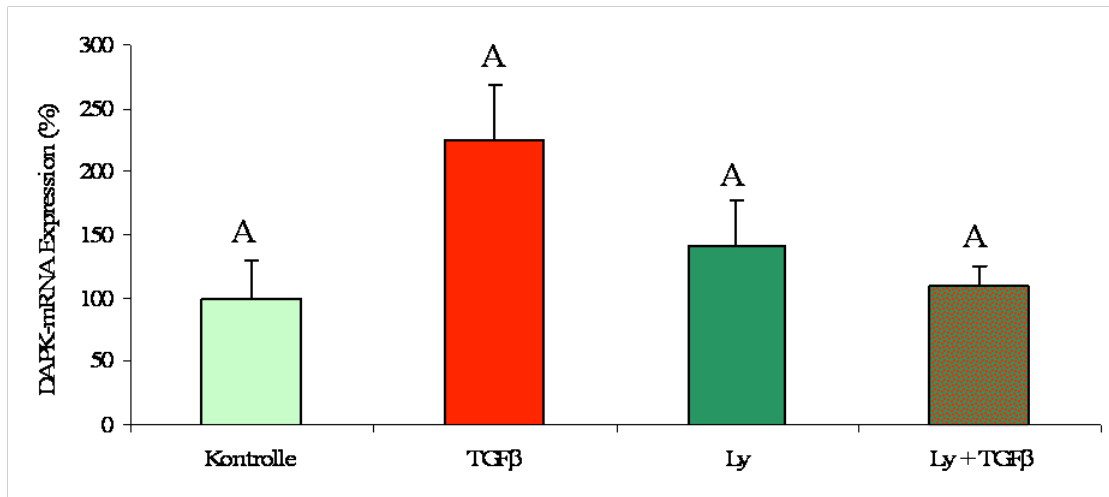


Abbildung 34: Quantitative real-time RT-PCR. Relative DAP-Kinase-mRNA-Expression in Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1µg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3- Kinase-Inhibitor Ly294002 (10µM). Die real-time RT-PCR Ergebnisse sind normiert auf 18S rRNA. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 34 ist die DAPK mRNA-Expression dargestellt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der DAPK-mRNA-Expression unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit  $224,35 \pm 43,30\%$  und den anderen drei Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit  $100 \pm 29,22\%$  und der Ly294002 Gruppe mit  $141,53 \pm 36,07\%$  und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit  $110,27 \pm 15,16\%$ .

Unter dem verwendeten Stichprobenumfang von  $n=7$ , stellte sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ein. Ein Trend ist bei einer DAPK mRNA-Expression von  $224,35\%$  unter TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation ersichtlich. Es konnte jedoch mit dem gewählten Stichprobenumfang keine TGFβ<sub>1</sub>-abhängige DAPK-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die Inhibition der PI3-Kinase durch Ly294002 wirkte sich ebenfalls nicht signifikant auf die DAPK-mRNA-Expression aus.

## Ergebnisse

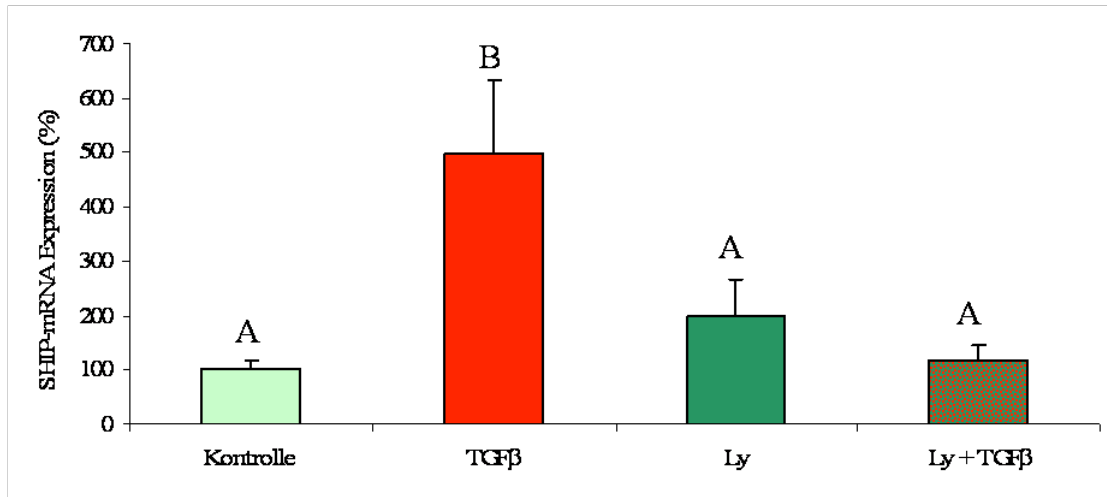


Abbildung 35: Quantitative real-time RT-PCR. Relative SHIP-mRNA-Expression in Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1μg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 (10μM). Die real-time RT-PCR Ergebnisse sind normiert auf 18S rRNA. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p < 0,05).

In Abbildung 35 ist die SHIP-mRNA-Expression dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der SHIP-mRNA-Expression unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit 497,00 ± 135,27% und den anderen drei Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit 100 ± 17,69% und der Ly294002 Gruppe mit 198,98 ± 65,67% und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit 119,01 ± 26,96%.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die TGFβ<sub>1</sub>-abhängige SHIP-mRNA-Expression durch Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 auf Kontrollniveau gesenkt werden kann und die PI3-Kinase bei der Erhöhung der SHIP-mRNA-Expression eine Rolle spielt.

