

TGF- β INDUZIERTE EXPRESSION EXTRAZELLULÄRER MATRIXPROTEINE DURCH HERZMUSKELZELLEN DER ADULTEN RATTE

KIRSTEN HENNING



INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. J. Roth**

und

**dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter**

**TGF- β induzierte Expression extrazellulärer Matrixproteine
durch Herzmuskelzellen der adulten Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kirsten Henning

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 27.11.2009

Für meine Familie

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Ang II	Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cLSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop
Cy 5	Indocarbocyanin
delta C _T	Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrixproteine
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	4
1.1. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	4
1.2. Renin-Angiotensin-Aldosteron System	6
1.3. Pathophysiologie der Fibroseentstehung	7
1.4. TGF- β	8
1.5. Extrazelluläre Matrix	10
1.5.1. Kollagen	11
1.5.2. Elastin	12
1.5.3. Fibronektin	13
1.5.4. Laminin.....	13
1.5.5. Laminin-Rezeptor	14
1.6. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	15
1.6.1. Aktivierungswege der MAP-Kinasen	16
1.6.2. Inhibitoren der MAP-Kinasen	17
1.7. Aufgabenstellung	19
2. Material.....	21
2.1. Chemikalien	21
2.2. Antikörper	23
2.2.1. Primäre Antikörper	23
2.2.2. Sekundäre Antikörper.....	24
2.3. Primer	24

2.4. Inhibitoren	25
2.5. Geräte und Laborbedarf.....	25
2.5.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände	25
2.5.2. Verbrauchsmaterialien	27
2.6. Auswertung.....	27
3. Methoden	28
3.1. Isolierung von Herzmuskelzellen	28
3.1.1. Versuchstiere	28
3.1.2. Präparation der Kardiomyozyten aus der Ratte	28
3.2. Zellkultur	31
3.2.1. Vor- und Ausplattieren.....	31
3.2.2. Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten.....	33
3.2.3. Induktion und Inkubation der Kardiomyozyten	34
3.3. Gelelektrophoretische Methoden	35
3.3.1. Probenvorbereitung.....	35
3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.3.3. Western-Blot-Verfahren.....	39
3.3.4. Immunologisches Nachweisverfahren.....	42
3.3.5 Überprüfung der verwendeten Antikörper	44
3.4. Konfokale Lasermikroskopie.....	46
3.4.1. Technik.....	46
3.4.2. Immunzytochemische Färbung	48
3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
3.5.1. Probengewinnung für PCR.....	51
3.5.2. RNA-Isolierung	51
3.5.3. Bestimmung des RNA - Gehaltes.....	52
3.5.4. cDNA - Synthese.....	53

3.5.5	Quantitative PCR.....	54
3.5.6	Primeroptimierung.....	55
3.5.7	Auswertung	56
3.6.	Statistik	57
4.	Ergebnisse	58
4.1.	Einfluss von TGF- β auf die Expression extrazellulärer Matrixproteine durch adulte Kardiomyozyten	58
4.1.1.	Expression der extrazellulären Matrixproteine nach Stimulation mit TGF- β auf Proteinebene.....	58
4.1.2.	Expression der ECM nach Stimulation mit TGF- β auf Proteinebene in Abhängigkeit der Zeit	67
4.1.3.	Immunhistochemische Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse .	73
4.1.4.	Expression der ECM nach Stimulation mit TGF- β auf mRNA Ebene	79
4.2.	Nachweis der Beteiligung von mitogen aktivierten Proteinkinasen im TGF- β induzierten kardiomyozytären Signalling	85
4.2.1.	Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinasen nach Stimulation mit TGF- β	85
4.2.2.	Die Rolle der p38-MAPK und der JNK für die TGF- β induzierte Expression der untersuchten extrazellulären Matrixproteine.....	89
5.	Diskussion	96
5.1.	Hauptbefunde der Studie	97
5.2.	Beteiligung von Kardiomyozyten an der Expression von ECM nach Stimulation mit TGF- β	98
5.3.	Beteiligung von MAPK an der TGF- β induzierten ECM-Expression	102

5.4. Bedeutung der p38-MAPK und der JNK für β -adrenerge Ansprechbarkeit und Apoptose	104
5.5. TGF- β signalling abseits der MAP-Kinasen p38 und JNK.....	105
5.6. Schlussfolgerung	106
5.7. Ausblick	106
6. Zusammenfassung.....	108
7. Summary.....	110
8. Literaturverzeichnis	112
9. Veröffentlichungen.....	126
10. Erklärung.....	127
11. Danksagung.....	128

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Ang II	Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cLSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop
Cy 5	Indocarbocyanin
delta C _T	Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrixproteine
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IE	Internationale Einheiten
JNK	c-Jun-NH2 terminale Kinase
kDA	Kilo-Dalton
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT-MMP	membrane type (membranständige) Matrix Metalloproteinasen
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR®	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionenkonzentration

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen in der Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF- β	Transforming growth factor - β
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Unit

1. Einleitung

Die wichtigsten Ereignisse in der Entstehung der kardialen Herzinsuffizienz stellen ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System sowie die Aktivierung des adrenergen Systems dar. Angiotensin II trägt zur Ausbildung einer kardialen Erkrankung durch eine gesteigerte Synthese und Freisetzung von Zytokinen bei. Diese sind dann am Herzen für multiple Funktionseinschränkungen und Umbauvorgänge verantwortlich.

In diesem Zusammenhang wird in der hier vorliegenden Studie der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β) und dessen Einfluss auf Kardiomyozyten untersucht. Die Wirkung von TGF- β auf die kardialen Fibroblasten und die damit verbundene Fibroseentstehung ist hinreichend bekannt. Von besonderem Interesse ist hier nun die Wirkung von TGF- β auf Ebene der Herzmuskelzellen. Im Fokus steht die autochthone Synthese extrazellulärer Matrixproteine (ECM) durch die Kardiomyozyten selbst.

1.1. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird definiert als: *Die Unfähigkeit des Herzens, trotz ausreichenden venösen Blutangebots die Bedürfnisse des Organismus zu befriedigen* [Erdmann, E. (2003)].

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, welches durch eine Reihe von Symptomkomplexen gekennzeichnet ist. Für eine klinisch manifeste Herzinsuffizienz kommen neben dem Herzinfarkt, der Hypertonie und dem Diabetes auch Myokarditiden und Kardiomyopathien in Frage [Gurfinkel & Lernoud (2006), Kannel (2000)]. Ursachen der Herzinsuffizienz sind primär im Herzen selbst zu suchen und lassen sich pathophysiologisch als eine Änderung

der Vorlast, der Nachlast, der Kontraktilität und der Herzfrequenz zusammenfassen oder sie sind vaskulär bedingt.

Als häufigste Ursache der Herzinsuffizienz ist der Myokardinfarkt als Folge einer koronaren Herzerkrankung zu sehen. Der daraus resultierende myokardiale Zellverlust führt zu einer Funktionseinschränkung des Myokards mit anschließender Pumpfunktionsstörung.

Weitere Ursachen einer Herzinsuffizienz können in einer primären oder sekundären Kardiomyopathie begründet sein, sowie in Herzklappenerkrankungen oder kardialen Dysfunktionen infolge von entzündlichen oder toxischen Noxen.

Nach dem Myokardinfarkt ist eine Herzinsuffizienz infolge einer arteriellen Hypertonie ebenfalls eine häufig auftretende Ursache. Die arterielle Hypertonie mündet durch eine chronische Druckbelastung des linken Ventrikels in einer chronischen Linksherzinsuffizienz. Die Folge ist eine Hypertrophie und Steifigkeitszunahme des Myokards. Diese Form der Herzinsuffizienz, auch diastolische Herzinsuffizienz genannt, ist gekennzeichnet durch eine Dickenzunahme des Myokards infolge einer Anlagerung neuer kontraktile Elemente und der Größenzunahme der einzelnen Herzmuskelzelle sowie der Steifigkeit des Myokards. Die Auswurfraction ist hierbei aber nur mäßig betroffen [McKee et al. (1971)].

Die arterielle Hypertonie begünstigt auch koronare Herzerkrankungen, die sich dann ebenfalls in einer Herzinsuffizienz bemerkbar machen. Typisch für diese Form der Herzinsuffizienz, auch systolische Herzinsuffizienz genannt, ist eine deutlich verminderte Auswurfraction. Diese verminderte Auswurfraction beruht nicht ausschließlich auf einer regionalen Schädigung, sondern kann auch Ausdruck einer globalen Insuffizienz sein, welche sich in Form einer dilatativen Kardiomyopathie zeigen kann. Charakteristisch hierfür ist die Längenzunahme der einzelnen Myozyten.

Als charakteristische Merkmale der Hypertrophie sind neben der Größenzunahme der einzelnen Myozyten und einer gesteigerten Proteinsynthese, auch Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in den Ventrikeln zu nennen.

Die Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beruhen auf Kompensationsmechanismen, die den veränderten mechanischen Belastungen entgegenwirken sollen. Hierbei wird vor allem Kollagen, welches ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist, vermehrt exprimiert und trägt somit zur Fibroseentstehung im Herzen bei.

1.2. Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Angiotensin II ist die aktive Hormonkomponente des Renin-Angiotensin Systems. In vitro zeigt es sehr vielschichtige Wirkungen auf die unterschiedlichen kardialen Zellen. Adulte Kardiomyozyten zeigen nur einen moderaten Anstieg der Zellgröße und der Proteinsynthese nach Stimulation mit Angiotensin II [Fuller et al. (1990)]. Als Hauptmerkmal der Angiotensin II Stimulation adulter Kardiomyozyten ist die gesteigerte Expression von Zytokinen (TGF- β) zu nennen [Rosenkranz (2004)].

Folgen einer chronischen Stimulation von Kardiomyozyten auf Einzelzellebene mit Angiotensin II sind in einer Verschlechterung der kontraktilen Funktion [Domenighetti et al. (2005)] sowie auf Gesamtherzebene in einem verstärkten Remodelling und nachfolgender Fibroseentstehung [Zhu et al. (2003)] zu suchen. Verantwortlich hierfür ist vor allem TGF- β . Dieses Zytokin wird durch Angiotensin II vermehrt im Herzen exprimiert, vor allem dann, wenn eine kompensierte Herzinsuffizienz in eine dekomensierte Form übergeht. Dieses Phänomen konnte sowohl bei Ratten [Boluyt et al. (1995)], als auch beim Menschen [Li et al. (1997)] beobachtet werden.

1.3. Pathophysiologie der Fibroseentstehung

Die Fibrose wird definiert als Vermehrung des Bindegewebes mit krankhafter Verhärtung eines Organs (Sklerose).

Bemerkenswert ist, dass laut Wynn (2008) ca. 45% aller Todesfälle mit einer fibrotischen Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden können.

Es handelt sich bei der Erkrankung der Fibrose um eine pathologische Vermehrung des Bindegewebes, welches durch die harte, derbe Konsistenz und der dadurch nicht mehr vorhandenen Elastizität des Gewebes zu einer Funktionseinschränkung des betroffenen Organs führt.

Einer Fibrose geht eine endogene oder exogene Noxe voraus, dies kann am Beispiel der Leberzirrhose der Alkoholabusus als chronische Noxe oder auch eine virusbedingte Noxe sein. Der durch die Noxe zerstörte Gewebsverband reagiert mit einer Freisetzung lysosomaler Enzyme, welche zu einer Zytokin Freisetzung aus der extrazellulären Matrix führt, auch einwandernde Entzündungszellen setzen Wachstumsfaktoren und Zytokine frei. Dies führt zu einer Proliferation von Fibroblasten. Fibroblasten sind bewegliche Zellen des Bindegewebes mesenchymalen Ursprungs, die dann wiederum mit der Produktion von extrazellulärer Matrix beginnen. Überwiegend werden kollagene Fasern, Proteoglykane und Glykoproteine (Fibronectin und Laminin) gebildet.

Diese Neubildung extrazellulärer Matrix kann sehr produktiv sein und zu einer stärkeren Synthese führen als nötig, wodurch ein Funktionsverlust der umliegenden Zellen resultieren kann [Meurer (1999); Silbernagl & Lang (2005)].

Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β in vivo vermehrt Kollagen I und III sowie Fibronectin synthetisieren. Damit kommt TGF- β für die Regulation und die Bildung der extrazellulären Matrix eine Hauptrolle zu [Varga et al. (1987)]. Rosenranz et al. (2002) konnte an TGF- β überexprimierenden Mäusen eine signifikante Herzhypertrophie mit interstitieller Fibrose im Gegensatz zu Wildtypmäusen nachweisen.

Auch Myofibroblasten, die hauptsächlich aus lokalen Fibroblasten aber auch aus anderen Zellpopulationen (z.B. Glattmuskelzellen) nach einer Gewebeverletzung entstehen, sind zu einem bedeutenden Anteil an der Bildung von ECM beteiligt [Hinz (2007), Hinz et al. (2007)].

1.4. TGF- β

In der Pathogenese und der Entwicklung der Herzhypertrophie und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz spielen Zytokine eine wichtige Rolle. Zu ihnen gehören TGF- β , der Tumor necrosis factor α (TNF α) oder Interleukine (vor allem IL-1 β , IL-2 und IL-6) [Mehra et al. (2005)].

TGF- β ist ein stark pleiotropes Zytokin. Es lassen sich drei Isoformen in Säugetieren unterscheiden: TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 . Diese Isoformen sind sich sehr ähnlich und haben überlappende Funktionen [Border & Rouslahti (1992); Massague (1990)]. In der hier vorliegenden Studie wird TGF- β_1 verwendet, welches im Folgenden der Einfachheit halber nur als TGF- β bezeichnet wird.

TGF- β ist ein 25 kDa schweres dimeres Protein, welches aus zwei identischen über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten besteht. Diese Ketten bestehen aus je 112 Aminosäuren [Masague (1990,1998)].

TGF- β wird als inaktive Vorstufe sezerniert. Erst die aktivierte Form kann biologisch wirksam werden. Die inaktive Vorstufe ist ein Protein mit einem hohen Molekulargewicht, welches durch proteolytische Prozesse [Laiho & Keski-Oja (1989)], durch Zell-Zell-Interaktionen [Anatolli-Orlidge et al. (1988)] sowie durch eine vorübergehende Ansäuerung [Lyons et al. (1988)] aktiviert werden kann und damit biologisch aktiv wird. TGF- β kann an drei spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren (Typ I, II und III) binden. Der Typ-I-Rezeptor wird durch den Typ-II-Rezeptor nach Ankopplung des TGF- β phosphoryliert. Auf diese Weise werden die meisten biologischen Effekte von TGF- β moduliert.

Diese beiden Rezeptoren sind transmembrane Ser-Thr-Kinasen [Ebner et al. (1993)].

Dies deutet darauf hin, dass TGF- β die Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) als Signalmoleküle nutzen könnte. [Frey & Mulder (1997)].

In Abhängigkeit von der Zielzelle hat TGF- β unterschiedliche Aufgaben. Es moduliert beispielsweise Proliferation und Apoptose sowie die Aktivierung und Differenzierung der Zielzellen. Durch die Stimulierung von Fibroblasten kommt es zur Synthese der extrazellulären Matrix. TGF- β übernimmt ebenfalls eine wichtige regulatorische Aufgabe in der Gewebereparatur. Eine wichtige Rolle spielt es außerdem bei der daraus resultierenden Fibroseentstehung [Border & Noble (1998)].

Am Herzen erhöht TGF- β autokrin die Ansprechbarkeit von Herzmuskelzellen für andere hypertrophe Stimuli. Nach einer Stimulation mit TGF- β steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die β -adrenerge Stimulation einen Einfluss auf die Ausbildung einer pathologischen Herzhypertrophie und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz nimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass im adulten Rattenherz physiologisch eine geringe Expression von TGF- β und Kollagen I und III vorherrscht. Im Gegensatz hierzu steigt die Expression dieser beiden Parameter in Herzen mit Myokardinfarkt deutlich an. Dem vorausgehenden Anstieg der TGF- β Expression folgt ein Anstieg der Expression von ECM-Proteinen. Somit scheint ein erhöhter TGF- β -Spiegel einen Einfluss sowohl auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie als auch auf die Fibroseentstehung am Herzen zu nehmen [Lijnen et al. (2000)]. He et al. (2005) konnten in humanen kardialen Proben eine Korrelation zwischen erhöhten TGF- β Spiegel und Kollagen I Expression aufzeigen.

1.5. Extrazelluläre Matrix

Wurde der extrazellulären Matrix (ECM) noch vor einiger Zeit nur die Funktion einer Kittsubstanz und eines gewebeinternen Wasserspeichers zugesprochen, weiß man heute doch um die Vielfältigkeit dieser Substanz.

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem dichten Netz aus verschiedenen faserbildenden Proteinen. Zu ihnen gehören vor allem Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin welche in ein wasserreiches Gel aus Polysacchariden und Proteoglycanen eingelagert sind [Schuppan et al. (1994)]. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist spezifisch für jedes Organ und jedes Organ erhält durch sie seine strukturelle Integrität. So haben die Proteine Kollagen und Elastin ihre Aufgabe in der Strukturgebung und die Proteine Fibronectin und Laminin dienen der Zell-Matrix-Adhäsion [Wilke et al. (1995)]. Im Herzen sind für die Produktion der ECM vor allem Fibroblasten und "fibroblast-like cells" (Myofibroblasten) verantwortlich. Sie sezernieren die einzelnen Bestandteile der ECM in den extrazellulären Raum [Manabe et al. (2002), Moriguchi et al. (1999)].

Es wurde festgestellt, dass sich zwischen den Zellen der Gewebe und Organe sowie der ECM ein Fließgleichgewicht einstellt. Die extrazelluläre Matrix dient nicht nur als statisches Gerüst für Formgebung, Elastizität und Zugfestigkeit eines Gewebes und deren Verankerung an Zellen, sondern spielt auch als Zytokinreservoir in der Wundheilung, in der Signaltransduktion, Migration, Proliferation sowie im Metabolismus der Zellen eine Rolle [Garrat & Humphries (1995)].

Für Abbau- und Umbauvorgänge innerhalb der ECM sind MMPs verantwortlich. Dies sind zinkhaltige Enzyme, die hauptsächlich in einer inaktiven Vorstufe vorliegen. Produziert werden die MMPs hauptsächlich durch Entzündungszellen, vor allem durch einwandernde Makrophagen, in geringerem Maß auch von Kardiomyozyten [Heenemann et al. (2003); Coker et al. (1998)]. Aktiviert werden die MMPs durch pathologische Ereignisse, am Herzen beispielsweise durch eine Ischämie des Myokards im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung.

Die Matrix Metalloproteinasen können zum einen als membranständige Enzyme (MT-MMP), deren reaktiver Teil in den extrazellulären Raum hineinragt, vorliegen oder sie können zum anderen auch direkt in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden [Li et al. (2000)].

Die Gegenspieler der MMPs sind die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMP). Das sind Proteine, welche die Aktivität der MMPs hemmen. Auf diese Weise ist es möglich, die Abbau- und Umbauprozesse der ECM durch die MMPs zu modulieren [Heenemann et al. (2003)]. Ein weiterer Kontrollmechanismus über die MMPs liegt in der Kontrolle der Transkriptionsaktivität des jeweiligen Genabschnitts, um eine nicht angemessene Transkription zu verhindern [Dollery et al. (1995)].