## Ergebnisse

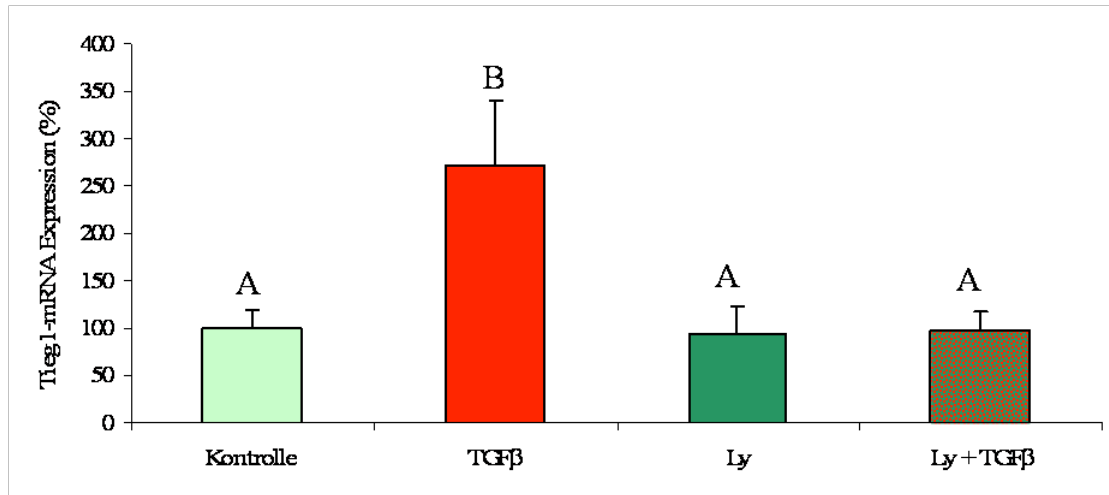


Abbildung 36: Quantitative real-time RT-PCR. Relative Tieg1-mRNA-Expression in Kardiomyozyten nach 24-stündiger TGFβ<sub>1</sub>-Stimulation (1μg/L) und je nach Bedingung halbstündiger Vorinkubation mit dem PI3-Kinase- Inhibitor Ly294002 (10μM). Die real-time RT-PCR Ergebnisse sind normiert auf 18S rRNA. Die Darstellung bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 7 unterschiedlichen Zellpräparationen und der zugehörige Standardfehler. Gruppen, die sich nach ANOVA signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (p < 0,05).

In Abbildung 36 ist die Tieg1-mRNA-Expression dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Tieg1-mRNA-Expression unter Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> mit 271,40 ± 68,21% und den anderen drei Gruppen, bestehend aus der Kontrolle mit 100 ± 19,87% und der Ly294002 Gruppe mit 93,34 ± 30,44% und der Kombination aus Ly294002 und TGFβ<sub>1</sub> mit 99,00 ± 18,03%.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die TGFβ<sub>1</sub>-abhängige Tieg1-mRNA-Expression durch Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 auf Kontrollniveau gesenkt werden kann und die PI3-Kinase bei der Erhöhung der Tieg1-mRNA-Expression eine Rolle spielt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass TGFβ<sub>1</sub>-Target-Gene PI3-Kinase-abhängig sind.

## **6. Diskussion**

In dieser Arbeit wurde ein Zellkultur-Modell mit isolierten ventrikulären Kardiomyozyten adulter Wistar Ratten verwendet.

Es konnte NO als Bestandteil des Signalweges der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten und TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Rezeptor-Typ I (ALK5)-vermittelten Apoptose in adulten Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen werden. Die eNOS konnte mittels indirekter Nachweisverfahren als verantwortliche NO-Synthase identifiziert werden.

Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> ALK5-vermittelt SMAD2 phosphoryliert und Apoptose induziert

Zusätzlich konnte die PI3-Kinase als Aktivator der eNOS ausgeschlossen werden. Die Rolle der PI3-Kinase wurde genauer charakterisiert und es konnte nachgewiesen werden, dass die PI3-Kinase TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängig Apoptose vermittelt, TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängige Gene aktiviert und die Bindungsaktivität von SMAD und AP1 erhöht.

### **6.1. Rolle des ALK5-Rezeptors**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> über die Aktivierung des ALK5-Rezeptors zu Aktivierung von SMADs und zur Freisetzung von NO führt. Beide Signalmoleküle sind letztendlich für die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Apoptose notwendig.

Die klassische TGF $\beta$ -Signalkaskade führt initial zu einer Bildung eines heterotetrameren Rezeptor-Komplexes aus spezifischen Rezeptor Typ I- und Typ II-Serin/Threonin-Kinasen (Shi & Massague, 2003; Euler-Taimor & Heger, 2006). Typ II-Rezeptoren sind Kinasen, die Typ I-Rezeptoren phosphorylieren. Typ I-Rezeptoren (ALKs) vermitteln intrazellulär spezifische Signalwege. Der aktivierte Rezeptorkomplex phosphoryliert R-SMADs. Die phosphorylierten R-SMADs bilden mit SMAD4 einen Komplex, der nach Translokation in den Nukleus als Transkriptionsfaktor wirkt. (Massague, 2000; Moustakas et al., 2001).

Durch Einsatz von Inhibitoren kann der TGF $\beta$ -Signalweg gehemmt werden. Zum Nachweis der ALK5-vermittelten TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose wurde der ALK5-Rezeptor-Inhibitor SB431542 verwendet. Der Inhibitor SB431542 ist ein selektiver Inhibitor der Typ I-Rezeptoren ALK4, ALK5 und ALK7 (DaCosta Byfield et al, 2003). Die Typ I-Rezeptoren ALK1, ALK2, ALK3 und ALK6 hingegen werden durch SB431542 nicht gehemmt. Der aktivierte ALK5-Rezeptor ist spezifisch für den SMAD2/3-Signalweg (Yi et al., 2005). Dies konnte zuerst in Endothelzellen gezeigt werden (Goumans et al., 2002).

SMAD2 und SMAD3 werden durch die aktivierten Typ I-Rezeptoren ALK4, ALK5 und ALK7 phosphoryliert (Heldin et al., 1997; Watanabe et al., 1999). ALK5 ist spezifisch für TGF $\beta$ . Dies konnte durch die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte und ALK5-Rezeptor vermittelte Phosphorylierung von SMAD2 bestätigt werden. Die Typ I-Rezeptoren ALK1, ALK2, ALK3, und ALK6 phosphorylieren hingegen SMAD1, SMAD5 und SMAD8 (Heldin et al., 1997). SB431542 ist bei adulten Kardiomyozyten ein selektiver Inhibitor des ALK5-Rezeptors, da ALK4 und ALK7 nicht exprimiert werden.

Es konnte durch Apoptose-Assays wie dem Caspase 3/7-Assay und dem HOE-Assay bestätigt werden, dass die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Apoptose bei adulten Kardiomyozyten ALK5-Rezeptor vermittelt ist. Eine ALK5-Rezeptor vermittelte Apoptose unter TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation konnte bereits bei H9C2 Kardiomyoblasten gezeigt werden (Yang et al.,

2009). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei Kardiomyozyten eine Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> unter Verwendung von SMAD Decoy-Oligonukleotiden zu einer Inhibition der Apoptose führt (Schneiders et al., 2005).

Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte der in der Literatur beschriebene TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängige SMAD-Signalweg bestätigt werden (Shi und Massague, 2003; Euler-Taimor und Heger, 2006).

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> eine NO-Freisetzung in adulten Kardiomyozyten der Ratte induziert und dass diese NO-Freisetzung ALK5-Rezeptor abhängig ist.