Die Proteoglykane der extrazellulären Matrix sind in der Lage, andere Proteine und Botenstoffe wie beispielsweise TGF- β und TIMP zu binden und nehmen auf diese Weise ebenfalls Einfluss an Aufbau-, Abbau- und Umbauvorgänge der jeweiligen ECM.

1.5.1. Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix, welches im Körper den mengenmäßig größten Anteil der Proteine einnimmt.

Es werden 28 verschiedene Kollagentypen unterschieden (Typ I bis XXVIII). Charakteristisch für Kollagene ist ihr Aufbau. Kollagen bildet helikale Strukturen aus, das sogenannte Tropokollagen. Es besteht aus drei Polypeptidketten. Diese drei linksgängigen einsträngigen Helices winden sich umeinander. Bei der Windung umeinander entsteht die den Windungen der Einzelhelices entgegengesetzte rechtsgängige Tripel- oder auch Superhelix. Die zur Stabilisation ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen liegen zwischen den Helixsträngen. Je nach Kollagentyp bestehen diese Helices aus 600-3000 Aminosäuren. Der Hauptanteil der Aminosäurezusammensetzung besteht aus Glycin gefolgt von Prolin, Hydroxyprolin und Alanin. Die Anordnung der Aminosäuren folgt dieser Formel: Gly-x-Pro; dabei kann x jede beliebige

Aminosäure sein. Kollagen besitzt aufgrund seiner Struktur eine extrem hohe Zugfestigkeit, ist aber nicht dehnbar [Breitmaier & Jung (2005)].

Die Hauptaufgabe des Kollagens, bedingt durch seine hohe Stabilität und geringe Elastizität, besteht in der Stützfunktion. Darüber hinaus hat Kollagen aber noch vielfältige andere Funktionen zu erfüllen. Es ist mitverantwortlich für Zellhaftung und -differenzierung und wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und Fibrozyten [Hay (1983)].

Im adulten Herz konnten fünf verschiedene Kollagentypen identifiziert werden. Es sind dies Kollagen I, III, IV, V, VI [Speiser et al. (1991)].

Da Kollagen I am häufigsten im Organismus vorkommt, wurde es stellvertretend in der vorliegenden Studie untersucht. Kollagen I besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette. Die Kollagensynthese im Herzen ist abhängig von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , IGF (Insulin-like Growth Factor) und FGF-2 (Fibroblast Growth Factor). Angiotensin II und Aldosteron sind weitere Hormone, die auf die Bildung von Kollagen Einfluss nehmen können. Sie bewirken eine Steigerung der Kollagen I- und III-Synthese und führen letztlich zu einer Fibroseentstehung im Myokard. Angiotensin II kann direkt über eigene Rezeptoren die Kollagensynthese steigern oder indirekt über die Aktivierung des TGF- β wirken [Robert et al. (1999), Silvestre et al. (1999)].

1.5.2. Elastin

Elastin ähnelt in seinem Aufbau dem Kollagen. Es variiert jedoch in der Zusammensetzung der Aminosäuren. Bei Elastin findet man kein Hydroxylysin und nur wenig Hydroxyprolin. Die Aminosäuren aus denen sich das Tropoelastin zusammensetzt, sind: Glycin, Valin, Alanin, wenig Prolin und vor allem Lysin. Die Anordnung der Aminosäuren folgt dieser Formel: Gly-x-y. Häufig finden sich auch die Sequenzen Gly-Val-Pro-Gly und Val-Pro-Gly-Gly, hier wird ein Zusammenhang mit der Elastizität des Elastins vermutet [Volpin et al. (1976)].

Zwischen dem Tropoelastin bilden sich über Lysinreste kovalente Bindungen aus. Verbinden sich vier Lysinreste verschiedener Ketten, entsteht das Desmosin oder seine Isoform Isodesmosin. Sie sind auch für die Gelbfärbung des Elastins verantwortlich. Im Gegensatz zu Kollagen ist Elastin elastisch dehnbar, es kann bis zu 130% seiner Ausgangslänge gedehnt werden [Heine (1991)].

1.5.3. Fibronectin

Fibronectin ist ein heterodimeres Glykoprotein, es besteht aus zwei gleichen Ketten. Diese sind über Disulfidbrücken (S-S) miteinander verbunden und 5- bis 6-mal linear gefaltet.

Fibronectin existiert in zwei Formen, einer löslichen und einer unlöslichen Form. Die lösliche Form wird von Hepatozyten gebildet, die unlösliche Form wird überwiegend von Fibroblasten gebildet und ist Bestandteil der Basalmembran sowie der extrazellulären Matrix [Schwarzbauer (1991)]. Innerhalb der extrazellulären Matrix bewirkt es die Ausbildung eines Netzwerks aufgrund der Anwesenheit von Bindungsstellen für andere Komponenten der extrazellulären Matrix. Aber nicht nur dort hat Fibronectin seine Aufgaben, auch in der Blutgerinnung, Thrombenbildung, Wundheilung und Antigeneliminierung spielt Fibronectin eine Rolle [Haynes (1986)].

1.5.4. Laminin

Laminin ist ein heterotrimeres Glykoprotein und besteht aus drei Ketten einer α -Kette, einer β -Kette und einer γ -Kette. Diese Ketten sind spiralförmig umeinander verdreht. Es sind verschiedene α -, β - und γ -Ketten bekannt, je nach Kombination dieser Ketten lassen sich fünfzehn Lamininisoformen unterscheiden.

Laminin ist ebenfalls ein Bestandteil der Basalmembran der Kardiomyozyte und besitzt Bindungsstellen für Kollagen IV, Proteoglykane und Oberflächenrezeptoren. Damit scheint Laminin mitverantwortlich für eine Reihe von Zell-Basalmembran-Interaktionen zu sein, wie z.B. Adhäsion, Migration sowie Proliferation [Tryggvason (1993)].

1.5.5. Laminin-Rezeptor

Die direkte Umgebung von Kardiomyozyten nimmt wesentlichen Einfluss auf deren funktionellen Status. Die extrazelluläre Matrix kann sowohl über Integrin-Rezeptoren [Kim et al. (2003)] als auch über sogenannte Non-Integrin-Rezeptoren [Simon & McDonald (1990)] das intrazelluläre Signalling modulieren. Ein prominenter Non-Integrin-Rezeptor ist der 37/67 Laminin-Rezeptor. Tomy et al. (1994) konnte seine Expression im Herzen nachweisen, und Gloe & Pohl (2002) zeigten seine Bedeutung in der Mechanosensitivierung von Endothelzellen.

1.6. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind wichtige Signalmoleküle, welche in einer Reihe von verschiedenen zellphysiologischen Prozessen adulter Kardiomyozyten involviert sind. Zu ihren Aufgaben gehören die Übermittlung der Signale für Differenzierung, Apoptose und Proliferation von Zellen.

In die Familie der MAP-Kinasen gehören die:

- p38MAP Kinase
- Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), auch p42/44 MAP-Kinase genannt
- c-Jun-NH2 terminale Kinase (JNK)

Es konnte gezeigt werden, dass an der adrenerg-vermittelten Hypertrophie eine Beteiligung der ERK vorliegt [Shih et al. (2001)]. Im Apoptosegeschehen von Kardiomyozyten ist die JNK beteiligt [Taimor et al. (1999)]. Neben vielen anderen Signalmolekülen ist die p38MAP-Kinase an der Angiotensin II-induzierten Zytokinexpression beteiligt [Wenzel et al. (2001)].

Bei der Herzmuskelhypertrophie konnte die Aktivierung aller drei MAP-Kinasen beobachtet werden [Markou & Lazou (2002)].

1.6.1. Aktivierungswege der MAP-Kinasen

Es gibt unterschiedliche Auslöser, die zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen führen, dazu zählen verschiedene Wachstumsfaktoren, Mitogene, Stress und Zytokine. Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der MAP-Kinasen verläuft über eine Stimulierung der den MAP-Kinasen vorgeschalteten Enzyme. Diese Enzyme stellen wiederum Kinasen dar und sind spezifisch für jede der MAP-Kinasen. Der Ablauf dieser Signalkaskade ist streng hierarchisch geordnet [Marshall (1995)].

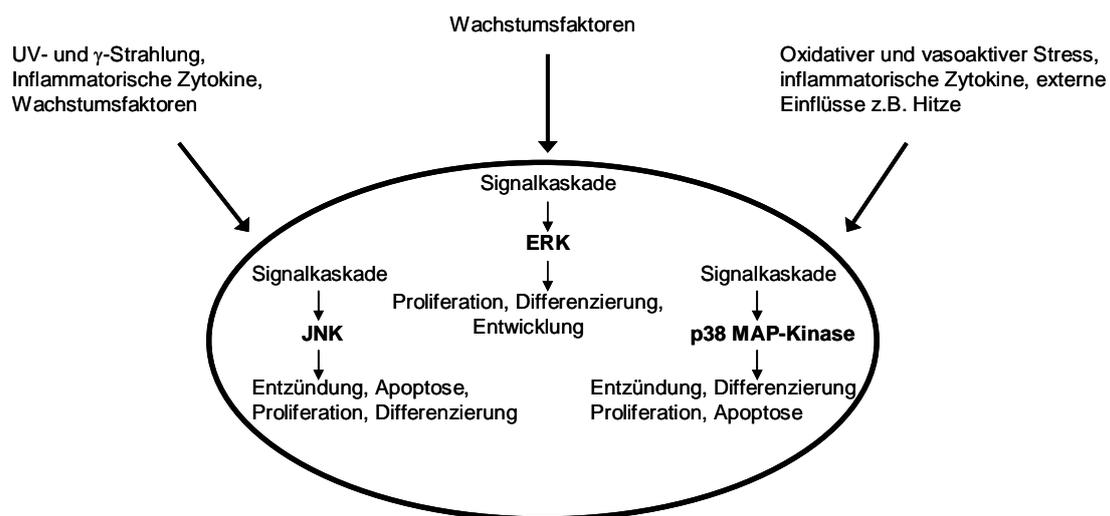


Abb. 1.6.1.1. Aktivierungskaskade der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38

1.6.2. Inhibitoren der MAP-Kinasen

Inhibitoren sind chemisch gesehen Stoffe, die in der Lage sind, bestimmte chemische oder enzymatische Reaktionen zu unterdrücken oder einzuschränken.

Alle drei MAP-Kinasen können mittels eines spezifischen pharmakologischen Inhibitors in ihrer Aktivität gehemmt werden. Der Einsatz dieser spezifischen Hemmstoffe ermöglicht es, die entsprechende Kinase in ihrer enzymatischen Aktivität zu inhibieren. Auf diese Weise ist es möglich herauszufinden, in welchen Signalwegen die MAP-Kinasen involviert sind.

1.6.2.1. JNK Inhibitor - SP 600125

SP 600125 ist ein zellpermeabler und reversibler Inhibitor, der sich kompetitiv zu ATP verhält. Er inhibiert selektiv die Phosphorylierung der c-Jun.

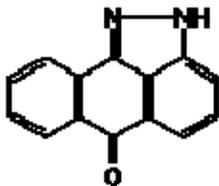


Abb: 1.6.2.1.1.

zeigt die Struktur- und Summenformel des JNK Inhibitors SP 600125
Abbildung aus der Dissertationsarbeit Maïke Schmelter (2007) entnommen.

1.6.2.2. p38MAP-Kinase Inhibitor - SB 202190

SB 202190 ist ein zellpermeabler Inhibitor der p38MAP-Kinase. Er blockiert die p38MAP-Kinase Phosphorylierung der myelin basic Proteine (MBP).

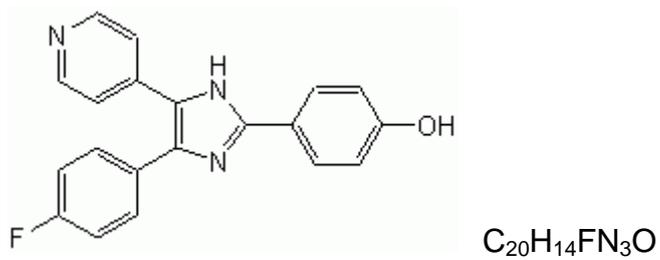


Abb: 1.6.2.2.1.

zeigt die Struktur- und Summenformel des p38MAP Kinase Inhibitors SB 202190. Abbildung aus der Dissertationsarbeit Maïke Schmelter (2007) entnommen.

1.7. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie wird der Einfluss von TGF- β auf Kardiomyozyten adulter normotensiver Ratten untersucht.

Die Abbildung 1.7.1. führt die TGF- β induzierten Mechanismen in adulten ventrikulären Kardiomyozyten auf. Sie gibt einen Überblick über die theoretisch möglichen Mechanismen. Der Einfluss auf Apoptose [Schröder et al. (2006)] und auf die Modulierung der hypertrophen Ansprechbarkeit einer beta-adrenergen Stimulation [Wenzel et al. (2001)] sind hinreichend bekannt.

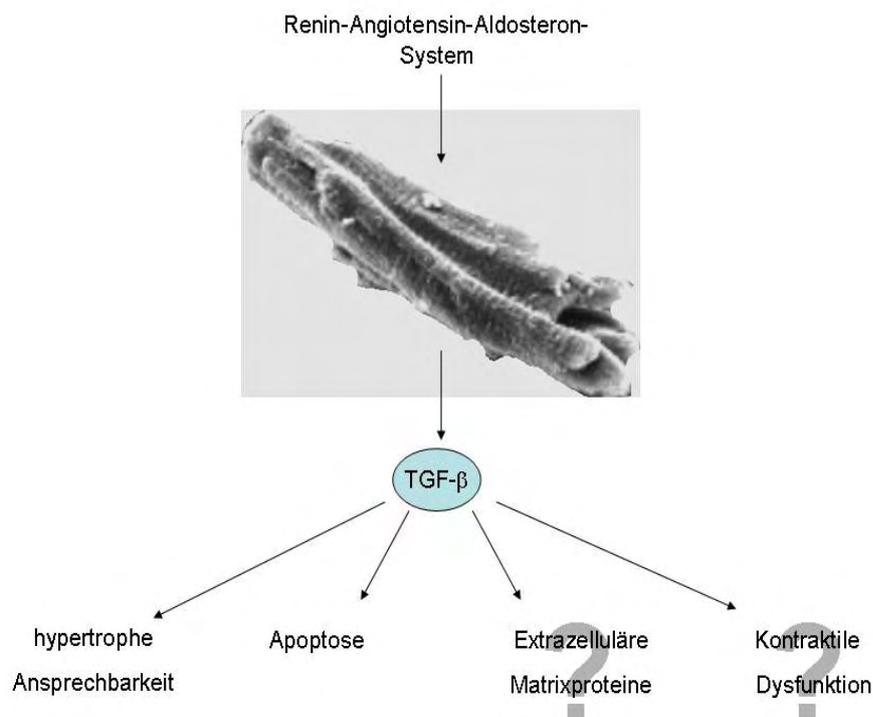


Abb. 1.7.1. mögliche und tatsächliche Mechanismen in isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten

TGF- β induzierte Mechanismen in adulten isolierten Kardiomyozyten, sowie fragliche Mechanismen (mit einem Fragezeichen unterlegt), die in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Schlüter geklärt werden sollen. In der vorliegenden Studie ist der Einfluss von TGF- β auf adulte Kardiomyozyten im Hinblick auf die Expression von Extrazellulären Matrixproteinen von besonderem Interesse.

Bei der hier vorliegenden Arbeit stehen dabei folgende Fragen im Mittelpunkt des Interesses:

- Sind Kardiomyozyten nach Stimulation mit TGF- β in der Lage, autochthon extrazelluläre Matrixproteine zu exprimieren? Hier wird im Einzelnen besonderes Augenmerk auf Kollagen I, Elastin, Fibronectin und Laminin gerichtet.
- Wie stellt sich der zeitliche Verlauf der ECM-Expression nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β dar?
- Kann eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der TGF- β induzierten Steigerung von ECM Proteinen in Kardiomyozyten gezeigt werden?

2. Material

2.1. Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin	Sigma, Taufkirchen
APS	Serva, Heidelberg
BCIP	Applichem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethyläther	Roth, Karlsruhe
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe

Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase; Typ CLSII	Biochrom, Berlin
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Medium 199/Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Roth, Karlsruhe
M-MLV-RT	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	Rainbow, Amersham Biosciences, Freiburg
NBT	Applichem, Darmstadt
Oligo-dT	Roche, Mannheim
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-sin	Promega, Mannheim
5x RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
SYBR [®] Green Supermix	BioRad, München
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Temed	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
TriFast [®] Reagenz	PEQLAB, Erlangen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Vanadat	Merck, Darmstadt

2.2. Antikörper

2.2.1. Primäre Antikörper

Anti-Collagen, Type I, Fetal Mouse Skin Elastin (A-19)	Calbiochem, Schwalbach i.T. Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg
Fibronectin (H-300)	Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg
Anti-Laminin (L9393)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Laminin-R (H-141)	Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg
Anti-Actin	Sigma, Taufkirchen
JNK 1 (FL)	Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg
Phospho-SAPK/JNK (G9)	Cell Signaling Technology®, Frankfurt a.M.
Anti-p38MAPK	Sigma, Taufkirchen
Anti-phospho-p38MAPK	Sigma, Taufkirchen
ERK 2 (E-14)	Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg
p-ERK (E-4)	Santa Cruz Biotechnology,INC., Heidelberg

2.2.2. Sekundäre Antikörper

Donkey anti-goat IgG-AP	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg
Goat anti rabbit IgG	Millipore, Eschborn
anti-Mouse-IgG	Sigma, Taufkirchen
anti-Rabbit-IgG	Sigma, Taufkirchen
FITC/Cy2 donkey anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, INC., Heidelberg
Cy 5 goat anti-rabbit	Dianova, Hamburg

2.3. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen GmbH bezogen.

Kollagen 1	forward	5`-GCG AAC AAG GTG ACA GAG-3`
	reverse	5`-CCA GGA GAA CCA GCA GAG-3`
Elastin	forward	5`-TGC TAC TGC TTG GTG GAG AAT G-3`
	reverse	5`-CGT GGC TGC TGC TGT CTG-3`
Fibronectin	forward	5`-TGG AGC AAG AAG GAC AAC-3`
	reverse	5`-CGG ACA TCT GTG AAG GAG-3`
Laminin	forward	5`-CGA GGA TGT CAG CGT TGT C-3`
	reverse	5`-TCA CAG CCG TCT CCA GTC-3`
Laminin-Rezeptor	forward	5`-CCT GGG ACC TTC ACT AAC CA-3`
	reverse	5`-CTT GTT GTT GCA TGG AAT GG-3`

2.4. Inhibitoren

JNK Inhibitor II (SP600125)	Calbiochem, Schwalbach i.T.
SB 202190	Calbiochem, Schwalbach i.T.

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem (Schwalbach i.T.), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.5. Geräte und Laborbedarf

2.5.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.5.1.1. Zellkultur

Bauchdeckenschere (gebogen)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere groß	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere klein	Aesculap, Tuttlingen
Kapselpinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Giessen
Tissue Chopper	Bachofer, Reutlingen

Nylonnetz (Polyamid 200µm)	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge (Megafuge 2.0)	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Kulturschalen, Typ Falcon 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Einweg-Zellschaber, Typ: Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg

2.5.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Netzgerät	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophorese-Kammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Hamiltonspritze	Hamilton, Bonaduz Schweiz
Immobilon P	Millipore, Eschborn
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen

2.5.1.3. PCR

Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
Photometer	GE Amersham, Freiburg
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
iCycler	BioRad, München

2.5.1.4. Sonstige Geräte

Brutschrank, Typ: Cytoperm	Heraeus, Hanau
Digitale Analysewaage	Mettler Toledo, Gießen
Glasgeräte	Schott, Mainz

Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Heizblock	IKA, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra, Göttingen
Mischer	Heidolph, Kelheim
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.5.2. Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röhrchen, Typ Falcon 2070	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen

2.6. Auswertung

Flachbettscanner, Typ: Scan jet 4c	Hewlett Packard, Eschborn
Software: Image-Quant®	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft® Excel	
iCycler iQ Software	BioRad, München

3. Methoden

3.1. Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Kardiomyozyten aus adulten männlichen Wistar-Ratten isoliert. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Lebendgewicht dieser Tiere ca. 300-400g. Die Ratten stammen aus der eigenen Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Der freie Zugang zu Trinkwasser und Nahrung (Standardfuttermittel: Altromin[®]) war zu jeder Zeit gewährleistet.

3.1.2. Präparation der Kardiomyozyten aus der Ratte

Frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten bilden die Grundlage der Versuche. Die Methode der Zellisolation wurde von Piper et al. (1982) entwickelt und wird im Folgenden beschrieben.

Zu Beginn der Präparation wird die Langendorff-Perfusionsanlage vorbereitet. Dazu wird der für die Perfusion vorhandene Kreislauf erst mit aqua bidest dann mit Powell-Medium gespült. Anschließend wird die Anlage mit 80 ml Powell-Medium befüllt, welches blasenfrei zirkulieren muss und für die Dauer der Zellisolation mit Carbogen begast wird. Weist sowohl das zirkulierende Wasser in den Glasmänteln als auch das Powell-Medium eine Temperatur von 37°C auf, kann mit der Isolierung begonnen werden.

Powell-Medium

NaCl	110 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Mg ₂ SO ₄	1,2 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
Glucose	11 mmol/l

Die Ratten werden nach kurzer Narkose mit Diethylether, durch Brechen des Genicks schmerzfrei getötet. Nach der Eröffnung des Thorax wird der Brustraum mit 4° C kalter physiologischer Kochsalzlösung geflutet und die Brustorgane herausgelöst. Sie werden in eine mit 4° C kalter physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Petrischale überführt. Durch Schwenken der Organe in der Flüssigkeit werden sie von Blut und Geweberesten befreit, anschließend wird das Herz von noch anhängendem Mediastinalgewebe, den Lungenlappen, sowie der Trachea und dem Ösophagus befreit und die Aorta freipräpariert.

Über die Aorta wird das Herz durch eine Perfusionskanüle an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/s werden jeweils zwei Herzen mit 40 ml Powell-Medium gespült. Nach Zugabe von 10 ml Collagenase-Stammlösung wird das System geschlossen. Anschließend wird es mit 50 ml Perfusionslösung rezirkulierend für 25 min perfundiert. Dabei wird eine Flussrate von ca. 2-3 ml/min und Herz gewählt.

Collagenase-Stammlösung

Collagenase	x mg (chargenabhängig)
CaCl ₂ (100mmol/l)	12,5 µl
Powell-Medium	10 ml

Nach der Reperfusion werden die Vorhöfe und die Aorta abgetrennt. Die Ventrikel werden in Stücke geschnitten und anschließend je zweimal quer und längs mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert.

Anschließend wird der Gewebeprei mit 30 ml der Perfusionslösung in einem Teflongefäß nachverdaut. Während des zehnmütigen Nachverdaus, welcher unter kontinuierlicher Carbogenbegasung stattfindet, wird zur besseren Vereinzelung der Herzmuskelzellen aus dem Gewebeverband der Gewebeprei mit einer 5 ml Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert.

Zur weiteren Behandlung wird die Zellsuspension durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 μm filtriert und anschließend für 3 min bei 400 U/min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren werden Zelltrümmer und die Collagenase-Lösung von dem Zellpellet, welches durch die intakten Zellen gebildet wird, getrennt. Das Zellpellet wird anschließend in 10 ml Powell-Medium mit einem CaCl_2 -Anteil von 200 $\mu\text{mol/l}$ aufgenommen und nochmals für 2 min bei 400 U/min zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Zellpellet wird nochmals in Powell-Medium aufgenommen, welches diesmal einen CaCl_2 -Anteil von 400 $\mu\text{mol/l}$ hat, und dann zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wird auf Reagenzgläser, deren Anzahl auf die Zahl der präparierten Herzen abgestimmt ist und die mit Powellmedium, welches 1 mmol/l CaCl_2 enthält, gefüllt sind, verteilt. Die Reagenzgläser werden für eine Minute bei 300 U/min zentrifugiert. Durch dieses Protokoll erhält man eine Zellpopulation, die zu ca. 60 - 80% aus intakten, kalziumtoleranten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten besteht.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Vor- und Ausplattieren

Die im Folgenden genannten Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Um das Anheften der Kardiomyozyten auf den Böden der Kulturschalen zu gewährleisten, werden diese für wenigstens vier Stunden mit Vorinkubationsmedium, im Brutschrank bei 37°C, beschichtet. Kurz vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten wird dieses Medium wieder abgesaugt.

M199/HEPES gepuffert

Medium 199/Earl`s Salts	9,8 g/l
HEPES	15mmol/l

Auf pH 7.4 titriert und sterilfiltriert

Vorinkubationsmedium

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

Die bei der Präparation gewonnenen Zellen eines Herzens werden vorsichtig in 37°C erwärmtem CCT-Kulturmedium (ca. 25ml) zu einer homogenen Suspension aufgenommen. Diese Suspension wird gleichmäßig auf die vorbereiteten Kulturschalen mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2

ausplattiert. Zum Anheften der intakten Zellen werden sie in CO₂-freier Atmosphäre für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen, dabei werden abgestorbene und nicht angeheftete Zellen entfernt. Die so behandelte Zellkultur besteht nun zu ca. 90% aus intakten stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

CCT-Kulturmedium

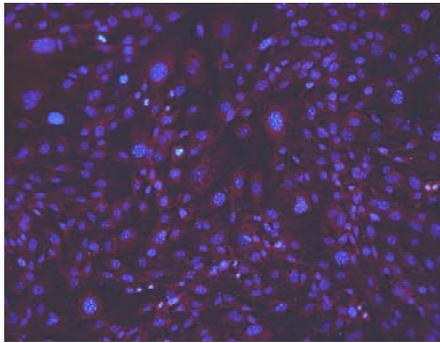
M199/HEPES gepuffert	x ml
Kreatin	5 mmol/l
Karnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µmol/l
Auf pH 7.4 titriert und sterilfiltriert	

Der Einsatz des Cytosin-β-Arabinofuranosid im CCT-Medium dient der Prävention von Zellwachstum nichtmyozytärer Genese sowie der Zellteilung.

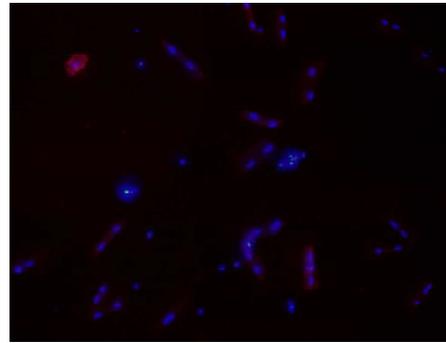
Um zu gewährleisten, dass die Kardiomyozytenkulturen nicht mit Fibroblasten kontaminiert sind, wurden die nach dem oben beschriebenen Protokoll gewonnenen Kardiomyozyten zur Kontrolle mit Vimentin gefärbt. Vimentin ist ein Zellmarker für Zellen mesenchymalen Ursprungs (z.B. Fibroblasten). In neonatalen Kardiomyozyten ist die Expression noch nachweisbar, adulte Kardiomyozyten hingegen zeigen keine Expression von Vimentin mehr.

Zur Färbung wurden die isolierten adulten Kardiomyozyten mit einem Erstantikörper gegen Vimentin inkubiert. Der zweite Antikörper ist an Cy3 gekoppelt, so dass sich Vimentin im Fluoreszenzmikroskop rot darstellt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich keine Fibroblasten oder

Fibroblasten- ähnliche Strukturen nach 24-stündiger Inkubation der Zellen in der Kultur nachweisen lassen. Siehe Abbildung 3.2.1.1.



Fibroblasten (24 h)



Kardiomyozyten (24 h)

Abb.3.2.1.1. Vimentin Färbung

Um Fibroblasten in adulten isolierten Myozytenkulturen zu identifizieren wurden diese mit Vimentin gefärbt. Nach 24-stündiger Zellkultur lassen sich in der Kardiomyozytenkultur (re Bild) keine Fibroblasten erkennen. Zur Positiv-Kontrolle wurde eine reine Fibroblastenkultur (li Bild) zusätzlich gefärbt. Als Negativ-Kontrolle diente eine Zellkultur, die nur mit dem Zweitantikörper (cy3 anti-mouse) gefärbt wurde (kein Bild). Die Bilder wurden nach 24 Stunden Zellkultur mit einer Wellenlänge von 555/570nm aufgenommen.

3.2.2. Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten

In meiner Studie werden frisch isolierte Kardiomyozyten verwendet. Nach einer Anheftungszeit im Brutschrank von ca. zwei Stunden werden die Zellen zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Je nach Versuchsprotokoll werden die Zellen unterschiedlich induziert und für verschiedene Zeiten, jedoch nicht mehr als 48 h, bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3. Induktion und Inkubation der Kardiomyozyten

Zum Nachweis der Expression von ECM-Proteinen durch die Kardiomyozyten werden diese mit TGF- β in den Konzentrationen 1 und 10 ng/ml stimuliert.

Zur pharmakologischen Hemmung der JNK und p38MAP-Kinase werden die Kardiomyozyten ca. 20 min mit dem jeweiligen Inhibitor der MAP-Kinasen vorinkubiert, bevor diese mit TGF- β in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert werden.

3.3. Gelelektrophoretische Methoden

3.3.1. Probenvorbereitung

In der Gelelektrophorese können Proteine, nach entsprechender Behandlung, ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Das Waschmedium wird von den am Boden der Kulturschälchen angehefteten Kardiomyozyten abgesaugt. Im Anschluss daran wird den Schalen 150 µl Typ Falcon 3001 bzw. 250 µl Typ Falcon 3004 Lysispuffer zugegeben. Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Zugabe von Benzonase in einer Endkonzentration von 50 U/ml bleiben die Schalen für weitere 10 min auf dem Schüttler. Anschließend werden die aufgelösten Zellen abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Sie werden mit 25 µl (Falcon 3001) bzw. 30 µl (Falcon 3004) Auftragspuffer versetzt und für 10 min im Inkubator bei 65°C erhitzt.

Die Denaturierung der Proben erfolgt durch das im Lysispuffer enthaltene SDS, welches zusammen mit der Erwärmung die Tertiär- und Sekundärstruktur auflöst und zu einer Streckung der Moleküle führt. Das Mercaptopropandiol bewirkt eine Aufspaltung der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen. Die Nucleinsäuren werden durch die Zugabe der Benzonase verdaut. Das Natriumvanadat hemmt die Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

Lysispuffer

Tris/HCL	50mmol/l
SDS	2% (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2% (wt/vol)
Natriumvanadat	1mmol/l
pH 6.7	

Auftragspuffer

Glyzerin	10% (vol/vol)
Aqua bidest	90%(vol/vol)
Bromphenolblau	0,1% (wt/vol)

3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) liegt das diskontinuierliche System nach Laemmli zugrunde. Sie dient der Auftrennung des Gesamtproteinextrakts der Kardiomyozyten nach der Größe der einzelnen Proteine [Laemmli (1970)].

Zum Gießen eines Polyacrylamidgels benötigt man zwei Glasplatten, welche sauber und entfettet sein müssen. Diese werden durch zwei Abstandhalter, sogenannte Spacer mit einer Dicke von 1mm, übereinander gelegt. Die Spacer werden seitlich an den Glasplattenrand platziert. Die Glasplatten, mit den dazwischen liegenden Spacern, werden aufrecht stehend in einen Ständer gespannt. Anschließend wird das Trenngel bis auf etwa $\frac{2}{3}$ der Höhe der Glasplatten eingefüllt. Damit das Trenngel unter Luftabschluss auspolymerisieren kann wird es mit Aqua bidest überschichtet und über Nacht stehengelassen.

Nach dem Dekantieren des Wassers wird auf das Trenngel das Sammelgel gefüllt. Gleich im Anschluss wird ein Profilformer in das Sammelgel eingesetzt, welcher Taschen zum Einfüllen der Proben formt. Nach etwa 30 min ist das Sammelgel polymerisiert. Nach dem Herausnehmen der Profilformer ist das Gel bereit.

Durch die unter Punkt 3.3.1. beschriebene Behandlung der Proben mit SDS wurden die Proteine denaturiert und mit einer negativen Ladung versehen. Deshalb können die Proteine beim Anlegen einer Spannung in Richtung der

positiv geladenen Anode wandern und sich entsprechend ihrer jeweiligen Größe in der Gelmatrix auftrennen. Durch das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid lässt sich die Größe der Gitterstruktur dieser Gelmatrix beeinflussen.

Aufgrund der unterschiedlichen Größe der ECM-Proteine sowie der MAP-Kinasen wurden unterschiedlich konzentrierte Trenngele verwendet.

Die Mengenangaben für das Trenngel und für das Sammelgel gelten für das Gießen eines Gels.

Trenngel

	<u>7,5%</u>	<u>12,5%</u>
AA/BA (30:1)	5,25 ml	8,75 ml
Trenngelpuffer	4,75 ml	4,75 ml
Aqua bidest	9,55 ml	6ml
APS 10% (wt/vol)	200 µl	200 µl
TEMED	15 µl	15 µl
SDS 10% (wt/vol)	200 µl	200 µl

Trenngelpuffer

Tris/HCL	1,5 mol/l
pH 8,6	

Sammelgel

AA/BA	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest	6,4 ml
APS 10% (wt/vol)	100 µl
TEMED	12 µl
SDS 10% (wt/vol)	50 µl

Sammelgelpuffer

Tris/HCL	0,5 mol/l
pH 6,8	

Die durch den Profilformer freigehaltenen Taschen werden mit 30 µl Probenmaterial beladen. Zur Molekulargewichtsbestimmung der zu untersuchenden Proteine wird ein Molekulargewichtsmarker zwischen 10- und 250 kDa mit aufgetragen.

Die Glasplatten werden in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wird eine Spannung von ca. 200 V angelegt. Die Dauer der Elektrophorese beträgt zwischen zwei und fünf Stunden je nach Größe der untersuchten Proteine und sie findet bei Raumtemperatur statt.

Laufpuffer

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

3.3.3. Western-Blot-Verfahren

Im Western-Blot-Verfahren werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine des SDS-Gels auf eine Trägermembran transferiert. Dieses Verfahren nennt man Semidry-Blotting und es wurde das erste Mal von Kyhse-Andersen (1984) beschrieben.

Dazu wird das Polyacrylamidgel auf die ImmobilonP Membran gelegt und zwischen zwei Elektrodenplatten positioniert. Die im Polyacrylamidgel befindlichen negativ geladenen Proteine werden durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel in Richtung Membran bewegt, wo sie von dem Trägermaterial gebunden werden. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. In diesem Schritt wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, so dass sie in der Lage sind, sich zu renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einzunehmen. Das ist wichtig, damit sie bei der folgenden Inkubation mit Antikörpern von diesen wieder erkannt werden.

Zum Western-Blotting wird ein in konzentriertem Anodenpuffer getränktes Filterpapier auf die Anode gelegt. Darauf eines, welches in Anodenpuffer befeuchtet wird. Die Membran wird kurz in 100 %igem Methanol benetzt und anschließend für ca. 3 min im Anodenpuffer belassen. Daraufhin werden sie auf die feuchten Filterpapiere in die Blotkammer gelegt. Die Gele werden nun vorsichtig und möglichst blasenfrei auf die Membranen aufgebracht. Ein weiteres Filterpapier, welches zuvor mit Kathodenpuffer getränkt wurde, wird auf das Gel gelegt. Anschließend wird die Kathode aufgesetzt.

Dieser Aufbau ist in Abb.3.3.3.1 dargestellt.

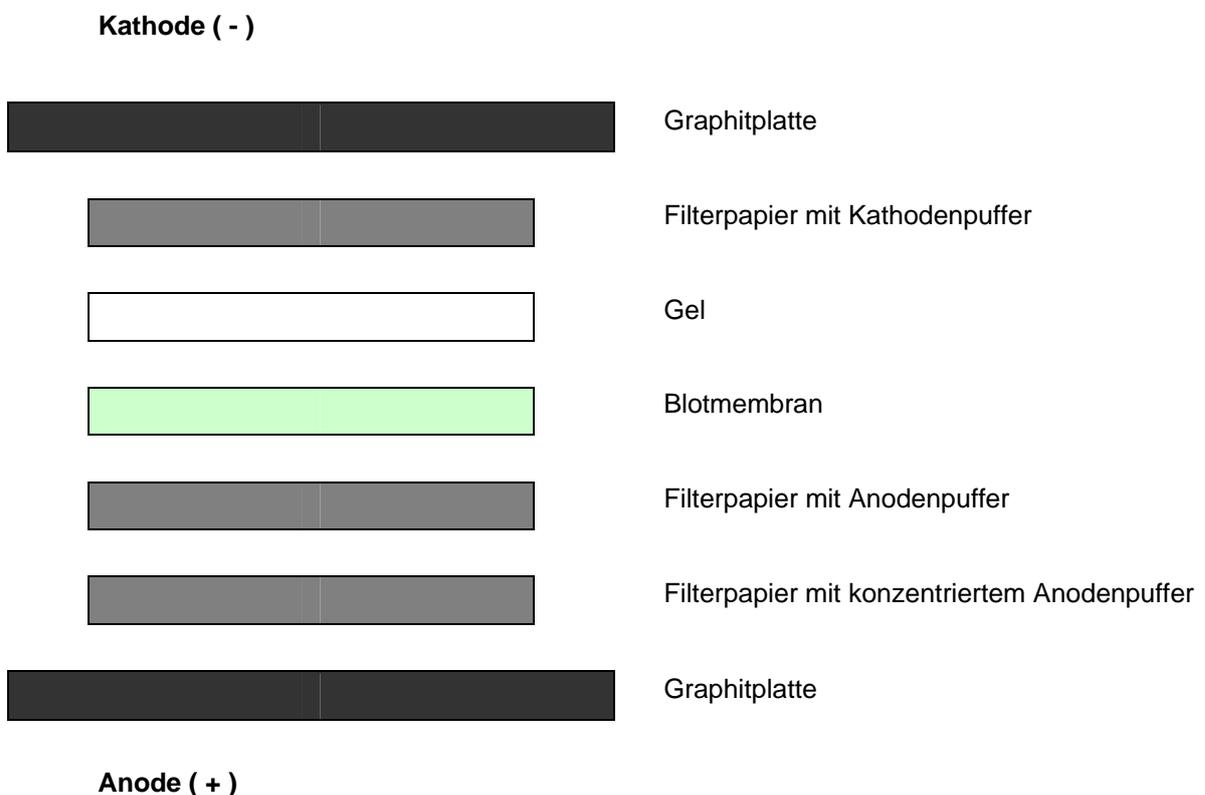


Abb.3.3.3.1: Aufbau eines Semidry Blot

Für den Proteintransfer wird eine konstante Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ eingestellt. Der Transfer dauert, bei Raumtemperatur, ca. zwei bis drei Stunden je nach Größe des gesuchten Proteins. In meinem Fall erfolgte der Proteintransfer bei 180 mA für 2 Gele.