Es ist bekannt, dass sowohl TGF $\beta$ <sub>1</sub>, als auch NO zu einer Verschlechterung der kontraktile Funktion und zu Apoptose führen (Euler-Taimor & Heger, 2006; Schneiders et al., 2005). TGF $\beta$  und NO stellen Schlüsselmoleküle beim Übergang einer kompensierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz dar, die mit Apoptose von Kardiomyozyten verbunden ist. TGF $\beta$  und NO sind in der Regulation des kardialen Remodeling beteiligt (Wollert & Drexler, 2002). Eine vermehrte NO-Freisetzung nach TGF $\beta$ -Stimulation konnte bereits in Endothelzellen aus menschlichen Nabelvenen und in der Niere nachgewiesen werden (Turkstra et al., 1998; Vasquez et al., 2007). In Endothelzellen der menschlichen Nabelvene führen hohe extrazelluläre D-Glucose Konzentrationen zu einer vermehrten Freisetzung von TGF $\beta$ <sub>1</sub> und einer TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Rezeptor Typ-I und Typ-II abhängigen Phosphorylierung von SMAD2 (Vasquez et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass hohe D-Glucose Konzentrationen zu einer Erhöhung des L-Arginin Transportes und zu einer Erhöhung der eNOS-Expression führen (Vasquez et al., 2007). Dies zeigt, dass eine TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Induktion nicht nur in Kardiomyozyten zu einer vermehrten NO-Freisetzung führt, sondern auch in Endothelzellen. Bei Endothelzellen wird die vermehrte NO-Freisetzung jedoch durch eNOS-Expression und Phosphorylierung (Walshe et al., 2013) generiert und bei Kardiomyozyten lediglich durch Aktivierung im Sinne einer Phosphorylierung.

Die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Apoptose ist ALK5-Rezeptor vermittelt und führt zu einer Aktivierung des SMAD-Signalweges mit Phosphorylierung von SMAD2 und zu einer vermehrten NO-Freisetzung. Der ALK5-Rezeptor und die NO-Freisetzung spielen somit eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose.

## **6.2. Charakterisierung der NO-Synthese und Aktivierungsform**

In Kardiomyozyten werden alle drei Isoformen der NO-Synthase exprimiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die eNOS für die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte und ALK5-vermittelte NO-Freisetzung verantwortlich ist. Die iNOS und die nNOS konnten mittels spezifischer Inhibitoren ausgeschlossen werden. Per Ausschlussprinzip konnte somit die eNOS als verantwortliche NO Synthase nachgewiesen werden. In Endothelzellen konnte bereits eine TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte eNOS-vermittelte NO-Freisetzung nachgewiesen werden (Vasquez et al., 2007). Es stellt sich die Frage, ob die vermehrte NO-Freisetzung der eNOS durch Expression oder durch Aktivierung, beispielsweise durch Phosphorylierung, erreicht wird. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die vermehrte NO-Freisetzung auf eine vermehrte eNOS-Expression zurückzuführen ist (Vasquez et al., 2007). Bei Kardiomyozyten konnte kein signifikanter Anstieg der eNOS-Expression nach TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation gezeigt werden (Heger et al., 2011). In Endothelzellen menschlicher Nabelvenen konnte neben der bereits erwähnten

vermehrten Expression auch eine vermehrte Phosphorylierung der eNOS nach TGF $\beta$ <sub>3</sub>-Stimulation mit vermehrter NO-Freisetzung nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der eNOS konnte durch Inhibition von ALK5 gehemmt werden (Walshe et al., 2013). Dies zeigt zumindest bei Endothelzellen eine direkte Interaktion zwischen ALK5 und der eNOS.

Mittels Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit an Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängig ist. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 zu einer Aktivierung führt (Fulton et al., 2001). Der Unterschied zwischen Endothelzellen und Kardiomyozyten kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich um unterschiedlich ausdifferenzierte Zelltypen handelt.

Ob die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 ALK5-Rezeptor vermittelt ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dies wäre eine weitere Bestätigung der eNOS als verantwortliche NO-Synthase im Rahmen der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten NO-Freisetzung. Mittels Caspase 3/7-Assay konnte nachgewiesen werden, dass die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte NO-Freisetzung zu Apoptose führt. Die Ergebnisse stehen zum Teil im Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen, in denen die eNOS eine protektive Rolle einnimmt. Aus diesem Grund wird die Rolle der eNOS am Herzen in Kapitel 6.3. gesondert diskutiert.

### **6.3. Rolle der eNOS am Herzen**

Die Rolle der eNOS am Herzen ist in der Literatur weitestgehend als protektiv angegeben. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Polymorphismen der eNOS wie der Glu298Asp Genotyp korrelieren mit einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzkrankheit (Casas et al., 2004), für in-Stent-Restenosen (Suzuki et al., 2002) und für Koronarspasmen (Chang et al., 2003). Der 786CC Genotyp hat ein neunfach erhöhtes Risiko ein akutes Koronarsyndrom zu entwickeln (Fatini et al., 2004). Dies zeigt die eNOS in diesem Zusammenhang in einer protektiven Rolle. Aus den besagten Polymorphismen resultiert zwar ein funktionsfähiges Enzym, dieses könnte aber bei veränderter Transkription zu einer Interferenz der normalen Enzymfunktion führen. Des Weiteren sind Polymorphismen nicht auf Kardiomyozyten beschränkt. Sie haben Einfluss auf nicht kardiale Parameter. Dies zeigt die eNOS in diesem Zusammenhang in einer protektiven Rolle. Herzen von eNOS Doppel-Knockout (-/-) Mäusen zeigen vier Wochen nach einem Myokardinfarkt schlechtere hämodynamische Parameter, eine verminderte Kapillardichte und eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Herzen von Wildtyp-Mäusen (Scherer-Crosbie et al., 2001). Auch hier hat die eNOS eine protektive Rolle.

Eine moderate kardiomyozytär beschränkte eNOS-Überexpression führt im Ruhezustand zu keiner Veränderung der kardiomyozytären Kontraktilität und Relaxation. Im Ruhezustand bleibt die Herzfrequenz ebenfalls unverändert. Es zeigt sich jedoch eine abgeschwächte inotrope und chronotrope Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Dies zeigt eine anti-adrenerge Rolle der eNOS in Kardiomyozyten (Janssens et al., 2004).

Im Gegensatz dazu konnte in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte eine NO-vermittelte Dehnungs-induzierte Apoptose nachgewiesen werden. Hypertonie und ventrikuläre Druckerhöhung sind Faktoren des kardialen Remodeling und der



Herzinsuffizienz. Mechanische Dehnung der Kardiomyozyten induziert NO-vermittelt Apoptose. Dehnungsvermittelt steigt intrazellulär der Calcium-Spiegel an und aktiviert initial die calciumabhängige eNOS. Im Anschluss übernimmt die iNOS die NO-Freisetzung und induziert Apoptose (Liao et al., 2006). Dies geschieht durch eine NO-abhängige iNOS-Induktion (Liao et al., 2006).

Ob die eNOS letztendlich protektiv ist oder nicht, lässt sich nicht pauschal sagen. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von NO und der vielfältigen Aktivierungsmöglichkeiten der eNOS ist es durchaus denkbar, dass NO als Produkt der eNOS an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sein kann.

Es zeigt sich jedoch, dass sowohl die iNOS, als auch die eNOS für die kardiale Homöostase von elementarer Bedeutung sind.