Kathodenpuffer

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

Anodenpuffer

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

konzentrierter Anodenpuffer

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

3.3.4. Immunologisches Nachweisverfahren

Bei diesem Verfahren werden mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion einzelne elektrophoretisch aufgetrennte Proteine visualisiert.

Da sich die Antikörper an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften, würden sie damit einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Zunächst müssen deshalb die auf der Membran befindlichen freien Proteinbindungsstellen blockiert werden. Dies geschieht durch Inkubation der Membran mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Die Blotmembran wird hierzu in einer 3%igen BSA-Lösung in 1xTBS für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

TBS

Tris/HCL	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH 7,4	

Nach der Inkubation sind alle freien Bindungsstellen besetzt. Anschließend wird die Membran zweimal für fünf Minuten in 1xTBS gewaschen.

Jetzt folgt eine zweistündige Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser kann nur an das spezifische Epitop seines Antigens binden. Hierbei kommen polyklonale Antikörper zur Anwendung. Die Primärantikörper werden in einer Konzentration von 1 µg/ml benutzt.

Antikörperlösung

Antikörper X	1 µg/ml
Tris/HCL	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tween20	0,05 % (v/v)
BSA	2 % (w/v)
pH 7,4	

Dieser zweistündigen Inkubation mit dem Primärantikörper schließt sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper an. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym, in diesem Fall die alkalische Phosphatase (AP), gekoppelt. Zuvor wird die Membran jedoch mit 0,1 % (vol/vol) in 1xTBS für 5 min gewaschen, welches der Entfernung der ungebundenen Antikörper dient. Die ungebundenen Sekundärantikörper werden durch zwei fünfminütige Waschvorgänge mit 0,5 % (vol/vol) Triton in TBS entfernt. Dann wird die Membran zu einer Zwischeninkubation für 10 min in AP-Puffer äquilibriert.

AP-Puffer

Tris/HCl	100 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
pH 9.5	

In einem letzten Schritt werden die gesuchten Banden mit einem Färbemittel sichtbar gemacht. Als Färbemittel werden NBT und BCIP verwendet, die ein Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte AP darstellen.

Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten und das NBT reduziert. In der dephosphorylierten Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag. Gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettcs Präzipitat. Kurz vor Gebrauch wird die Entwicklerlösung angesetzt, anschließend wird die Membran darin für ca. 10 - 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wird durch ein Bad in Wasser beendet.

Entwicklerlösung

AP-Puffer	50 ml
BCIP	7 mg
NBT	15 mg

Die entwickelten Membranen werden getrocknet, zur Auswertung eingescannt und densitometrisch erfasst.

3.3.5 Überprüfung der verwendeten Antikörper

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen wurden zusätzlich zu den Kardiomyozyten auch Fibroblasten mit TGF- β (1ng/ml und 10ng/ml) stimuliert. Außerdem wurden die untersuchten ECM (Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin) als Kontrolle für die tatsächliche Höhe der Bande im Western Blot mitlaufen gelassen. Deutlich ist am Beispiel des Elastins die Expression in den Kardiomyozyten erkennbar, welche wie zu erwarten schwächer ist als die Expression des Elastins aus den Fibroblasten. Die Höhe der Bande unseres verwendeten Markers stimmt mit der mitlaufenden Bande des Proteins Elastin (65kDa) überein. (Abbildung: 3.3.5.1.)

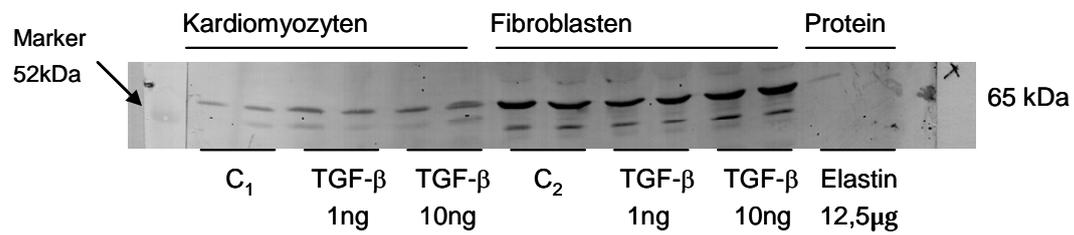


Abb.3.3.5.1. Repräsentativer Western-Blot der Elastin-Expression in Kardiomyozyten und Fibroblasten

Zur Kontrolle wurden hier im Vergleich Kardiomyozyten und Fibroblasten mit TGF- β stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Es wurden jeweils eine TGF- β Konzentration von 1 und 10ng verwendet. Als Kontrollen (C) dienten jeweils unbehandelte Kardiomyozyten (C₁) und unbehandelte Fibroblasten (C₂). Ebenfalls als Kontrolle diente das Protein Elastin (12,5 μ g), welches mitaufgetragen wurde.

3.4. Konfokale Lasermikroskopie

3.4.1. Technik

Durch fluoreszierende Substanzen kann Licht einer definierten Wellenlänge absorbiert werden. Dies führt dazu, dass bestimmte Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand übergehen. Beim Zurückspringen der Elektronen in den Grundzustand wird ein Teil der aufgenommenen Energie wieder frei und kann beispielsweise als Wärmeenergie abgegeben oder als Fluoreszenzlicht emittiert werden [Schild (1996)].

Das emittierte Fluoreszenzlicht ist energieärmer als das Anregungslicht und somit auch langwelliger. Wird das Anregungslicht in Wellenlänge und -stärke konstant gehalten, ist die Anzahl der emittierten Photonen linear zur Anzahl der vorhandenen Fluoreszenzmoleküle. Durch geeignete Technik wie Filter und dichroische Spiegel ist es möglich, das Anregungslicht von dem zu messenden Fluoreszenzlicht zu trennen. Auf diese Weise ist es möglich, durch einen Photomultiplier die Intensität des Fluoreszenzlichtes zu messen oder es über eine Kamera für das Auge des Betrachters sichtbar zu machen. Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie ist es möglich, klare Tiefenschnitte von dreidimensionalen Strukturen anzufertigen ohne diese dabei zu zerstören.

Die Abb.3.4.1.1 zeigt den schematischen Strahlengang solch eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops.

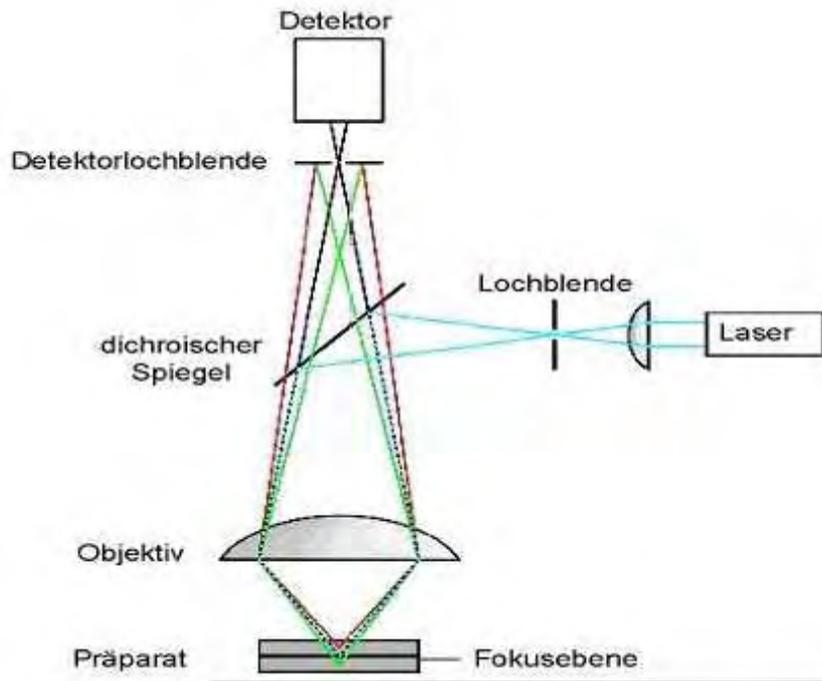


Abb. 3.4.1.1: vereinfachter Strahlengang eines cLSMs

Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (Laser, Linse und Lochblende) wird, wie in der oberen Skizze erkennbar, über einen dichroischen Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und durch das Objektiv in das Präparat fokussiert. Reflektiertes oder Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene wird durch das Objektiv und die Detektorblende (pinhole) von einem Detektor (z.B. Photomultiplier) aufgenommen. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene wird durch die Detektorlochblende abgeschirmt.

Abbildung und Beschreibung aus der Dissertationsarbeit Maike Schmelter (2007) entnommen.

Die Bestrahlung eines Gegenstandspunktes dauert nur wenige Millisekunden, daher ist eine sehr starke Lichtquelle, in der Regel ein Laser, erforderlich, um ausreichend Fluoreszenz anzuregen. Alle anderen Punkte werden in dieser Zeit nicht bestrahlt und werden auf diese Weise weder gebleicht noch verändert.

Das Prinzip der Lasermikroskopie beruht auf einer deutlichen Erhöhung des Kontrastes und einem geringeren Anteil an störender Fluoreszenz. Die Lochblende ermöglicht die Darstellung eines Bildes von sehr geringer Größe. In der Regel wird weniger als ein μm^2 des Gegenstandes abgebildet. Das aus der Lochblende austretende Licht wird von einem Photomultiplier detektiert und die Information von einem nachgeschalteten Computer gespeichert. Die

automatische Rastereinrichtung des konfokalen Mikroskops richtet den Strahlengang des Anregungs- und Emissionslichtes auf benachbarte Gegenstandspunkte in der Fokusebene aus (Ablenkung in der x/y - Achse). Das erhaltene Bild gibt die Intensität der Fluoreszenz innerhalb der Fokusebene wieder. Dies wird auch als "optischer Schnitt" bezeichnet.

Konfokale Lasermikroskope nutzen unterschiedliche Wellenlängen des Lichtes, also unterschiedliche Laser, um die Fluoreszenz anzuregen. Hier werden der Krypton/Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 458/488 nm und der Helium/Neon-Laser mit 568 nm bzw. 647 nm verwendet.

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe mit ihrem unterschiedlichen Absorptions- und Emissionslicht kommen zum Einsatz:

<u>Fluoreszenzfarbstoff</u>	Absorption (nm)	Emission (nm)
Cy5	649	666, 670
FITC/Cy2	490, 494	520, 525

Die Bilder werden mit einem Computerprogramm (Scanware, Leica) aufgenommen.

3.4.2. Immunzytochemische Färbung

Als immunzytochemische Färbung oder Markierung wird eine Methode bezeichnet, bei der Antigene im Gewebe mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Auf diese Weise ist es möglich, ein spezifisches Protein im Gewebe zu finden und zusätzlich die Lokalisation in dem Zellkompartiment zu bestimmen.

Abweichend zu Punkt 3.2.1. werden vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten Coverslips in die Schälchen gelegt. Diese werden vorher in Ethanol geschwenkt und über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Anschließend werden die Zellen, wie unter Punkt 3.2.1. beschrieben, weiter behandelt. Die Kardiomyozyten heften nun, statt auf dem Boden der Schälchen, auf den Deckgläschen an. Nach dem Waschen der Zellen werden diese mit 1 ml 4°C kaltem TCA (10 %) für 15 min bei 4°C inkubiert. Dies dient dem Fixieren der Zellen.

Nach 15 min Permeabilisierung der Kardiomyozyten mit 1x PBS + 0,1 % Triton bei Raumtemperatur erfolgt das Blockieren der unspezifischen Bindungstellen mit einer 3 %igen BSA-Lösung über Nacht bei 4°C. Verantwortlich für die Permeabilisierung der Zellmembran ist das Triton. Auf diese Weise wird es den Antikörpern ermöglicht, in die Zelle einzudringen und zu den gesuchten Proteinen zu gelangen.

Im Anschluss daran wird die Blocklösung abgesaugt und die Zellen mit 500 µl Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur behandelt. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, werden nach der zweistündigen Inkubationszeit die Kardiomyozyten dreimal für jeweils 5 min in 1x PBS + 0,1% Triton gewaschen.

Anschließend werden die Proben mit 500 µl Sekundärantikörper für 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Ab diesem Vorgang bleiben die Proben vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, damit die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers erhalten bleibt.

Die Zellen werden dann wieder mit 1x PBS + 0,1 % Triton dreimal für jeweils 5 min gewaschen um den ungebundenen Sekundärantikörper vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Deckgläschen aus den Schälchen genommen und mit der Zellseite auf einen, mit einem Tropfen Glycerin vorbereiteten, Objektträger gelegt.

Die auf diese Weise fixierte Probe kann entweder direkt unter dem Mikroskop betrachtet werden oder bei 4°C im Dunkeln für einige Tage gelagert werden.

Folgende Antikörper und Konzentrationen kommen hier zur Anwendung:

Primärantikörper / Konzentration	Sekundärantikörper / Konzentration
Elastin / 1:100	donkey anti goat FITC/Cy2 / 1:100
Collagen / 1:30	goat anti rabbit Cy5 / 1:100
Laminin / 1:60	goat anti rabbit Cy5 / 1:100
Fibronectin / 1:100	goat anti rabbit Cy5 / 1:100
Laminin-Rezeptor / 1:100	goat anti rabbit Cy5 / 1:100

3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.5.1. Probengewinnung für PCR

Die unter Punkt 3.2.2. behandelten Zellen werden mit 10 ng TGF- β pro ml stimuliert und für 24 h inkubiert.

Nach dem Absaugen des Mediums wird 1 ml 4°C kalte PBS-Lösung pro Schale auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt und jeweils die Zellsuspension von 4 Schälchen in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße werden für 3 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wird der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet kann jetzt entweder eingefroren oder direkt weiterbehandelt werden.

3.5.2. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolation wird dem Zellpellet 1 ml ca. 4°C kaltes TriFast[®] zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach vollständiger Auflösung der Zellen mit Hilfe eines Mixers wird die Suspension mit 100 μ l Chloroform versetzt und gut durchmischt, bis sie homogen weißlich trüb erscheint. Die Inkubationszeit beträgt 2-3 min. Anschließend wird die gesamte RNA durch Zentrifugation bei 4°C für 15 min und einer Geschwindigkeit von 15000 rpm von DNA und Proteinen getrennt. Die Auftrennung ist an der Bildung von drei Phasen zu erkennen. Die obere klare Phase enthält die gesamte RNA, in der mittleren, einer sehr dünnen Phase, sind leichte Proteine gelöst und in der unteren gelblichen Phase finden sich DNA, Lipide und Proteine. Der Überstand wird nun vorsichtig abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches zuvor noch mit UV Licht bestrahlt wurde, um eventuell vorhandene RNAsen zu beseitigen.

Zur Fällung der RNA wird dem abpipettierten Überstand jetzt die gleiche Menge Isopropanol zugesetzt und für 20 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz nochmals für 15 min bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das so gewonnene Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen.

Es folgt eine weitere Zentrifugation für 15 min unter den bekannten Bedingungen, nach Dekantieren des Ethanols wird die im Pellet enthaltene RNA luftgetrocknet und in 10 µl sterilem RNase freiem Wasser resuspendiert.

In diesem Stadium kann die RNA bei -20°C tiefgefroren gelagert werden, sie kann aber auch direkt weiterbehandelt werden.

3.5.3. Bestimmung des RNA - Gehaltes

Nach der Isolation der RNA wird die RNA-Konzentration quantitativ photometrisch in einem Spektrophotometer bestimmt. Hierzu werden 3 µl der gelösten RNA in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und in eine Quarzglasküvette überführt. Anschließend wird die Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Um den Reinheitsgrad der RNA-Suspension zu prüfen, wird die Probe zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Ratio dieser beiden Messwerte sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um einen hohen Reinheitsgrad zu gewährleisten.

Die restliche RNA wird zur Synthese der cDNA durch die Reverse Transkriptase direkt weiterverwendet oder tiefgefroren gelagert.

3.5.4. cDNA - Synthese

Die gewonnene RNA muss, da es für die PCR keine spezifischen RNA-Polymerasen gibt, zunächst wieder in eine DNA in die sogenannte cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden. Da cDNA stabiler und unempfindlicher als reine RNA ist, kann sie auch über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

Zur cDNA-Synthese mit einem Oligo-dT-Primer wird $1\ \mu\text{g}$ RNA pro Ansatz verwendet. Diese Menge wird mit sterilem RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von $5\ \mu\text{l}$ aufgefüllt.

Diese RNA-Suspension wird im Thermocycler für 15 min bei 60°C denaturiert und anschließend auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe von $5\ \mu\text{l}$ Mix pro Ansatz erfolgt die Reverse Transkription bei 37°C für 60 min im Thermocycler. Anschließend wird die Temperatur für 5 min auf 94°C erhöht, was zu einer Denaturierung der Reversen Transkriptase führt. Die Reverse Transkriptase (M-MLV-RT) wurde aus dem murinen Leukämievirus isoliert.

Mix für einen Ansatz

Oligo-dT	$1,0\ \mu\text{l}$ (0,1mg/ml)
5xRT-Puffer	$2,0\ \mu\text{l}$
dNTPs	$1,0\ \mu\text{l}$ (10mmol/l je Nukleotid)
RNA-sin	$0,2\ \mu\text{l}$ (25U/ μl)
DTT	$0,5\ \mu\text{l}$ (0,1 mol/l)
M-MLV-RT	$0,3\ \mu\text{l}$ (200U/ μl)

Die entstandene cDNA kann sofort im iCycler weiterverwendet werden oder die Proben werden bei -20°C bis zur späteren Verwendung tiefgefroren.

3.5.5 Quantitative PCR

In der PCR werden nun die gewonnenen cDNA-Abschnitte amplifiziert. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Emission in jedem Zyklus gemessen wird. Der bei dieser Arbeit verwendete Farbstoff ist SYBR[®] Green. Dieser emittiert eine Fluoreszenz, sobald er an eine doppelsträngige DNA bindet. Hierdurch ist es möglich, die Menge der vorhandenen DNA nach jedem Zyklus anhand der Stärke der Emission zu bestimmen.

Für die PCR werden 3 µl der gewonnenen cDNA und 17 µl des PCR-Mixes in ein steriles, für den iCycler passendes Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Anschließend werden die Proben bei einer für den Primer spezifischen Zyklenzahl und Temperatur im iCycler bearbeitet.