Des Weiteren sollte man bei den genannten Signalkaskaden zwischen akuten und chronischen Geschehen unterscheiden. Viele der in der Literatur beschriebenen protektiven Eigenschaften der eNOS beziehen sich auf einen Zeitraum von wenigen Wochen nach einem Myokardinfarkt (Scherer-Crosbie et al., 2001). Bei der chronischen dekompensierten Herzinsuffizienz haben bereits viele Kompensationsmechanismen bis zur ihrer Erschöpfung modulatorisch Einfluss genommen. Aus heutiger Sicht ist keine endgültige Einordnung der Rolle der eNOS möglich. Bei akuten kardialen Infarkten ist ihre protektive Rolle klar ersichtlich. Die eNOS nimmt eine wichtige Rolle für die kardiale Homöostase ein. Dies wurde durch die beschriebenen Polymorphismen und deren erhöhte Mortalität als Ausdruck der gestörten Homöostase verdeutlicht. In dieser Arbeit konnte bei adulten Kardiomyozyten gezeigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> eine Aktivierung der eNOS mit NO-Freisetzung und Apoptose-Induktion bewirkt. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Protektivität der eNOS auch davon abhängt, ob die eNOS an einer akuten oder chronischen Signalkaskade beteiligt ist, beziehungsweise ob ihr kompensatorischer Effekt erschöpft ist. TGF $\beta$ <sub>1</sub> induziert schließlich nicht nur eine NO-Freisetzung sondern auch SMAD2/3. Die SMAD2/3 Induktion ist nicht protektiv und führt zur Apoptose.

### **6.4. Rolle der PI3-Kinase**

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Apoptose-Assays wie den Caspase 3/7-Assay und mittels HOE-Assay gezeigt werden, dass die PI3-Kinase an der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose beteiligt ist.

Die PI3-Kinase spielt primär in anti-apoptotischen Signalwegen eine Rolle. Die PI3-Kinase ist an der Regulation von Wachstum, Zellmetabolismus und Mitose beteiligt (Cantley, 2002; Katso et al., 2001; Vivanco & Sawyers, 2002).

Die PI3-Kinase ist jedoch auch bei apoptotischen Signalwegen involviert. So spielt sie bei der TGF $\beta$ -Signaltransduktion eine Rolle (Yi et al., 2005). Die PI3-Kinase ist an einem TGF $\beta$ -induzierten Non-SMAD-Signalwege beteiligt. In Epithelzellen konnte eine Interaktion und Aktivierung der PI3-Kinase durch den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I gezeigt werden (Yi et al., 2005). In menschlichen Lungenepithelzellen konnte nach Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> eine Aktivierung der PI3-Kinase/Akt Signalweges nachgewiesen werden (Lin et al., 2007). Neben den Non-SMAD-Signalwegen kann die Proteinkinase Akt ebenso direkt mit SMAD3 interagieren (Sánchez-Capelo, 2005). Die Proteinkinase Akt kann Einfluss auf die Regulation der eNOS nehmen und die eNOS an den Aminosäuren Ser-1177 und Ser-617 phosphorylieren und aktivieren (Mount et al., 2007).

Trotz des beschriebenen Einflusses der PI3-Kinase/Akt auf die NO-Freisetzung in anderen Zelltypen konnte in dieser Arbeit kein Einfluss der PI3-Kinase auf die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte NO-Freisetzung in Kardiomyozyten gezeigt werden. Eine Inhibition der PI3-Kinase mittels Ly294002 hatte keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung. Mount berichtete im Jahre 2007 über eine Akt-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS an Serin 1177. In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob eine Hemmung der PI3-Kinase eine Hemmung der Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 bewirkt. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich da eine Inhibition der PI3-Kinase keinen inhibitorischen Effekt auf die NO-Freisetzung hatte.

Interessanterweise kann der TGF $\beta$ -induzierte non-SMAD-Signalweg über den PI3-Kinase/Akt Signalweg SMAD-vermittelte Effekte in HEK293T Zellen antagonisieren (Zhang, 2009). Eine Aktivierung der PI3-Kinase oder Akt schützt Zellen vor TGF $\beta$ -induzierter Apoptose. Akt kann mit SMAD3 assoziieren und eine Phosphorylierung und Translokation in den Nukleus verhindern (Zhang, 2009). Dies zeigt, dass die PI3-Kinase/Akt als Non-SMAD-Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen sowohl antiapoptotisch als auch proapoptotisch wirken kann.

Analog zur Rolle der eNOS gibt es auch bei der PI3-Kinase nach Literaturrecherche widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PI3-Kinase an der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose beteiligt ist. Außerdem konnte gezeigt werden dass die PI3-Kinase an der Expression TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängiger Gene pro-apoptotisch beteiligt ist. Eines dieser TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängigen Gene ist TIEG1. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden dass die PI3-Kinase an der Expression von TIEG1 beteiligt ist. Es konnte bereits die apoptotische Wirkung von TIEG1 in der Hep 3B Zelllinie nachgewiesen werden (Ribeiro et al., 1999). In der Hep 3B Zelllinie erfolgte die Apoptose Induktion durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (Ribeiro et al., 1999).

Ebenso bewirkt die PI3-Kinase eine erhöhte Bindungsaktivität der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängigen Transkriptionsfaktoren AP1 und SMAD, welche für die Interaktion von pro-apoptotischen Genen verantwortlich sein könnten.

Die Ursachen der pro-apoptischen und zugleich anti-apoptischen Funktion der PI3-Kinase sind von multifaktorieller Natur. Zunächst muss man zwischen den verwendeten Zelltypen und Spezies unterscheiden. Unterschiedliche Zelltypen lassen sich nur bedingt vergleichen. Des Weiteren sollte wie bei der eNOS bereits beschrieben zwischen akuten und chronischen pathophysiologischen Prozessen unterschieden werden.

Ebenfalls ist zu klären, ob NO seine apoptotische Wirkung über die lösliche Guanylatcyclase mittels cGMP vermittelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer simulierten Ischämie NO vorübergehend nicht in der Lage, ist die lösliche Guanylatcyclase zu aktivieren und mittels cGMP Apoptose zu induzieren (Taimor et al., 1999). Ob bei adulten Kardiomyozyten unter TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation die NO-Freisetzung zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase führt, gilt es ebenfalls zu klären. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ODQ, ein Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Apoptose ventrikulärer Kardiomyozyten inhibieren kann (Heger et al., 2011). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition mit ODQ keinen Einfluss auf die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierte Phosphorylierung von SMAD2 hat (Heger et al., 2011).