PCR-Mix für eine Probe

Steriles Wasser	6,4 µl
Primer forward	0,3 µl
Primer reverse	0,3 µl
SYBR [®] Green Supermix	10 µl

Folgendes Programm wird zur Durchführung der PCR benutzt, es gliedert sich in 3 Zyklen, wobei die Annealingtemperatur von dem jeweiligen Primer abhängig ist:

Zyklus 1 (1x)	Aktivierung der Polymerase	93°C, 3 min
Zyklus 2 (45x)	Denaturierung	93°C, 30 s
	Annealing	primerspezifisch, 30 s
	Amplifikation	72°C, 30 s
Zyklus 3 (100x)		50°C, 10 min

Unter Annealing versteht man die Anlagerung des Primers an das DNA-Template. Nach der Denaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch auf die sogenannte Annealingtemperatur abgekühlt. Bei diesem Schritt kommt es zur spezifischen Bindung des Primers an sein Template.

In der vorliegenden Studie wurde mit folgenden Annealingtemperaturen gearbeitet:

- + 56°C für Elastin und Laminin
- + 62°C für Collagen
- + 60°C für Fibronectin
- + 57°C für Laminin-Rezeptor
- + 63°C für HPRT (Housekeeping-Gen)

3.5.6 Primeroptimierung

Für eine bestmögliche Auswertung der Real-Time-PCR sollte sich das Amplifikat von Zyklus zu Zyklus genau verdoppeln. Aus diesem Grund wurde dies, spezifisch für jeden Primer, mit Hilfe von Standardkurven überprüft. Zuerst wurden Verdünnungsreihen der RNA-Konzentration von 1:10 bis 1:10000 angesetzt. Die Standardkurve die angefertigt wurde zeigt nur dann ihre optimale Steigung um -3,3 und eine Effizienz von ca. 100% wenn sich die Amplifikate verdoppelt haben.

Zur Ermittlung der Annealingtemperatur wurden die Primer bei verschiedenen Temperaturgradienten, in 1°C Schritten, auf ihren optimalen Arbeitsbereich eingestellt.

Auf diese Weise sind alle Primer optimiert worden.

3.5.7 Auswertung

Die Daten werden mit Hilfe der Biorad iCycler iQ Software analysiert und die Ergebnisse werden über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt. Hierzu vergleicht man die C_T -Werte des untersuchten Genes mit den C_T -Werten eines konstant exprimierten Housekeeping-Genes. In dieser Studie wurde als Housekeeping Gen das HPRT benutzt, welches in den Zellen in konstanten Konzentrationen exprimiert wird.

In der hier beschriebenen Real-time-PCR ist keine Aussage über die absolute RNA-Menge möglich, es kann aber eine semiquantitative Aussage über die Expression der untersuchten mRNAs getroffen werden.

3.6. Statistik

Alle Versuche wurden mindestens drei- bis zehnmal mit $n=3-10$ durchgeführt, wobei "n" für die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche steht.

Die dargestellten Ergebnisse berechnen sich aus dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder aus dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Statistische Differenzen innerhalb der Gruppe wurden mittels ANOVA (Analyse der Varianz) durchgeführt. Wurden zwei Gruppen verglichen, fand der T-Test Anwendung, wobei * $P < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Signifikante Unterschiede werden in den Schaubildern mit Sternchen über dem jeweiligen Balken gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von TGF- β auf die Expression extrazellulärer Matrixproteine durch adulte Kardiomyozyten

4.1.1. Expression der extrazellulären Matrixproteine nach Stimulation mit TGF- β auf Proteinebene

In der ersten Versuchsreihe wurde die Protein-Expression von extrazellulären Matrixproteinen nach Stimulation mit TGF- β durch Kardiomyozyten untersucht. Hierzu wurden adulte ventrikuläre Kardiomyozyten mit TGF- β in den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Inkubation beendet und die Expression der einzelnen ECM auf Proteinebene ermittelt. Die Proteinexpression wurde auf der Basis des Western-Blot-Verfahrens bestimmt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Kardiomyozyten mit TGF- β zum einen zu einer vermehrten Expression der einzelnen extrazellulären Matrixproteine führt, zum anderen konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Expression einen weitestgehend konzentrationsabhängigen Verlauf nimmt.

4.1.1.1. Kollagen I

Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β in den beiden Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression des Kollagen I. Nach 24stündiger Inkubation mit TGF- β war die Kollagenexpression auf Proteinebene signifikant um 35% (1 ng/ml) bzw. um 45% (10 ng/ml) erhöht. Die erhöhte Expression dieses Proteins ist in der Abbildung 4.1.1.1. graphisch dargestellt.

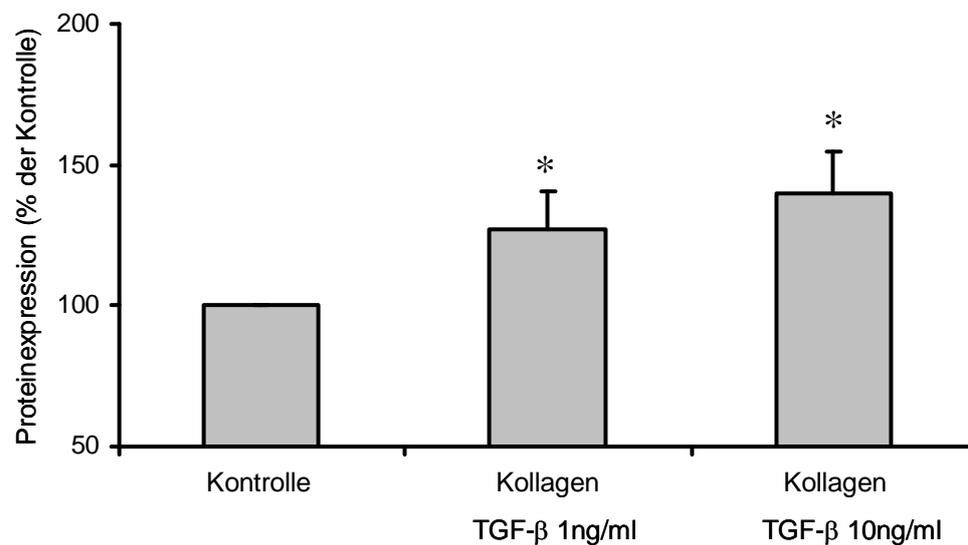


Abb. 4.1.1.1. Kollagen-Expression nach Stimulation mit TGF- β

*Bei diesem Versuch zeigt sich eine konzentrationsabhängige signifikante Erhöhung der Kollagen I-Expression nach 24 h Stimulation mit TGF- β (1 ng/ml und 10 ng/ml). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.1.2. Elastin

Auch die Expression von Elastin nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg, welcher bei einer Konzentration von 10 ng/ml mehr als doppelt so hoch ist wie unter Kontrollbedingungen. Die erhöhte Expression dieses Proteins ist in der Abbildung 4.1.1.2. graphisch dargestellt.

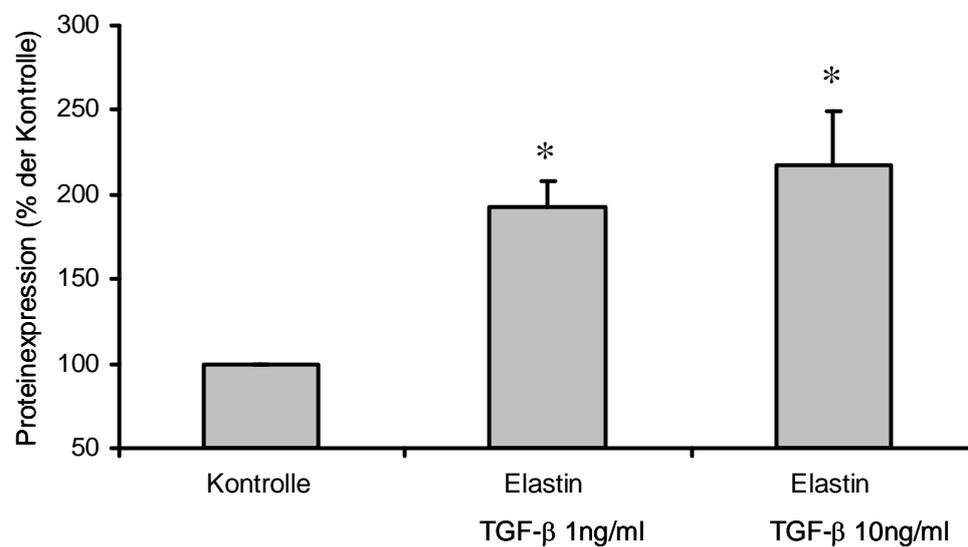


Abb. 4.1.1.2. Elastin-Expression nach Stimulation mit TGF- β

Bei diesem Versuch zeigt sich eine konzentrationsabhängige signifikante Erhöhung der Elastin-Expression nach 24 h Stimulation mit TGF- β (1 ng/ml und 10 ng/ml). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .

4.1.1.3. Fibronektin

Für Fibronektin stellt sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Proteinexpression dar. Die Stimulation der Kardiomyozyten mit einer Konzentration von 1 ng/ml zeigt kein signifikantes Ergebnis. Erst eine Konzentration von 10 ng/ml TGF- β führt nach 24 Stunden Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der Fibronektin-Expression. In Abbildung 4.1.1.3. sind die Ergebnisse der Fibronektin-Expression graphisch dargestellt.

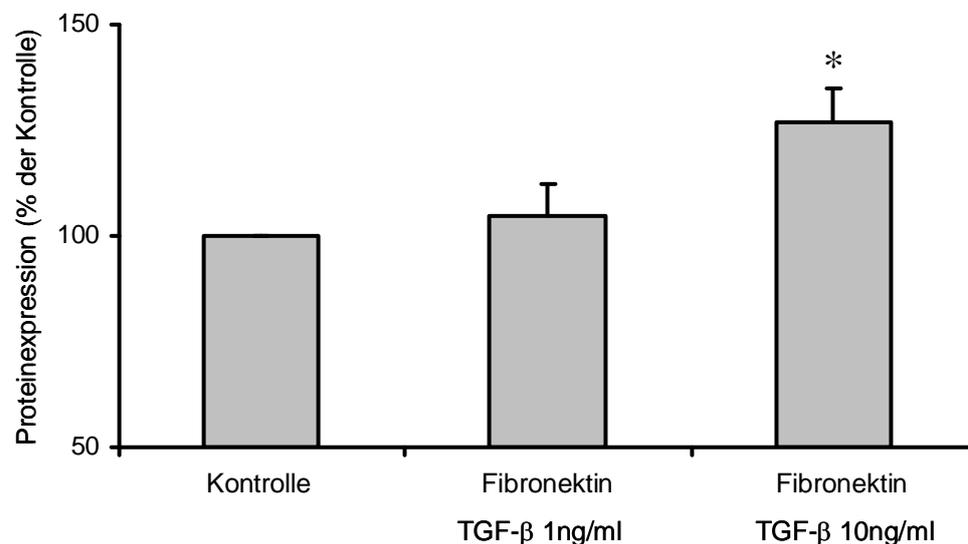


Abb. 4.1.1.3 Fibronektin-Expression nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fibronektin-Expression nach 24 h Stimulation mit TGF- β (1 ng/ml und 10 ng/ml).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.1.4. Laminin

Bei diesem Versuch zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Lamininexpression nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β . Hier fällt auf, dass sich die Proteinexpression nicht konzentrationsabhängig verhält, sondern die Expression bei der Konzentration von 1 ng/ml TGF- β größer ist als bei einem Stimulationswert von 10 ng/ml. Die erhöhte Expression dieses Proteins ist in der Abbildung 4.1.1.4. graphisch dargestellt.

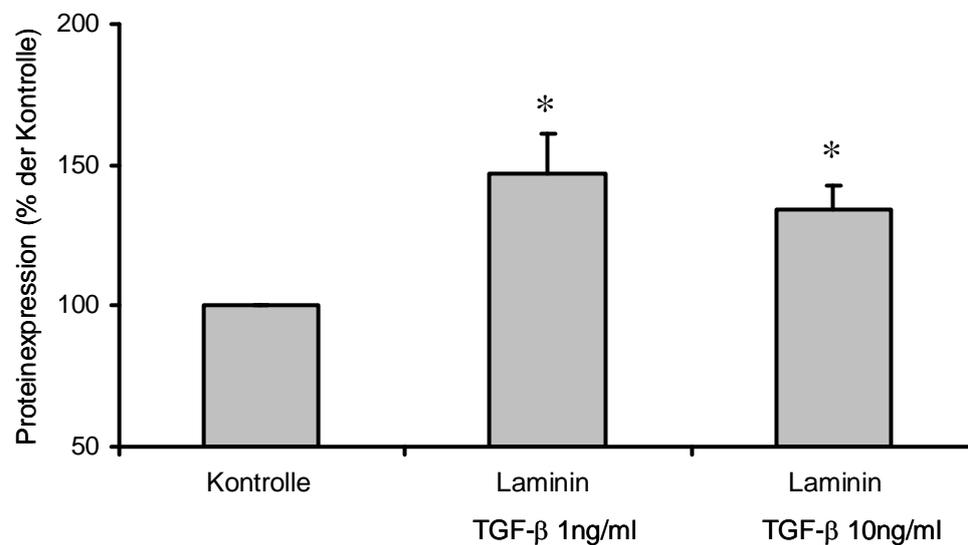


Abb. 4.1.1.4. Laminin-Expression nach Stimulation mit TGF- β

Bei diesem Versuch zeigt sich, nach 24 h Stimulation mit TGF- β (1 ng/ml und 10 ng/ml), für beide Werte eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression, die sich nicht konzentrationsabhängig verhält.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.1.5. Laminin-Rezeptor

Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β für 24 Stunden in den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml zeigt sich ein starker konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression des Laminin-Rezeptors. Die Expression dieses Proteins ist in der Abbildung 4.1.1.5. graphisch dargestellt.

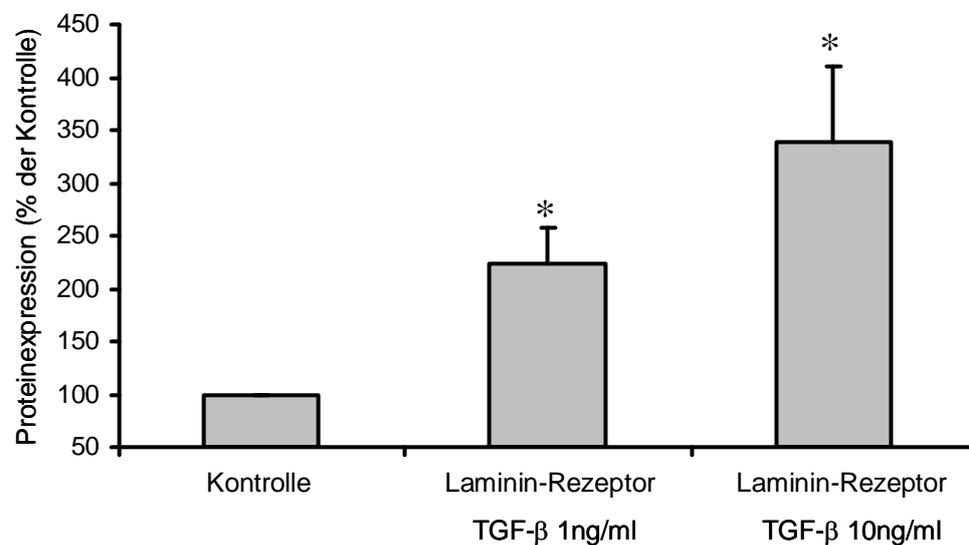


Abb. 4.1.1.5. Laminin-Rezeptor-Expression nach Stimulation mit TGF- β

Bei diesem Versuch zeigt sich eine konzentrationsabhängige signifikante Erhöhung der Expression des Laminin-Rezeptors nach 24 h Stimulation mit TGF- β (1 ng/ml und 10 ng/ml).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=5 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

Repräsentative Blots

Dargestellt sind hier repräsentative Blots (Abb.:4.1.1.0, 4.1.1.1a - 4.1.1.5a) nach 24-stündiger Inkubation der Kardiomyozyten mit TGF- β . Verwendet wurde TGF- β in den beiden Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml. Zur Visualisierung wurden die im Elektrophoreseverfahren aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und mittels alkalischer Phosphatase gefärbt, eingescannt und ausgewertet. Zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung wurden diese Werte auf Aktin normiert. Dies gilt für alle folgenden in dieser Versuchsreihe gezeigten repräsentativen Western-Blots.

Aktin

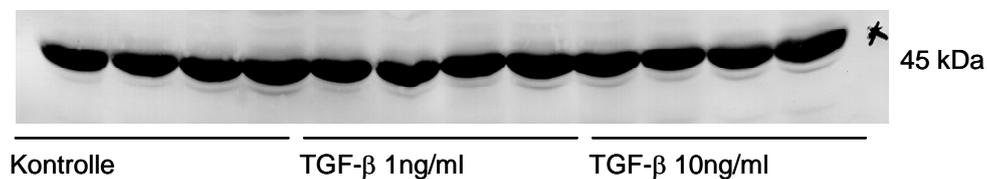


Abb. 4.1.1.0
Repräsentativer Western-Blot der Aktin-Expression

Kollagen I

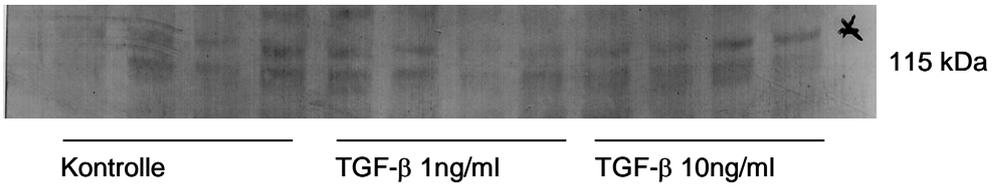


Abb. 4.1.1.1.a

Repräsentativer Western-Blot der Kollagen I-Expression

Elastin

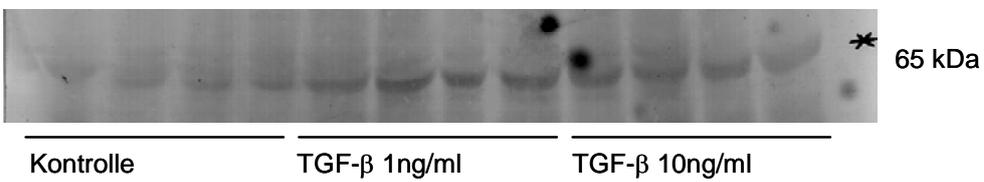


Abb. 4.1.1.2.a

Repräsentativer Western-Blot der Elastin-Expression.

Fibronectin

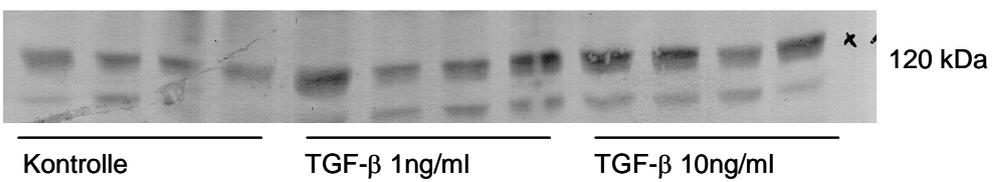


Abb. 4.1.1.3.a

Repräsentativer Western-Blot der Fibronektin-Expression.

Laminin

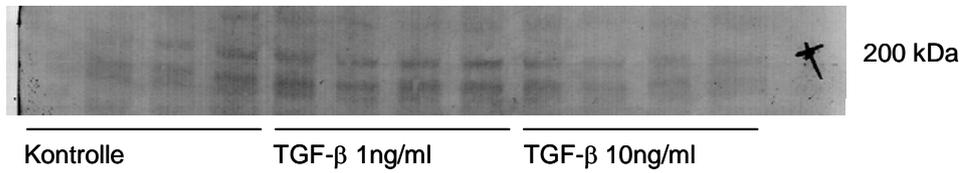


Abb. 4.1.1.4.a

Repräsentativer Western-Blot der Laminin-Expression.

Laminin-Rezeptor

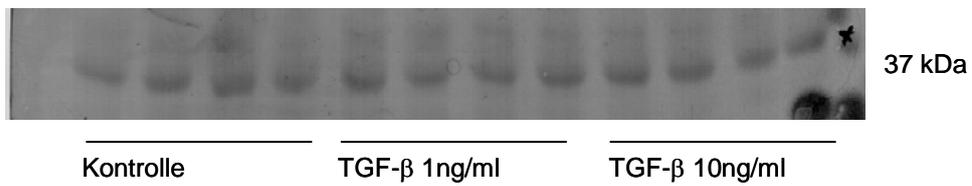


Abb. 4.1.1.5a

Repräsentativer Western-Blot der Laminin-Rezeptor-Expression.

4.1.2. Expression der ECM nach Stimulation mit TGF- β auf Proteinebene in Abhängigkeit der Zeit

Um den zeitlichen Verlauf der Expression von Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und des Laminin-Rezeptors darzustellen, wurden Kardiomyozyten mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Anschließend wurde mittels Western-Blot-Verfahren die exprimierte Proteinmenge nach zeitlich unterschiedlicher Inkubation bestimmt. Die Zeitintervalle der Inkubation mit TGF- β betragen für diesen Versuch 2, 8, 24, 30 und 48 Stunden. Als Kontrollwert wurde der Wert zum Zeitpunkt 0 Stunden Inkubation mit TGF- β herangezogen, es wurden Zellen der gleichen Zellkultur verwendet.

Hierbei ergaben sich unterschiedliche zeitliche Verlaufsformen die im Folgenden in den Abb.: 4.1.2.1.a - 4.1.2.5.a dargestellt sind.

4.1.2.1. Kollagen I

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression nach Stimulation mit TGF- β stellt sich für Kollagen I wie folgt dar: Bis zum Zeitpunkt 24 h ist ein kontinuierlicher signifikanter Anstieg der Expression zu verzeichnen, der bei Stunde 30 noch einen signifikant erhöhten Wert zeigt, aber schon unter den 24-Stunden-Wert gesunken ist. Die Proteinexpression sinkt bis zur Stunde 48 weiter ab und erreicht auch danach keinen signifikanten Wert mehr.

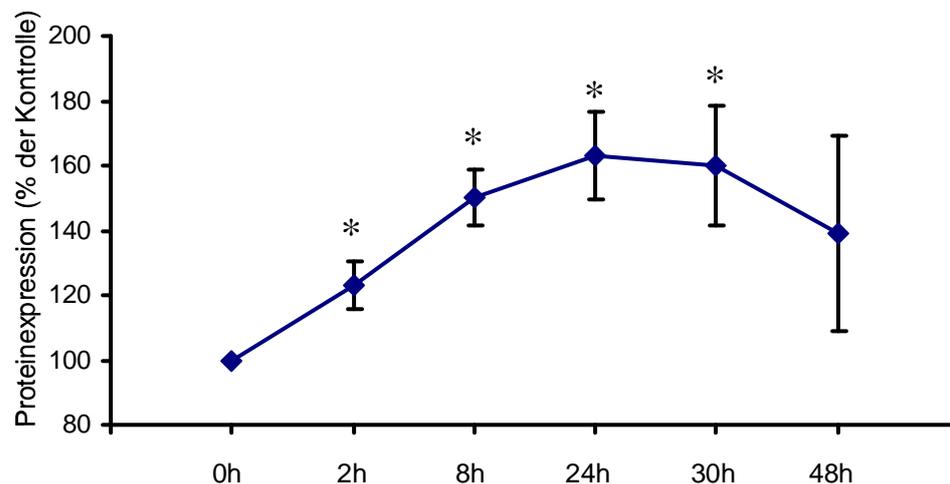


Abb. 4.1.2.1.a Zeitlicher Verlauf der Kollagen I-Expression nach TGF- β Stimulation (24h, 10ng/ml)

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression von Kollagen I zeigt sein Maximum bei einer Inkubation von 24 Stunden.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

4.1.2.2. Elastin

Die Elastin-Expression nach Stimulation mit TGF- β zeigt einen steilen Anstieg bis zu einem maximalen signifikanten Peak bei Stunde 8, danach fällt der Wert bis zur 30. Stunde ab, hält sich aber noch auf einem signifikant erhöhten Niveau.

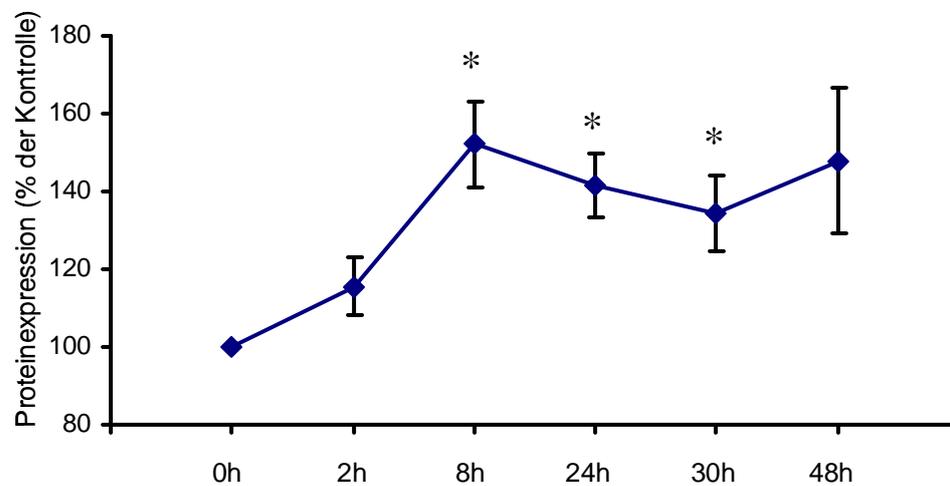


Abb. 4.1.2.2.a Zeitlicher Verlauf der Elastin-Expression nach TGF- β Stimulation (24h, 10ng/ml)

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression von Elastin zeigt sein Maximum bei einer Inkubation von 8 Stunden.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=9 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

4.1.2.3. Fibronektin

Im zeitlichen Verlauf der Fibronektin-Expression nach Stimulation mit TGF- β bleibt der 2-Stunden-Wert auf dem Kontrollniveau, steigt dann zu einem signifikanten Peak bei Stunde 24 an, um anschließend wieder abzufallen.

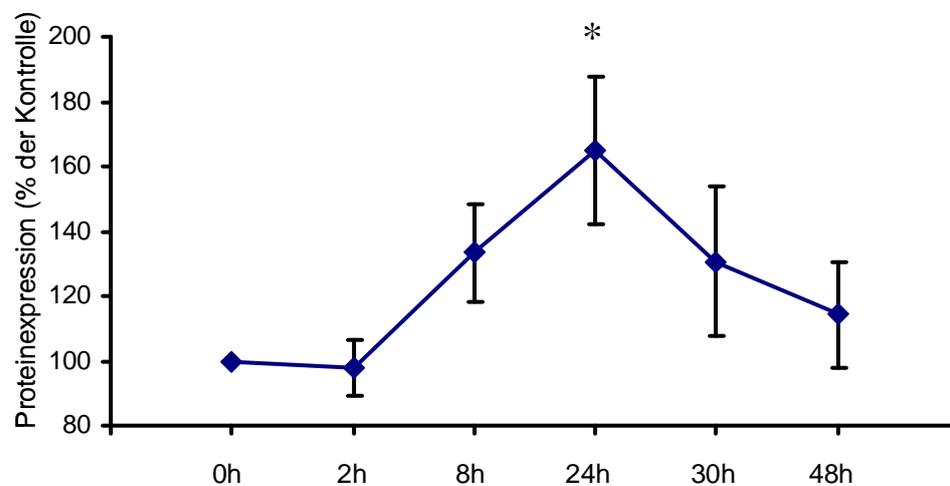


Abb. 4.1.2.3.a Zeitlicher Verlauf der Fibronektin-Expression nach TGF- β Stimulation (24h, 10ng/ml)

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression von Fibronektin zeigt sein Maximum bei einer Inkubation von 24 Stunden.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

4.1.2.4. Laminin

Die TGF- β induzierte zeitliche Expression von Laminin beginnt erst nach der zweiten Stunde mit einem steilen Anstieg zu einem signifikant erhöhten 8-Stunden-Wert. Die Proteinexpression verharrt auf einem Plateau mit signifikant höheren Werten bis zur 48. Stunde der Inkubation mit TGF- β .

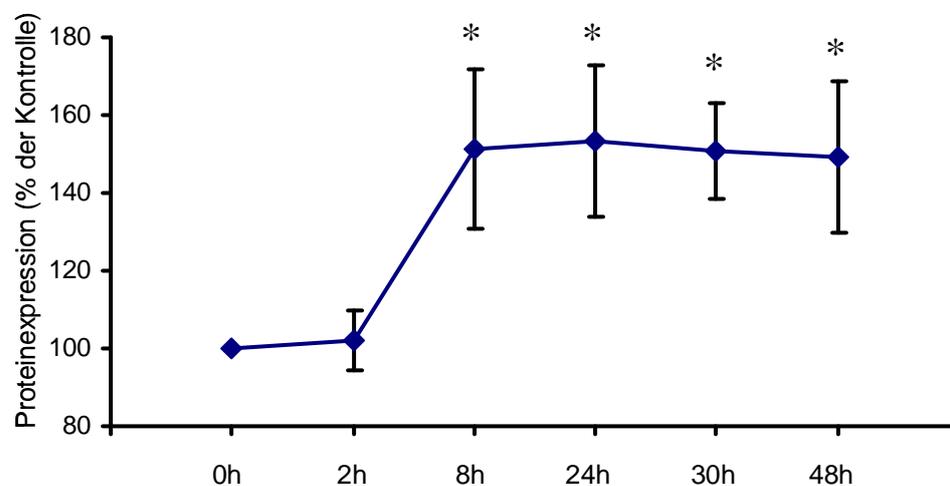


Abb. 4.1.2.4.a Zeitlicher Verlauf der Laminin-Expression nach TGF- β Stimulation (24h, 10ng/ml)

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression von Laminin bleibt nach einem steilen Anstieg bis zur 8. Stunde auf einem Plateau signifikant erhöht.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

4.1.2.5. Laminin-Rezeptor

Der hier dargestellte zeitliche Verlauf der Proteinexpression nach Stimulation mit TGF- β zeigt einen steilen signifikanten Anstieg bis zur Stunde 8. Anschließend sinkt die Expression bis zu einem trotzdem noch signifikant erhöhten 24-Stunden-Wert, um dann bis zur 48. Stunde keine signifikante Erhöhung mehr zu zeigen.

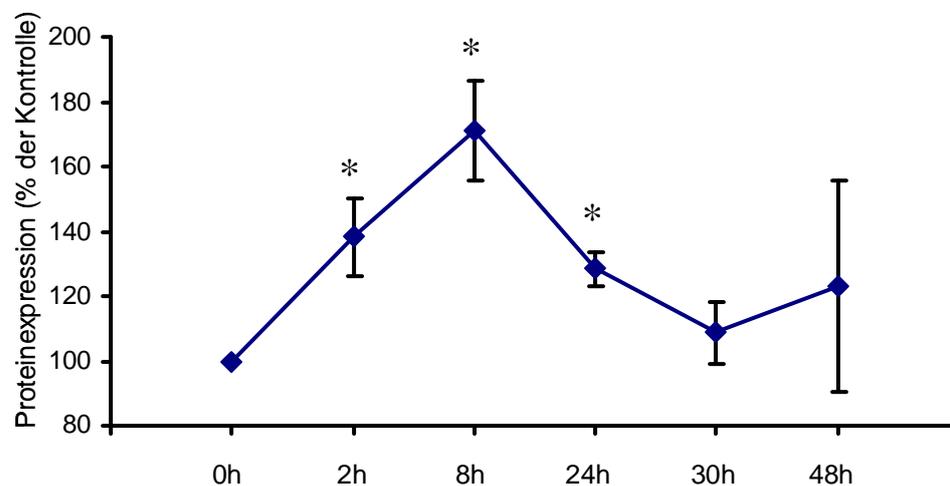


Abb. 4.1.2.5.a Zeitlicher Verlauf der Laminin-Rezeptor-Expression nach TGF- β Stimulation (24h, 10ng/ml)

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression vom Laminin-Rezeptor zeigt sein Maximum bei einer Inkubation von 8 Stunden.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

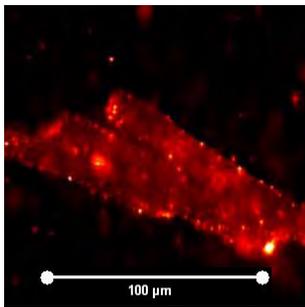
4.1.3. Immunhistochemische Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse

Diese Versuche wurden angefertigt, um die Verteilung der gebildeten ECM in der Kardiomyozyte und in ihrer nächsten Umgebung darzustellen. Hierbei wurden die Kardiomyozyten wieder mit TGF- β stimuliert. TGF- β wurde auch hier in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

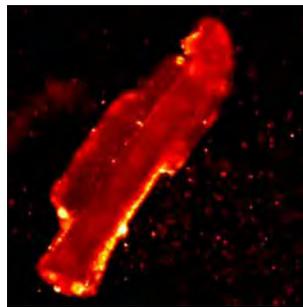
Um die Verteilung der gebildeten ECM verfolgen zu können, wurden mittels Immunfluoreszenz Bilder mit dem Laser-Mikroskop angefertigt. Sie zeigen die Kardiomyozyten mit den von ihnen exprimierten ECM nach 2-, 8- und 24-stündigen Zeitintervallen im Vergleich.

Bei den hier gezeigten Bildern (Abb. 4.1.3.1.a - 5.a) lässt sich die Zunahme der Fluoreszenz innerhalb der 2-, 8- und 24- Stundenwerte darstellen. Damit zeigt sich die vermehrte Anwesenheit von extrazellulären Matrixproteinen. Nach 24 Stunden Inkubation mit TGF- β zeigt sich auch außerhalb der Zelle in ihrer unmittelbaren Nähe Fluoreszenz. Zur Kontrolle dient jeweils die Aufnahme einer Kardiomyozyte, die nach 24 Stunden ohne Stimulation mit TGF- β angefertigt wurde. Zusätzlich wurde exemplarisch für Kollagen I nach 24 h eine Durchlichtaufnahme angefertigt. Sie zeigt exakt die gleiche Kardiomyozyte, die zuvor 24 Stunden mit TGF- β inkubiert wurde. Hierbei sollte die Morphologie und Unversehrtheit der Zelle überprüft werden.

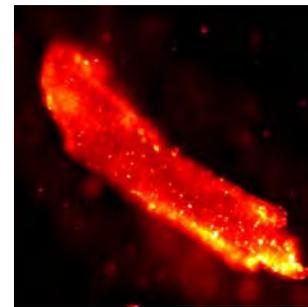
4.1.3.1. Kollagen I



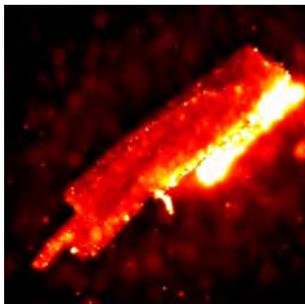
0 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



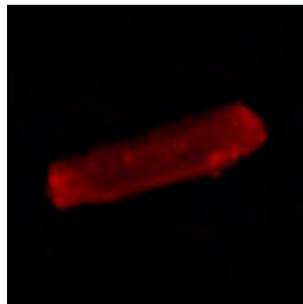
2 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



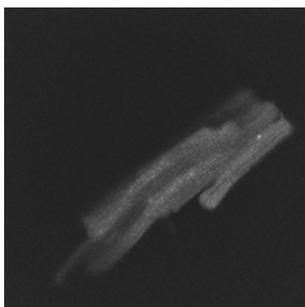
8 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Kontrollwert ohne Stimulation mit TGF- β
(10ng/ml)

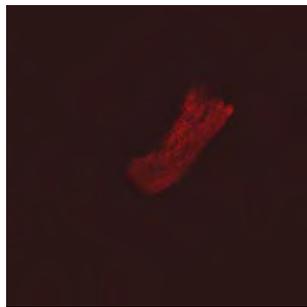


24 h Durchlicht Aufnahme
der zuvor gezeigten Zelle nach Inkubation mit TGF- β (10ng/ml) für 24 Stunden

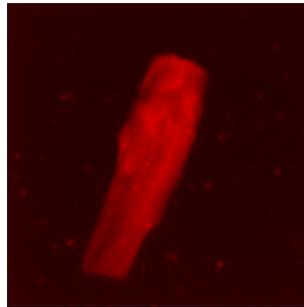
Abb.4.1.3.1.a Immunhistochemische Darstellung von Kollagen I

Repräsentative konfokale Aufnahmen einzelner Herzmuskelzellen inkubiert, mit TGF- β (10ng/ml) für 0, 2, 8 und 24 h. Zur Kontrolle dienten zusätzlich unstimulierte Zellen nach 24-stündiger Kultivierung. Die Zellen wurden mit einem Cy5 Zweit-Antikörper gefärbt und mit einer Wellenlänge von 649nm angeregt. Je gelber und heller die Zelle leuchtet, desto mehr Kollagen ist enthalten.

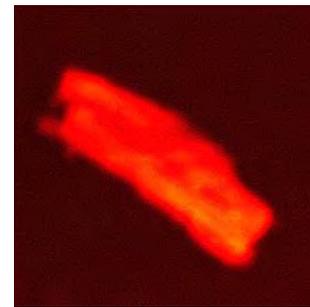
4.1.3.2. Elastin



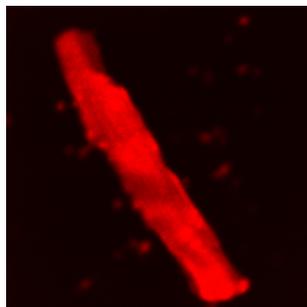
0 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



2 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



8 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



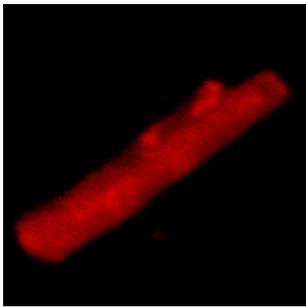
24 h Kontrollwert ohne Stimulation mit TGF- β
(10ng/ml)

Abb.4.1.3.2.a Immunhistochemische Darstellung von Elastin

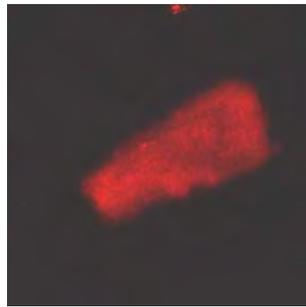
Repräsentative konfokale Aufnahmen einzelner Herzmuskelzellen inkubiert mit TGF- β (10ng/ml) für 0, 2, 8 und 24 h. Zur Kontrolle dienten zusätzlich unstimulierte Zellen nach 24-stündiger Kultivierung. Die Zellen wurden mit einem FITC/Cy2 Zweit-Antikörper gefärbt und mit einer Wellenlänge von 490/494nm angeregt. Je gelber und heller die Zelle leuchtet, desto mehr Elastin ist enthalten.