## **6.5. Conclusio und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es bei adulten ventrikulären Kardiomyozyten im Rahmen der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose zu einer Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177 und zu einer ALK5-vermittelten NO-Freisetzung kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> ALK5-Rezeptor-vermittelt eine Phosphorylierung von SMAD2 bewirkt. Die Rolle der PI3-Kinase in dieser Arbeit ist als pro-apoptotisch zu betrachten. Die PI3-Kinase ist jedoch nicht an der Aktivierung der eNOS oder an einer vermehrten NO-Freisetzung beteiligt. Die PI3-Kinase bewirkt jedoch vermehrte Expression von TGF $\beta$ <sub>1</sub>-abhängigen Genen und eine vermehrte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SMAD und AP1.

Während des Übergangs einer kompensierten kardialen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz findet man im Herzen eine erhöhte TGF $\beta$ -Expression. Die hier gewonnenen Erkenntnisse helfen bei der Erforschung der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Signalkaskaden. Gerade auf dem Gebiet der non-SMAD-Signalwege und den widersprüchlichen Ergebnissen bei unterschiedlichen Zelltypen gibt es noch einiges zu klären. Ziel ist es ein möglichst detailliertes Wissen über die Signalkaskaden zu bekommen, um auf lange Sicht therapeutisch intervenieren zu können. Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse sind drauf zurückzuführen, dass zum Teil unterschiedliche Spezies verwendet werden, unterschiedliche Zelltypen benutzt werden und akute und chronische Erkrankungen untersucht werden.

Interessant wäre auch eine Differenzierung der gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich linker und rechter Ventrikel. Die beiden Ventrikel unterliegen völlig unterschiedlichen hämodynamischen Bedingungen, die zu Unterschieden bei der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induzierten Apoptose zwischen linkem und rechtem Ventrikel führen könnten.

Offen bleibt die Frage, welche Kinase die eNOS an Serin 1177 phosphoryliert. Eine PI3-Kinase vermittelte Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 via Akt (Mount et al., 2007) konnte nicht bestätigt werden.

Diese Frage gilt es in nachfolgenden Arbeiten in Kardiomyozyten zu klären.

## **7. Zusammenfassung**

Bei anhaltender Druckbelastung des Herzens kommt es zu einem Übergang von hypertrophem Wachstum zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz, die unter anderem mit einer gesteigerten TGF $\beta_1$ -Expression und Apoptose-Induktion einhergeht. In adulten Kardiomyozyten induzieren TGF $\beta_1$  sowie Stickstoffmonoxid (NO) Apoptose, die über Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie vermittelt wird. Primäres Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob NO eine kausale Bedeutung in diesem TGF $\beta_1$ -vermittelten Signalweg hat.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde ein in vitro Zellkultur-Modell mit isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Wistar Ratte verwendet.

In dieser Arbeit konnte mittels HOE-Assay und Caspase 3/7-Assay gezeigt werden, dass TGF $\beta_1$  bei adulten Kardiomyozyten via den TGF $\beta_1$ -Rezeptor ALK5 Apoptose induziert, da diese Apoptose-Induktion mit dem ALK5-Inhibitor SB431542 supprimierbar ist. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass TGF $\beta_1$  via ALK5 SMAD2 phosphoryliert und diese Phosphorylierung mit SB431542 supprimierbar ist.

Die NO-Freisetzung wurde durch einen DAF-Assay gemessen. Hierbei zeigte sich, dass TGF $\beta_1$  eine NO-Freisetzung induziert und dass diese NO-Freisetzung ALK5-Rezeptor vermittelt ist, da die NO-Freisetzung mit SB431542 supprimierbar war.

Zur Klärung der Frage, ob NO-Synthasen für die NO-Freisetzung verantwortlich sind, wurde ETU als unspezifischer Inhibitor der NOS eingesetzt. Es zeigte sich, dass NO-Synthasen für die NO-Freisetzung verantwortlich sind. Zur Differenzierung der verantwortlichen NO-Synthase wurde der iNOS-spezifische Inhibitor 1400W und der nNOS-spezifische Inhibitor TFA eingesetzt. Weder die Hemmung der iNOS noch die Hemmung der nNOS konnte die TGF $\beta_1$ -induzierte NO-Freisetzung hemmen. Somit muss die NO-Freisetzung durch TGF $\beta_1$  über die eNOS erfolgen. Mittels Immunfluoreszenz konnte eine TGF $\beta_1$ -abhängige Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta_1$  in adulten Kardiomyozyten der Ratte eine ALK5-vermittelte NO-Freisetzung induziert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden dass die PI3-Kinase nicht an der NO-Freisetzung beteiligt ist. Eine Hemmung der PI3-Kinase mit dem Inhibitor Ly294002 hat keinen Einfluss auf die TGF $\beta_1$ -induzierte und ALK5-vermittelte NO-Freisetzung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die PI3-Kinase an der TGF $\beta_1$ -induzierte Apoptose beteiligt ist. Eine Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 oder Wortmannin supprimierte die TGF $\beta_1$ -induzierte Apoptose. Dies konnte im HOE-Assay und im Caspase 3/7-Assay nachgewiesen werden. Somit ist die PI3-Kinase proapoptisch an der TGF $\beta_1$ -induzierten Apoptose beteiligt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PI3-Kinase an der Expression TGF $\beta_1$ -abhängiger pro-apoptischer Gene wie SHIP, Tiegl als auch SMAD7 beteiligt ist. Ebenso bewirkt die PI3-Kinase eine erhöhte Bindungsaktivität der TGF $\beta_1$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren AP1 und SMAD.

Als Fazit lässt sich konstatieren, dass die TGF $\beta_1$ -induzierte Apoptose eine komplexe Signalkaskade ist, in der NO ein fester TGF $\beta_1$ -induzierter und ALK5-vermittelter Bestandteil ist. Die verantwortliche NO-Synthase stellt die eNOS dar, die mittels Phosphorylierung durch TGF $\beta_1$  aktiviert wird. Die PI3-Kinase ist an dieser proapoptischen TGF $\beta_1$ -induzierten Kaskade beteiligt, hat jedoch keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung.

### 7.1. Summary

A sustained cardiac pressure load leads to transition from compensated hypertrophy to heart failure. This transition is accompanied by enhanced  $TGF\beta_1$  expression and apoptosis induction. In adult cardiomyocytes apoptosis is induced by  $TGF\beta_1$  and nitric oxide, mediated via the transcription factors of the SMAD family. Primary target of this work was to investigate whether nitric oxide is causally involved in  $TGF\beta_1$ -induced apoptosis.

To answer our questions we used an in vitro model of isolated ventricular cardiomyocytes of adult Wistar rats.

In this work it could be shown by HOE-assay and by Caspase 3/7 assay that  $TGF\beta_1$  induces in adult cardiomyocytes via ALK5 receptor apoptosis as apoptosis-induction could be blocked by the ALK5 receptor inhibitor SB431542. Further it could be confirmed that  $TGF\beta_1$  phosphorylates SMAD2 via ALK5 and this phosphorylation could be blocked by SB431542.