Der FITC/Cy2 Zweit-Antikörper hat ein grün fluoreszierendes Licht, zur besseren Vergleichbarkeit mit den andere Proteinen wurde am Computer die Farbe nachbehandelt.

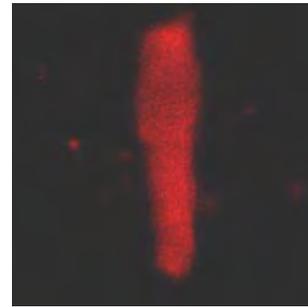
4.1.3.3. Fibronektin



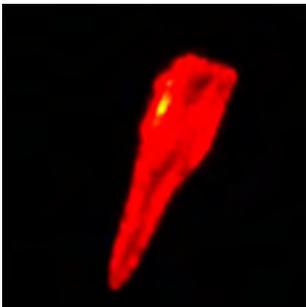
0 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



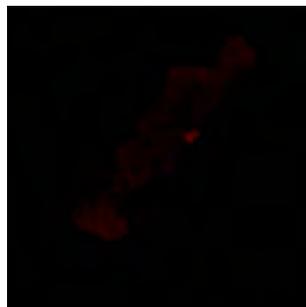
2 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



8 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)

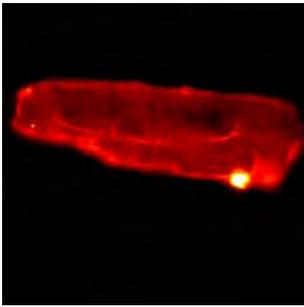


24 h Kontrollwert ohne Stimulation mit TGF- β
(10ng/ml)

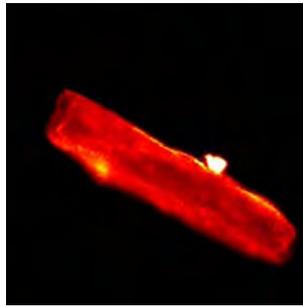
Abb.4.1.3.3.a Immunhistochemische Darstellung von Fibronektin

Repräsentative konfokale Aufnahmen einzelner Herzmuskelzellen inkubiert mit TGF- β (10ng/ml) für 0, 2, 8 und 24 h. Zur Kontrolle dienten zusätzlich unstimulierte Zellen nach 24-stündiger Kultivierung. Die Zellen wurden mit einem Cy5 Zweit-Antikörper gefärbt und mit einer Wellenlänge von 649nm angeregt. Je gelber und heller die Zelle leuchtet, desto mehr Fibronektin ist enthalten.

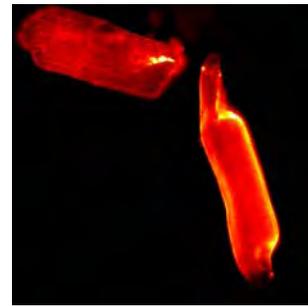
4.1.3.4. Laminin



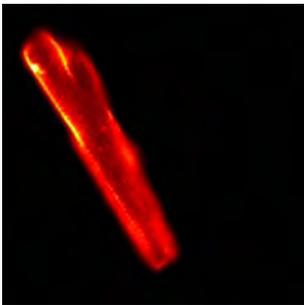
0 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



2 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



8 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)

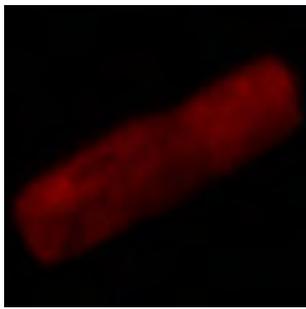


24 h Kontrollwert ohne Stimulation mit TGF- β
(10ng/ml)

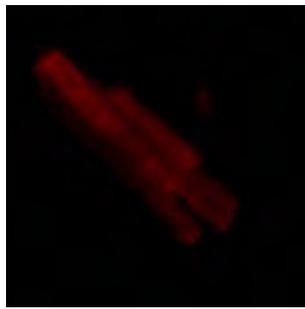
Abb.4.1.3.4.a Immunhistochemische Darstellung von Fibronectin

Repräsentative konfokale Aufnahmen einzelner Herzmuskelzellen inkubiert mit TGF- β (10ng/ml) für 0, 2, 8 und 24 h. Zur Kontrolle dienten zusätzlich unstimulierte Zellen nach 24-stündiger Kultivierung. Die Zellen wurden mit einem Cy5 Zweit-Antikörper gefärbt und mit einer Wellenlänge von 649nm angeregt. Je gelber und heller die Zelle leuchtet, desto mehr Laminin ist enthalten.

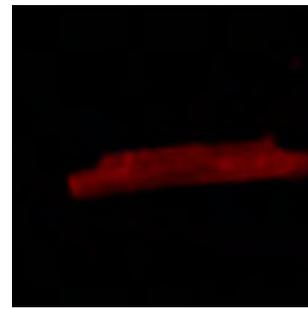
4.1.3.5. Laminin-Rezeptor



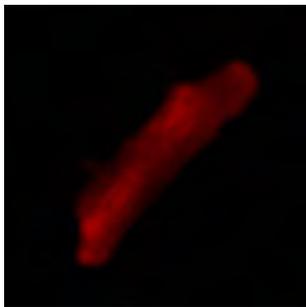
0 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



2 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



8 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Inkubation mit TGF- β
(10ng/ml)



24 h Kontrollwert ohne Stimulation mit TGF- β
(10ng/ml)

Abb.4.1.3.5.a Immunhistochemische Darstellung von Fibronektin

Repräsentative konfokale Aufnahmen einzelner Herzmuskelzellen inkubiert mit TGF- β (10ng/ml) für 0, 2, 8 und 24 h. Zur Kontrolle dienten zusätzlich unstimulierte Zellen nach 24-stündiger Kultivierung. Die Zellen wurden mit einem Cy5 Zweit-Antikörper gefärbt und mit einer Wellenlänge von 649nm angeregt. Je gelber und heller die Zelle leuchtet, desto mehr des Laminin-Rezeptors ist enthalten.

4.1.4. Expression der ECM nach Stimulation mit TGF- β auf mRNA Ebene

Um die auf Proteinebene gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die verstärkte Expression extrazellulärer Matrixproteine auf mRNA Ebene mittels Real time PCR nachgewiesen. Die Abbildungen 4.1.4.1.a - 4.1.4.5.a zeigen die Expression der extrazellulären Matrixproteine auf mRNA Ebene nach 8-stündiger Inkubation der Kardiomyozyten mit 1 ng/ml und 10 ng/ml TGF- β .

4.1.4.1. Kollagen I

Bei diesem Versuch zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kollagen I-mRNA-Expression nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β . Hier fällt auf, dass sich die Expression auf Ebene der mRNA zwar signifikant erhöht, sich aber nicht konzentrationsabhängig verhält. Die mRNA-Expression von Kollagen I ist bei der Konzentration von 1 ng/ml TGF- β größer als bei einem Stimulationswert von 10 ng/ml.

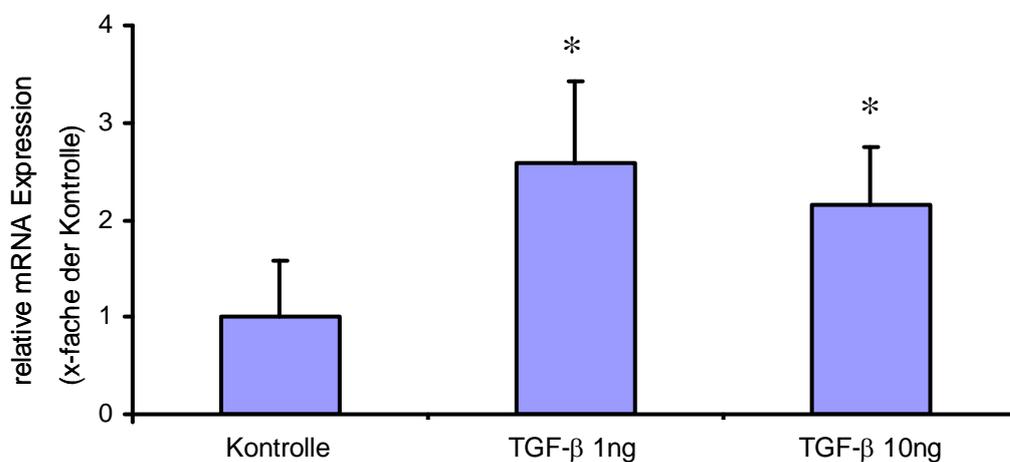


Abb. 4.1.4.1.a mRNA-Expression für Kollagen I nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein nicht konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression für Kollagen I nach TGF- β Stimulation (8h).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=7 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.4.2. Elastin

Bei diesem Versuch zeigt sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der mRNA-Expression von Elastin nach Stimulation mit TGF- β . Hierbei stellt sich aber nur nach Inkubation mit einer Konzentration von 10 ng/ml TGF- β ein signifikant erhöhter Wert ein.

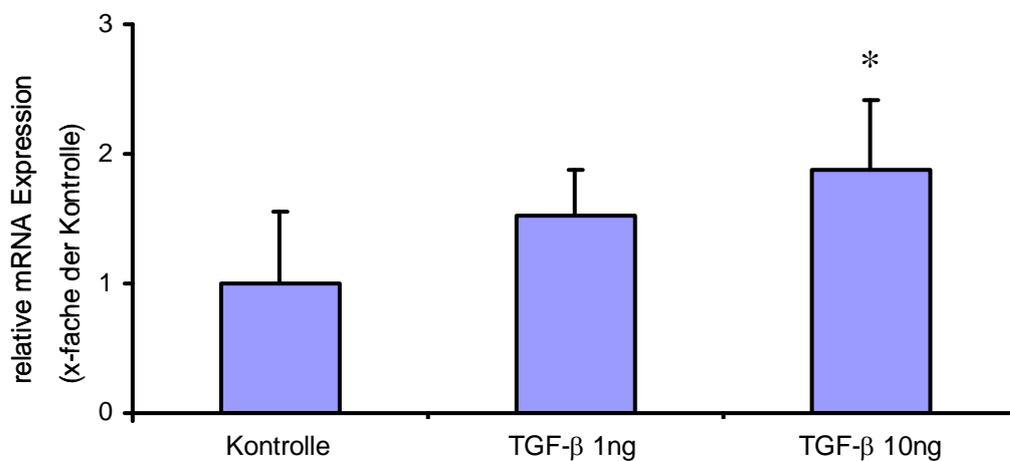


Abb. 4.1.4.2.a mRNA-Expression für Elastin nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression für Elastin nach TGF- β Stimulation (8h).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.4.3. Fibronektin

Bei diesem Versuch zeigt sich eine konzentrationsabhängige signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von Fibronektin nach Stimulation der Kardiomyozyten mit TGF- β .

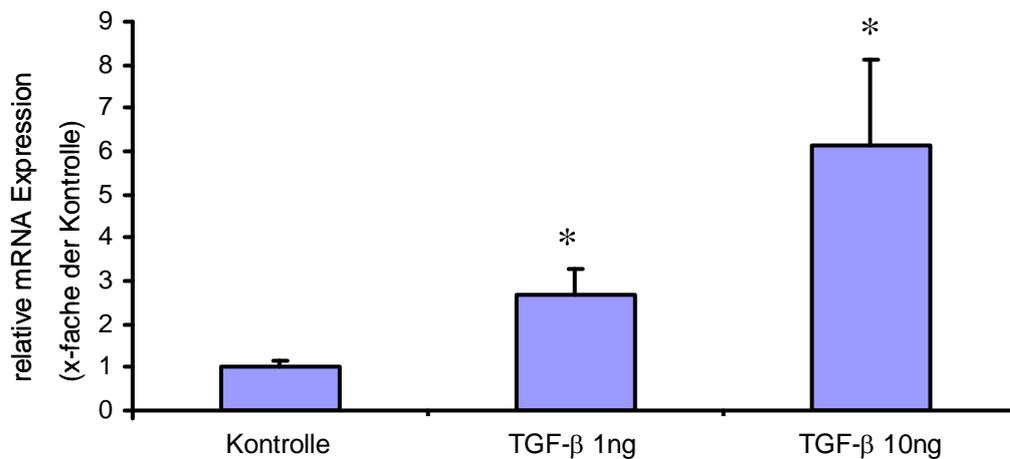


Abb. 4.1.4.3.a mRNA-Expression für Fibronektin nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression für Fibronektin nach TGF- β Stimulation (8h).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.4.4. Laminin

Auch die mRNA-Expression von Laminin stellt sich nach Stimulation mit TGF- β als konzentrationsabhängige und signifikante Erhöhung dar.

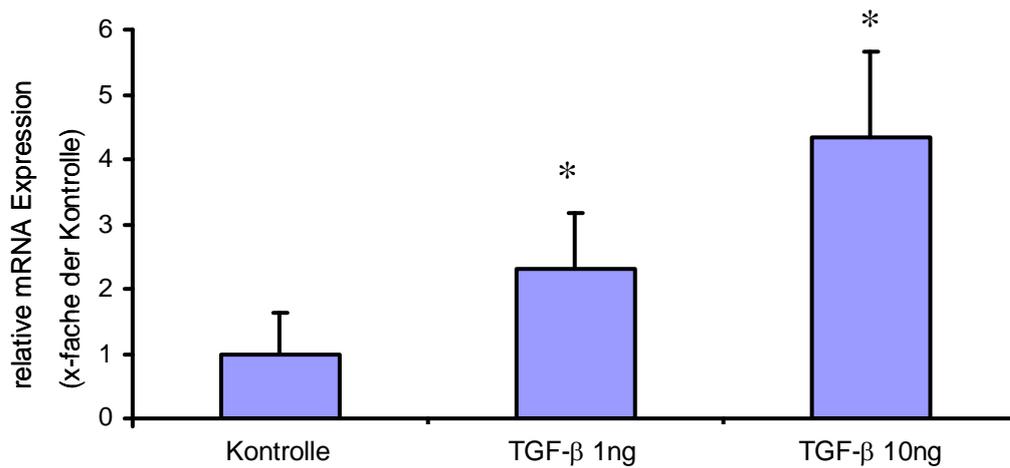


Abb. 4.1.4.4.a mRNA-Expression für Laminin nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression für Laminin nach TGF- β Stimulation (8h).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.1.4.5. Laminin-Rezeptor

Bei diesem Versuch zeigt sich keine konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression der mRNA des Laminin-Rezeptors nach Stimulation mit TGF- β . Die mRNA-Expression bei einer TGF- β -Konzentration von 1 ng/ml übersteigt nicht den Kontrollwert. Nur bei einer Konzentration von 10 ng/ml TGF- β manifestiert sich ein signifikanter Anstieg der mRNA des Laminin-Rezeptors.

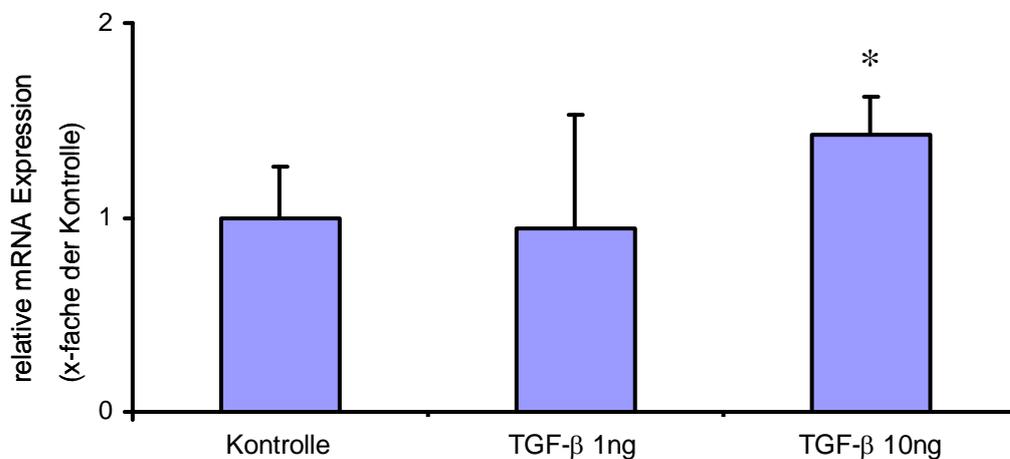


Abb. 4.1.4.5.a mRNA Expression für den Laminin-Rezeptor nach Stimulation mit TGF- β

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression für den Laminin-Rezeptor nach TGF- β Stimulation (8h).

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation ohne Zugabe von TGF- β .*

4.2. Nachweis der Beteiligung von mitogen aktivierten Proteinkinasen im TGF- β induzierten kardiomyozytären Signalling

4.2.1. Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinasen nach Stimulation mit TGF- β

Bei diesen Versuchen wurde der Phosphorylierungsgrad der MAPK JNK, p38 und p42/44 bestimmt. Die Phosphorylierung der MAPK ist gleichbedeutend mit einer Aktivierung dieser Kinasen. Die mögliche Aktivierung der Kinasen durch Stimulation mit TGF- β wird zu unterschiedlichen Zeiten gemessen. Hierzu wird die Inkubation der kultivierten Kardiomyozyten mit einer Konzentration von 10 ng/ml TGF β nach 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten beendet.

Die Abbildungen: 4.2.1.1.a - 4.2.1.3. zeigen den Phosphorylierungsgrad der einzelnen MAPK nach Stimulation mit TGF- β . TGF- β kommt in einer Konzentration von 10 ng/ml zum Einsatz. Der Phosphorylierungsgrad in adulten ventrikulären Kardiomyozyten wird zu den angegebenen Zeiten bestimmt. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Präparation, die nicht mit TGF- β stimuliert wurden.

4.2.1.1. p38-MAPK

Die hier gezeigten Ergebnisse machen sehr unterschiedliche Schwankungen in der Aktivierung der p38-MAP-Kinase deutlich. Ein signifikanter Anstieg ist bei einem Peak nach 15 Minuten gegeben, zu keinem weiteren Zeitpunkt wird dieser Wert erreicht bzw. überstiegen.

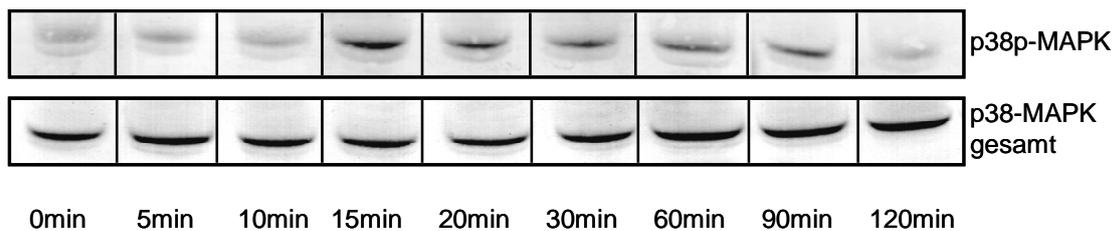


Abb. 4.2.1.1a Repräsentativer Blot der Aktivierung der p38-MAPK

Repräsentative Blots der p38-MAPK (38kDa), der obere Blot zeigt die phosphorylierte Form der p38-MAPK (p38p-MAPK), der untere die gesamt p38-MAPK.