The nitric oxide formation was measured by DAF-Assay. In this context it could be shown, that  $TGF\beta_1$  induces nitric oxide formation and this nitric oxide formation is mediated via ALK5 receptor, because NO production was blocked by SB431542. To answer the question, if NO-synthases are responsible for the nitric oxide formation, we used the unspecific inhibitor of NO synthases ETU. It could be shown that NO synthases are the origin of nitric oxide formation. To identify the responsible NO synthase we used the iNOS-specific inhibitor 1400W and the nNOS-specific inhibitor TFA. Both inhibitors did not block NO formation under  $TGF\beta_1$ . Therefore, eNOS must be responsible for NO production. A  $TGF\beta_1$  dependent phosphorylation of eNOS at Serin 1177 could be detected by immunofluorescence. This shows that  $TGF\beta_1$  induces an ALK5-mediated nitric oxide formation in adult cardiomyocytes of rat.

Furthermore, involvement of PI3K in NO formation could be excluded, because an inhibition of PI3-Kinase via Ly294002 has no impingement on  $TGF\beta_1$ -induced and ALK5-mediated nitric oxide formation. However, it could be revealed that PI3-Kinase is involved in  $TGF\beta_1$  induced apoptosis. Inhibition of PI3-Kinase by Ly294002 or by Wortmannin inhibits  $TGF\beta_1$ -induced apoptosis. This could be shown by HOE-assay and Caspase 3/7 assay. Thus, PI3-Kinase is involved in the expression of  $TGF\beta_1$ -dependent pro-apoptotic genes like SHIP, Tieg1 and SMAD7. The PI3-Kinase also mediates an increased binding-activity of  $TGF\beta_1$ -dependent transcription factors AP1 and SMAD.

In conclusion, it can be stated, that the  $TGF\beta_1$ -induced apoptosis is a complex signaling pathway, in which nitric oxide is an  $TGF\beta_1$ -induced and ALK5-mediated integral part. The responsible NO-synthase is the eNOS, which is activated by phosphorylation upon  $TGF\beta_1$  stimulation. The PI3-Kinase is part of the pro-apoptotic pathway, but has no influence on nitric oxide formation.

## **8. Literaturverzeichnis**

### **A**

Ahlner J, Andersson RG; Torfgård K, Axelsson KL. (1991): Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev.* 43(3):351-423.

Aker S, Snabaitis AK, Konietzka I, Van De Send A, Böngler K, Avkiran M, Heusch G, Schulz R. (2004): Inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger attenuates the deterioration of ventricular Function during pacing-induced heart failure in rabbits. *Cardiovasc Res.* 63(2):273-282.

Anand IS, Florea VG. (2001): High Output Cardiac Failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 3(2):151-159.

Ashkenazi A, Dixit VM. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381):1305-1308.

Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. (2002): Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* 105(25):3011-3016.

### **B**

Baker KM, Booz GW, Dostal DE. (1992): Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 54:227-41.

Barouch IA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. (2002): Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416(6878):337-9.

Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. (1999): Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100(3):292-298.

Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. (2004): Role of myocardial neuronal nitric oxide

## Literaturverzeichnis

synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation* 110(16):2368-75.

Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K. (1999): Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 43(3):675-84.

Böhm M. (2002): Pathophysiology of heart failure today. *Herz* 27(2):75-91.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. (1994): Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368(6474):850-3.

Brahmajothi MV, Campbell DL. (1999): Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ Res.* 85(7):575-587.

Bredt DS; Snyder SH. (1990): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2):682-5.

Brown GC. (2003): NO says yes to mitochondria. *Science* 299(5608):838-9

## C

Cantley LC. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-7.

Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. (2004): Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 109(11):1359-65.

Chang K, Beak SH, Seung KB, Kim PJ, Ihm SH, Chae JS, Kim JH, Hong SJ, Choi KB. (2003): The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. *Coron Artery Dis.* 14(4):293-9.

Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, De Caestecker M, Lin K. (2004): Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell.* 15(5): 813-23.

## Literaturverzeichnis

Cohn JN, Levine TB, Francis GS, Goldsmith S. (1981): Neurohumoral control mechanisms in congestive heart failure. *Am. Heart J.* 102(2Pt2):509-14.

Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. (1999): Incidence and aetiology of heart failure – a population based study. *Eur Heart J.* 20(6):421-8.

Culotta E, Koshland DE Jr. (1992): NO news is good news. *Science* 258(5090):1862-5.

## D

DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB. (2003): SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol.* 65(3):744-52.

Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. (2003): Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J.* 17(13):1934-6.

Damy, T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. (2004): Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 363:1365-7.

deFilippi CR, Seliger SL, Maynard S, Christenson RH. (2007): Impact of renal disease on natriuretic peptide testing for diagnosing decompensated heart failure and predicting mortality. *Clin Chem.* 53(8):1511-9.

De Frutos, Sanchez de Miguel L, Farré J, Gomez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nunez A, Rico L, Lopez-Farré A. (2001): Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor-alpha and during myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 37(3):800-7.

Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. (2002): Transforming growth factor beta signal transduction. *J. Leukoc Biol.* 71(5):731-40.

Derynck R, Zhang YE. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 425(6958):577-84.



## Literaturverzeichnis

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

Dierks EA, Burstyn JN. (1996): Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox from capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol.* 51(12):1593-600.

Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. (1992): Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 85(5):1751-9.

Devaux Y, Seguin C, Grosjean S, De Talance N, Camaeti V, Burlet A, Zannad F, Meistelman C, Mertes PM, Longrois D. (2001): Lipopolysaccharide-induced increase of prostaglandin E(2) is mediated by inducible nitric oxide synthase activation of the constitutive cyclooxygenase and induction of membrane-associated prostaglandine E synthase. *J Immunol.* 167(7):3962-71.

### **E**

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

Engelman JA, Luo J, Cantley JC. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7(8):606-19.

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

### **F**

Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R. (2004): Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 147(3):516-21.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. (1996): Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 271(37):22810-4.

## Literaturverzeichnis

Fleming I, Busse R. (2003): Molecular mechanisms involved in the regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(1):R1-12.

Förstermann U; Gath I; Schwarz P; Closs EI; Kleinert H. (1995): Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution und expressional control. *Biochem Pharmacol.* 50(9):1321-32.

Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. (1993): Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J.* 14 Suppl I:10-5.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC.(2001): Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther.* 299(3):818-24.

Furchgott RF; Jothianandan D. (1991): Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28(1-3):52-61.

Furchgott RF; Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-6.

## G

Gonzales GF, Chung,FA, Miranda S, Valdez LB, Zaoborny T, Bustamante J, Boveris A. (2005): Heart mitochondrial nitric oxide synthase is up-regulated in male rats exposed to high altitude (4340 m). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(6):H2568-73.

Gorchakova O, Koch W, von Beckerath N, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. (2003): Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 clinical outcome after coronary stent placement. *Eur Heart J.* 24(9):820-7.

Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dilke P. (2002): Balancing the activation state of endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21(7):1743-53.

## H

Hammond GL, Wieben E, Markert CL. (1979): Molecular signals for initiating protein synthesis in organ hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(5):2455-9.

## Literaturverzeichnis

Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, Scammell-La Fleur T, Dixon IM. (1999): Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol.* 31(3):667-78.

Hare JM. (2003): Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 35(7):719-29.

Hare JM. (2004): Spatial confinement of isoform of cardiac nitric-oxide synthase: unravelling the complexities of nitric oxide's cardiobiology. *Lancet* 363(9418):1338-1399.

Hare JM, Stamler JS. (1999): NOS: modulator, not mediator of cardiac performance. *Nat Med.* 5(3):273-4.

Heger J, Peters SC, Pieper HM, Euler G. (2009): SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 220(2):515-23.

Heger J, Warga B, Meyering B, Abdallah Y, Schlüter K.D, Piper HM, Euler G. (2011): TGFβ receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. *J Cell Physiol.* 226(10):2683-90.

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. (2003): Progression from compensated hypertrophy to failure in pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107(7):984-91.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997): TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659):465-71.

Hogg K, Swedberg K, McMurray J. (2004): Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 43(3):317-27.

Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. (2005): Guidelines for therapy of chronic heart failure. *Z Kardiol.* 94(8):488-509.

Horinaka S, Kobayashi N, Yabe A, Asakawa H, Yagi H, Mori Y, Tsubokou Y, Yoshida K, Nakano S, Matsuoka H. (2004): Nicorandil protects against lethal ischemic ventricular arrhythmias and up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression

## Literaturverzeichnis

and sulfonylurea receptor 2 mRNA in conscious rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 18(1):13-22.

Hu S, Peterson PK, Chao CC. (1997): Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem Int.* 30(4-5):427-431.

Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. (1997): Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 47:287-96.

### I

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. (1987): Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 61(6):866-79.

Igney FH, Krammer PH. (2002): Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2(4):277-88.

### J

Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD. (2004): Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res.* 94(9):1256-62.

### K

Kanai A, Peterson J. (2004): Function and regulation of mitochondrially produced nitric oxide in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1):H11-2.

Kannel WB, Plehn JF, Cupples A. (1988): Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study. *Am Heart J* 115:869-875.

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. (2001): Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:616-675.

## Literaturverzeichnis

Kawabata M, Imamura T, Miyazano K. (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine. Growth Factor Rev.* 9(1):49-61

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239-57.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EBMO J.* 14(22):5579-88.

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

## L

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. (1990): Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322(22):1561-6.

Lin CC, Chiang LL, Lin CH, Shih CH, Liao YT, Hsu MJ, Chen BC. (2007): Transforming growth factor beta 1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways in human lung epithelial cells. *European Journal of Pharmacology* 560(2-3):101-9.

Liao X, Lui JM, Du L, Tang A, Shang Y, Wang SQ, Chen LY, Chen Q. (2006): Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *FASEB J.* 20(11):1883-5.

Linzbach AJ. (1947): Mikrometrische und histologische Analyse hypertropher menschlicher Herzen. *Virchow Arch.* 314, 534.

## M

Massagué J, Blain SW, Lo RS. (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103(2):295-309.

Massagué J. (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev Biochem.* 67:753-91.

## Literaturverzeichnis

Michel T, Feron O. (1997): Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 100(9):2146-52.

Michel T, Li GK, Busconi L (1993): Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13):6252-6.

Miethke A, Feussner M, Planitzer G, Richter H, Gutschmann M, Gossrau R. (2003): Localization of NOS-1 in the sarcolemma region of a subpopulation of atrial cardiomyocytes including myoendocrine cells and NOS-3 in vascular and endocardial endothelial cells of the rat heart. *Acta Histochem* 105(1):43-55.

Mohan RM, Heaton DA, Danson EJ, Krishnan SP, Cai S, Channon KM, Paterson DJ. (2002): Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. *Circ Res* 91(12):1089-91.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1989): The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans.* 17(4):642-4.

Moncada S. (1992): Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J Lab Clin Med.* 120(2): 187-91.

Mount PF, Kemp BE, Power DA. (2007): Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 42(2): 271-9.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. (2001): Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 114(Pt 24):4359-69.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(Pt1):263-273.

## N

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Hoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signaling. *Nature* 389(6651):631-5.

Nathan CF; Hibbs JB Jr. (1991): Role of nitric oxide synthases in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3(1):65-70.

## Literaturverzeichnis

Nathan C; Xie QW. (1994): Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78(6):915-8.

Noble JE, Bailey, Marc JA. (2009): Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 463:73-95

Norbury CJ, Kickson ID. (2001): Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:367-401.

### O

Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. (2003): PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol.* 3(4):317-30.

### P

Packer M. (1996): New concepts in the pathophysiology of heart failure: beneficial und deleterious interaction of endogenous haemodynamic and neurohormonal mechanisms. *J Intern Med.* 239(4):327-33.

Palmer RM, Moncada S. (1989): A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 158(1):348-52.

Paton JF, Kasparov S, Paterson DJ. (2002): Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci.* 25(12):626-31.

Pfaffl MW. (2010): The ongoing evolution of qPCR. *Methods* 50(4):215-6.

Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freemann GL. (2000): Beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation* 101(17):2103-9.

### R

Ratajczak P, Damy T, Heymes C, Oliviero P, Marotte F, Robidel E, Secrombe R, Boczkowski J, Rappaport L, Samuel JL. (2003): Caveolin-1 and -3 dissociations from

## Literaturverzeichnis

caveolae to cytosol in the heart during aging and after myocardial infarction in rat. *Cardiovasc Res.* 57(2):358-369.

Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ (1999): The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* 30(6):1490-7.

Rothenburger M, Stypmann J, Bruch C, Tjan T, Berendes E, Etz C, Pioux A, Löher A, Wenzelburger F, Drees G, Hoffmeier A, Breithardt G, Scheid HH. (2004): Aminoterminal pro type B natriuretic peptide as a predictive and diagnostic marker in patients with chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant.*23(10):1189-97.

## S

Saelens X, Festjens N, Van de Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P, (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16):2861-74.

Sánchez-Capelo A. (2005): Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 16(1):15-34.

Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. (2001): Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 104(11):1286-91.

Schlüter KD, Piper HM. (1992): Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 263(6 Pt2):H1739-46.

Schlüter KD, Schreiber D. (2005): Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture: *Methodes Mol. Biol* 290:305-14.

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Förstermann U, Murad F. (1992): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium* 13(6-7):427-34.

Schröder D, Heger J, Piper HM, Euler G. (2006): Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. *J Mol Med (Berl).* 84(11):975-83.



## Literaturverzeichnis

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

Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. (2005): Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* 108(3):225-56.

Schwarz P, Diem R, Dun NJ, Förstermann U. (1995): Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res* 77(4):841-848.

Sears CE, Ashley EA, Casadei B. (2004): Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1446):1021-44.

Sessa WC (1994): The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res.* 31(3):131-43.

Sherman MO, Loro ML, Wong VZ, Tashkin DP. (1991): Cytokine- and *Pneumocystis carinii*- induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J Protozool.* 38(6):234-36.

Shi Y, Massagué J. (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113(6):685-700.

Sosunov AA, Hassall CJ, Loesch A, Turmaine M, Burnstock G. (1996): Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea pig: an electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 284(1), 19-28.

Southan GJ, Szabo C, Thieme C. (1995): Isothioureas: potent inhibitors of nitric-oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br. J. Pharmacol* 111(2):510-6.

Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, Mukawa H, Kamiya H, Tomida T, Imai H, Matsui H, Hayakawa T. (2002): The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol.* 86(1):71-6.

## Literaturverzeichnis

Swynghedauw B.(1999): Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 79(1):215-62.

### T

Taimor G; Hofstaetter B; Piper HM. (2000): Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res.* 45(3):588-94.

Taimor G, Rakow A, Piper HM. (2001): Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 15(13):2518-20.

Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, Sasayama S. (2000). Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol.* 76(2-3):135-45.

Takimoto Y, Aoyama T, Tanaka K, Keyamura R, Yui Y, Sasayama S. (2002): Augmented expression of neuronal nitric oxide synthase in the atria parasympathetically decreases heart rate during acute myocardial infarction in rats. *Circulation* 105(4):490-496.

Turkstra E, Braam B, Koomans HA. (1998): Nitric oxide release as an essential mitigating step in tubuloglomerular feedback: observations during intrarenal nitric oxide clamp. *J Am Soc Nephrol.* 9(9):1596-603.

### U

Ungureanu-Langrois D, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. (1995a): Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 27(1):155-167.

Ungureanu-Langrois D, Balligand JL, Simmons WW, Okada I, Kobzik L, Lowenstein CJ, Kunkel SL, Michel T, Kelly RA, Smith TW. (1995b): Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but sufficient to decrease contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists. *Circ Res.* 77(3):494-502.

V

Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, Lebrun JJ. (2002): Activin/TGF-beta induce apoptosis through SMAD-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol.* 4(12):963-9.

Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC. (2005): Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci.* 30(4):194-204.

Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. (1999): Signalling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res.* 253(1):239-54.

Vasquez R, Farias M, Vega JL, Martin RS, Vecchiola A, Casanello P, Sobrevia L. (2007): D-glucose stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis results from activation of mitogen-activated protein kinases p42/44 and Smad2 requiring functional type II TGF-beta receptors in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol* 212(3):626-32.

Vivanco I, Sawyers CL. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501.

W

Waldmann SA; Murad F. (1987): Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 39(3):163-96.

Walshe TE, dela Paz NG, D'Amore PA. (2013): The role of shear-induced transforming growth factor- $\beta$  signaling in the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(11):2608-17.

Watanabe R, Yamada Y, Ihara Y, Someya Y, Kubota A, Kuroe A, Iwakura T, Shen ZP, Inada A, Adachi T, Ban N, Miyawaki K, Sunaga Y, Tsuda K, Seino Y. (1999): The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals. *Biochem Biophys Res Commun.* 254(3):707-12.

Wei C, Jiang S, Lust JA, Daly RC, McGregor CG. (1996): Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin Proc.* 71(4):346-50.

## Literaturverzeichnis

Weil J, Schunkert H. (2006): Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 95(4):1-15.

Westermeier R. (2011): Electrophoresis in gels. *Methods Biochem Anal.* 54:365-377.

Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismuller S, Dudek RR, Akiyama K, Reichart B. (1997): Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 96(5):1616-23.

Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC, Mitchel JB. (1996): Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul.* 34:159-87.

Wollert KC, Drexler H. (2002): Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev.* 7(4):317-25.

Wu RY, Zhang Y, Feng XH, Derynck R. (1997): Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol.* 17(5):2521-8.

Wyllie AH. (1997): Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 73(3):189-197.

## X

Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. (1996): Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res.* 79(3):381-7.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. (1999): Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(2):657-62.

Xu KY, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang, PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC. (2003): Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. *J Biol Chem.* 278(43):41798-803.

**Y**

Yang YF, Wu CC, Chen WP, Su MJ. (2009): Transforming growth factor-beta type I receptor/ALK5 contributes to doxazosin-induced apoptosis in H9C2 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 380(6):561-7.

Yi JY, Shin I, Arteaga CL. (2005): Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 280(11):10870-6

**Z**

Zanella B, Giordano E, Muscari C, Zini M, Guarnieri C. (2004): Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res Cardiol* 99(3):159-64.

Zhang YE. (2009): Non-SMAD pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19(1):128-39.

## 9. Publikationsverzeichnis

Heger J, Warga B, Abdallah Y, Meyering B, Schlüter KD, Piper KD, Euler G. (2010): TGF $\beta$  receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. *Cardiovasc Res.* 87(1).

Heger J, Meyering B, Warga B, Schlüter KD, Piper HM, Euler G. (2010): TGF $\beta$ induced NO generation results in apoptosis in adult cardiomyocytes. *Acta Physiologica.*198(677):P-TUE-16

Warga B, Heger J, Abdallah Y, Schlüter KD, Piper HM, Euler G. (2011): TGF $\beta$ -receptor mediated NO release induced apoptosis in adult cardiomyocytes of adult rat. *Acta Physiologica.* 201(682):002.

Heger, J.; Warga, B.; Meyering, B.; Abdallah, Y.; Schlüter, K.D.; Piper, H.M.; Euler, G. (2011): TGF $\beta$  receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. *J Cell Physiol.* 226(10):2683-90.

Heger J, Warga B, Schulz R, Euler G. (2014): Inhibition of PI3-kinase leads to apoptosis in TGF $\beta$ -stimulated cardiomyocytes of rat. *Acta Physiologica*; Volume 210(695).

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

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

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

## **11. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Jacqueline Heger vom Fachbereich Humanmedizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Bereitstellung meines Themas, für hervorragende Arbeitsbedingungen, sowie für eine herausragende fachliche Betreuung meiner Arbeit. Ich bedanke mich für die angenehme gemeinsame Zeit, aus der diese Arbeit hervorgeht.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gerhild Euler vom Fachbereich Humanmedizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für die angenehme Zusammenarbeit und die hervorragende fachliche Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt den technischen Angestellten für die unkomplizierte und zuverlässige Zusammenarbeit und die Einarbeitung im Labor.

Ich danke all meinen Kollegen im Physiologischen Institut für die unvergessliche Zeit.

Mein persönlicher Dank gilt besonders meinen Eltern, meinen Großeltern, meinem Bruder und meinen Freunden, die mich stets auf meinem Weg unterstützt haben.



Der Lebenslauf wurde aus der veröffentlichten Version entfernt.