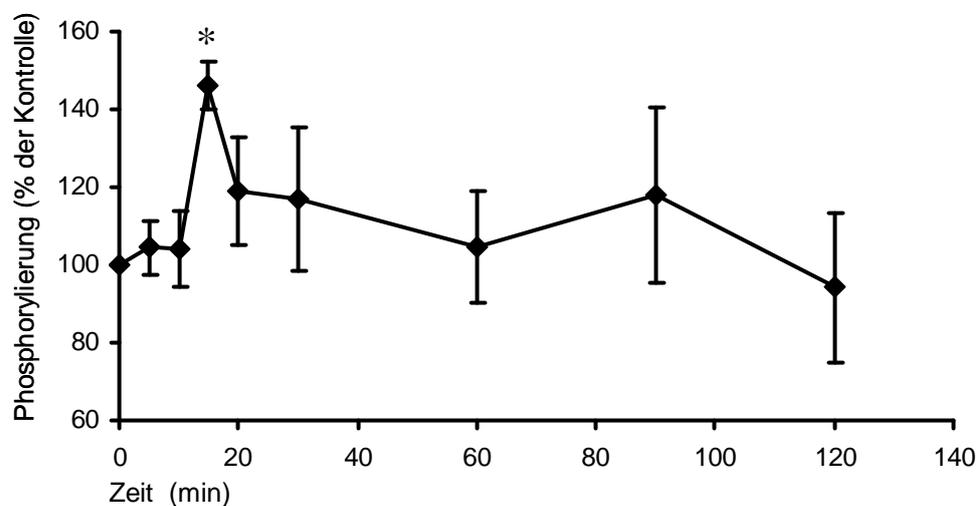


Abb. 4.2.1.1b Aktivierung der p38-MAPK

Das Aktivitätsmaximum liegt nach 15-minütiger Stimulation mit TGF- β (10ng/ml). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. Die Ergebnisse der p38 MAPK-Aktivierung werden als Verhältnis von phosphorylierter p38-MAPK zu gesamt p38-MAPK dargestellt.

4.2.1.2. JNK

Die Aktivierung der JNK nach Stimulation mit TGF- β zeigt einen biphasischen Verlauf, welcher nach 10 Minuten und nach 90 Minuten ein signifikantes Maximum zeigt.

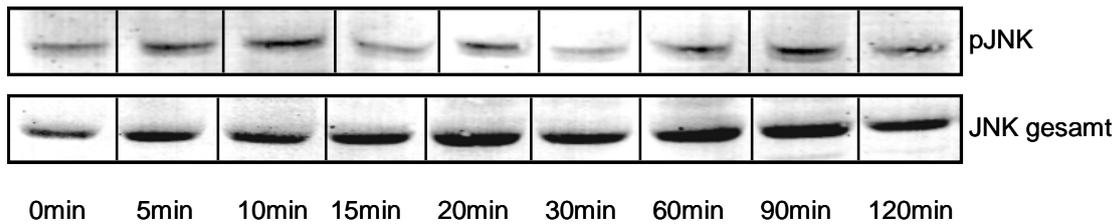


Abb. 4.2.1.2a Repräsentativer Blot der Aktivierung der JNK

Repräsentative Blots der JNK (46kDa), der obere Blot zeigt die phosphorylierte Form der JNK (pJNK), der untere die gesamt JNK.

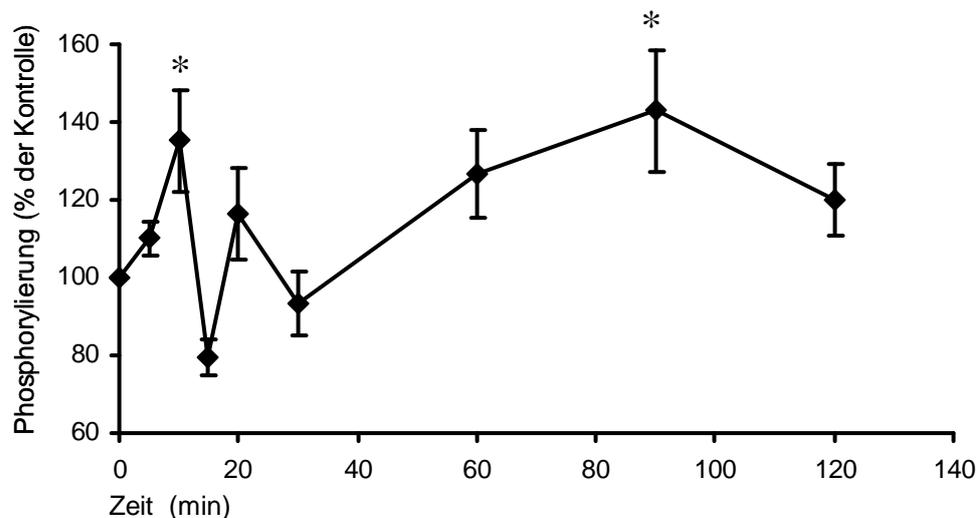


Abb. 4.2.1.2b Aktivierung der JNK

Der biphasische Verlauf der JNK-Phosphorylierung zeigt zwei Aktivitätsspitzen nach 10- und 90-minütiger Inkubation mit TGF- β (10ng/ml).

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=4 Versuchen. * = p < 0,05 versus Kontrolle. Die Ergebnisse der JNK-Aktivierung werden als Verhältnis von phosphorylierter JNK zu gesamt JNK dargestellt.

4.2.1.3. p42/44-MAPK

Die Ergebnisse der p42/44-MAPK zeigen zu keiner Zeit nach Beginn einer Stimulation mit TGF- β eine Phosphorylierung. Zwar ist ihr Verlauf auch von starken Schwankungen bestimmt, aber kein Wert übersteigt den Kontrollwert.

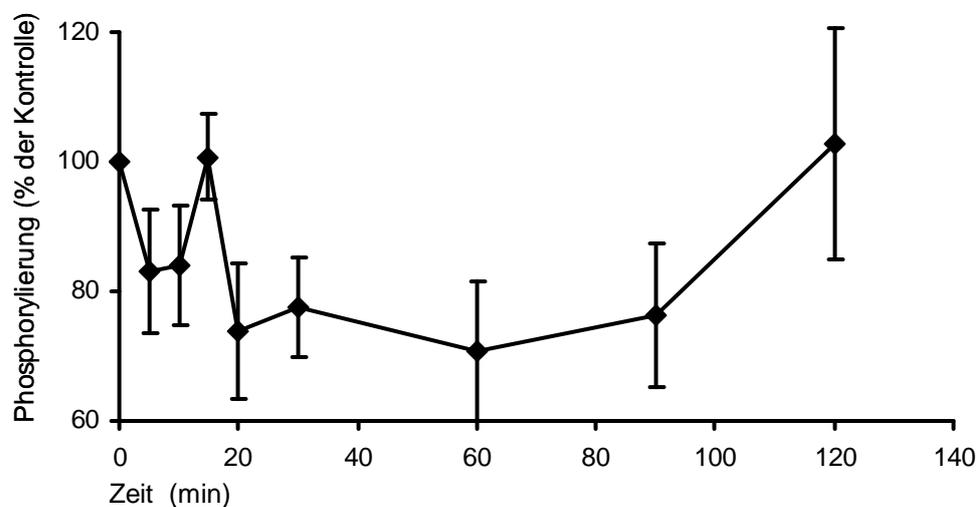


Abb. 4.2.1.3 Aktivierung der p42/44-MAPK

*Es lässt sich zu keiner Zeit eine Aktivierung der p42/44-MAPK durch TGF- β feststellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle.*

Alle drei MAPK zeigen während des untersuchten Zeitintervalls starke Schwankungen. Bei der p42/44-MAPK lässt sich keine Aktivierung erkennen, ihre Werte übersteigen zu keiner Zeit den Kontrollwert. Nach 15-minütiger Inkubation mit TGF- β zeigt die p38-MAPK einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung. Die Aktivierung der JNK zeigt einen biphasischen Verlauf mit zwei signifikanten Anstiegen der Phosphorylierung nach 10 und 90 Minuten.

4.2.2. Die Rolle der p38-MAPK und der JNK für die TGF- β induzierte Expression der untersuchten extrazellulären Matrixproteine

Um den Einfluss der MAPK auf die ECM Protein Expression zu überprüfen, wurden die beiden Kinasen JNK und p38-MAPK mit ihren entsprechenden pharmakologischen Inhibitoren gehemmt.

Nach 20-minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor wurden die Zellen mit 10 ng/ml TGF- β stimuliert. Anschließend wurde die Expression der einzelnen ECM-Proteine mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt.

Folgende pharmakologische Inhibitoren kommen in dieser Arbeit zum Einsatz:

- SP 600125, zur Hemmung der JNK, in einer Konzentration von 10 μ M
- SB 202190, zur Hemmung der p38-MAPK, in einer Konzentration von 10 μ M

Die Graphen der Abbildungen 4.2.2.1. - 4.2.2.5. zeigen die Expression der einzelnen ECM nach Stimulation mit TGF- β und spezifischer Hemmung der MAPK durch ihre pharmakologischen Inhibitoren. Hierfür wurden ebenfalls adulte ventrikuläre Kardiomyozyten verwendet, zur Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Zellkultur, sowie Zellen, die ausschließlich mit TGF- β stimuliert wurden. Zusätzlich dargestellt in den folgenden Abbildungen sind repräsentative Western Blots, sie sind alle auf Aktin nomiert.

Der alleinige Einsatz der Inhibitoren nimmt keinen Einfluss auf die basale Expression der extrazellulären Matrixproteine. Diese Werte sind hier nicht dargestellt.

4.2.2.1. Kollagen I

Bei diesen Ergebnissen zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kollagenexpression nach Stimulation mit TGF- β für 24 Stunden. Nach Inhibierung der JNK Kinase durch ihren spezifischen Inhibitor zeigt sich eine signifikante Reduktion der Kollagenexpression. Die Inhibierung der p38-MAPK scheint keinen Einfluss auf die Kollagenexpression zu nehmen, da sich die Expression nach TGF- β Stimulation auch weiterhin deutlich erhöht zeigt.

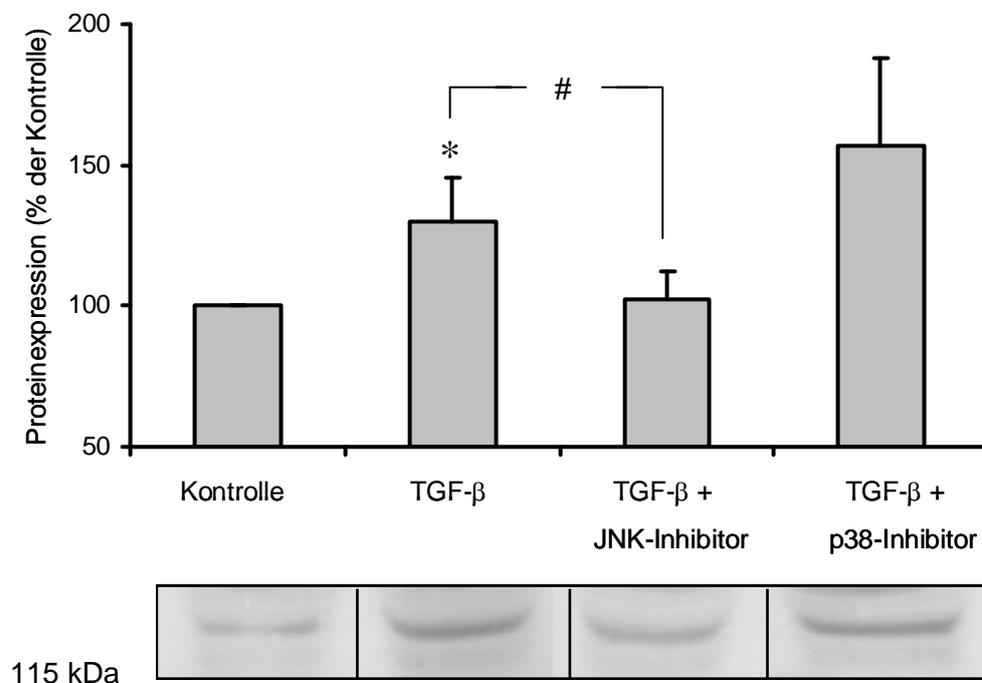


Abb. 4.2.2.1. Kollagen I-Expression nach spezifischer Hemmung der JNK und der p38-MAPK

Verminderte Kollagen I-Expression nach Hemmung der JNK, der Einsatz des p38-MAPK Inhibitors führt zu keinem Verlust der Kollagen I-Expression.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. # = $p < 0,05$ versus alleiniger TGF- β Stimulation.*

4.2.2.2. Elastin

Auch bei diesen Daten zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Elastinexpression nach Stimulation mit TGF- β für 24 Stunden. Nach Inhibierung der JNK durch ihren spezifischen Inhibitor stellt sich eine signifikante Reduktion der Elastinexpression dar. Die Inhibierung der p38-MAPK scheint nur wenig Einfluss auf die Elastinexpression zu nehmen. Die Expression unter dem Einfluss dieses Inhibitors ist im Vergleich zur Expression nach alleiniger TGF- β Stimulation tendenziell erniedrigt, es zeigt sich aber kein signifikantes Ergebnis.

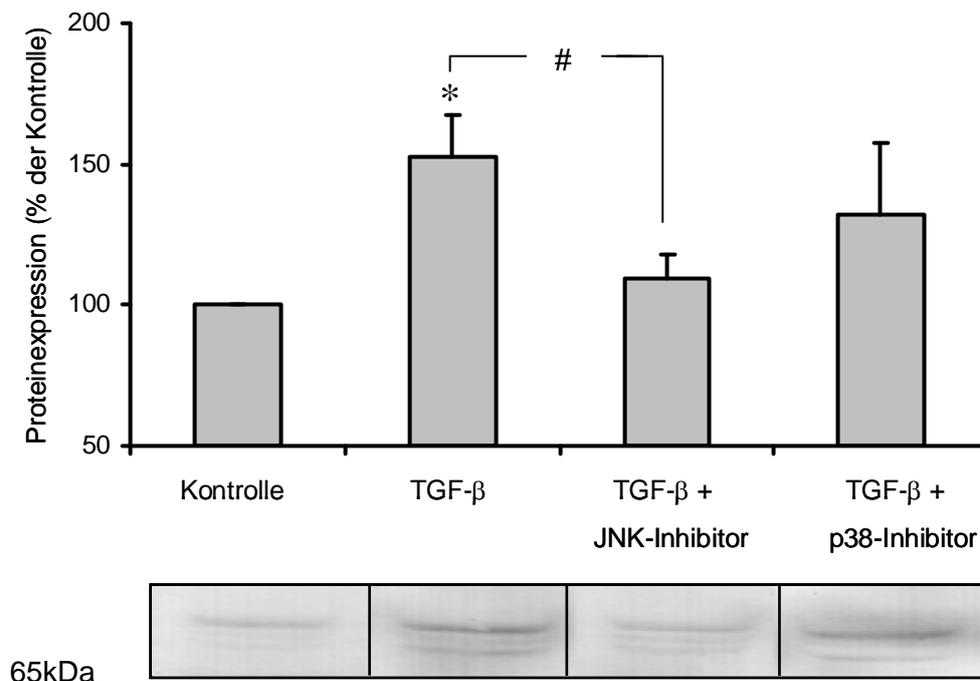


Abb. 4.2.2.2. Elastin-Expression nach spezifischer Hemmung der JNK und der p38-MAPK

*Verminderte Elastin-Expression nach spezifischer Hemmung der JNK, der Einsatz des p38-MAPK-Inhibitors führt nur zu einem geringfügigen Verlust der Elastin-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. # = $p < 0,05$ versus alleiniger TGF- β Stimulation.*

4.2.2.3. Fibronektin

In diesem Versuch ist sowohl bei der Inhibierung der p38-MAPK als auch bei der Hemmung der JNK die Fibronektinexpression signifikant gegenüber der Expression nach Stimulation mit TGF- β erniedrigt.

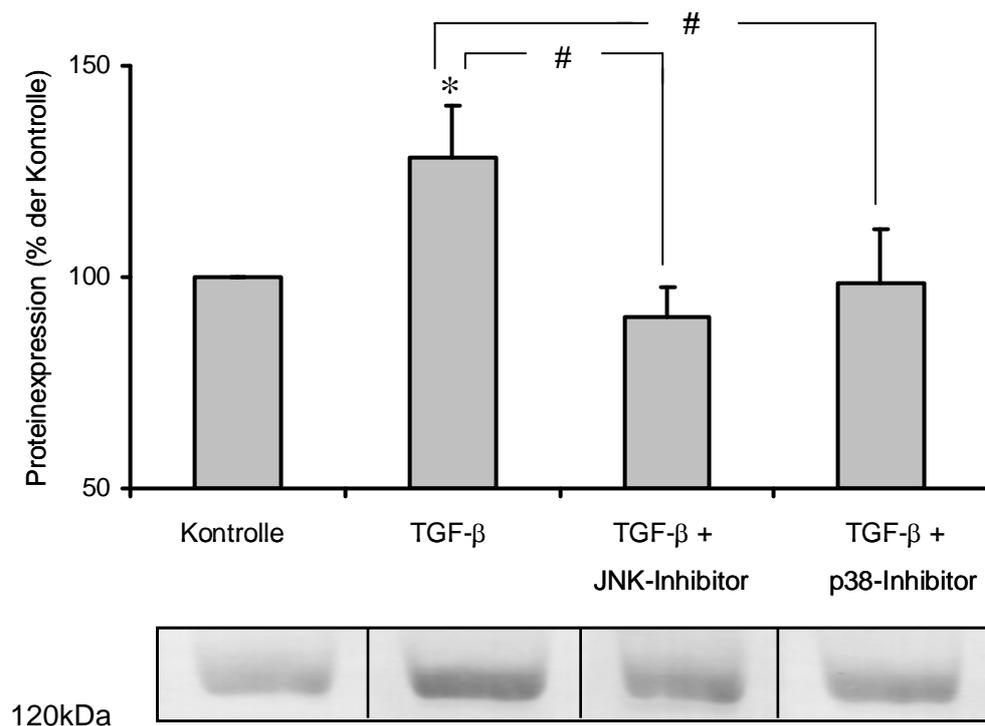


Abb. 4.2.2.3. Fibronektin Expression nach spezifischer Hemmung der JNK und der p38-MAPK

*Verlust der Fibronektin-Expression nach spezifischer Hemmung beider MAPK. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. # = $p < 0,05$ versus alleiniger TGF- β Stimulation.*

4.2.2.4. Laminin

Nach Stimulation mit TGF- β für 24 Stunden zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Lamininexpression. Die Inhibierung der beiden MAPK JNK und p38-MAPK mit ihren spezifischen Hemmstoffen führt zu keiner Reduktion der TGF- β induzierten Expression von Laminin.

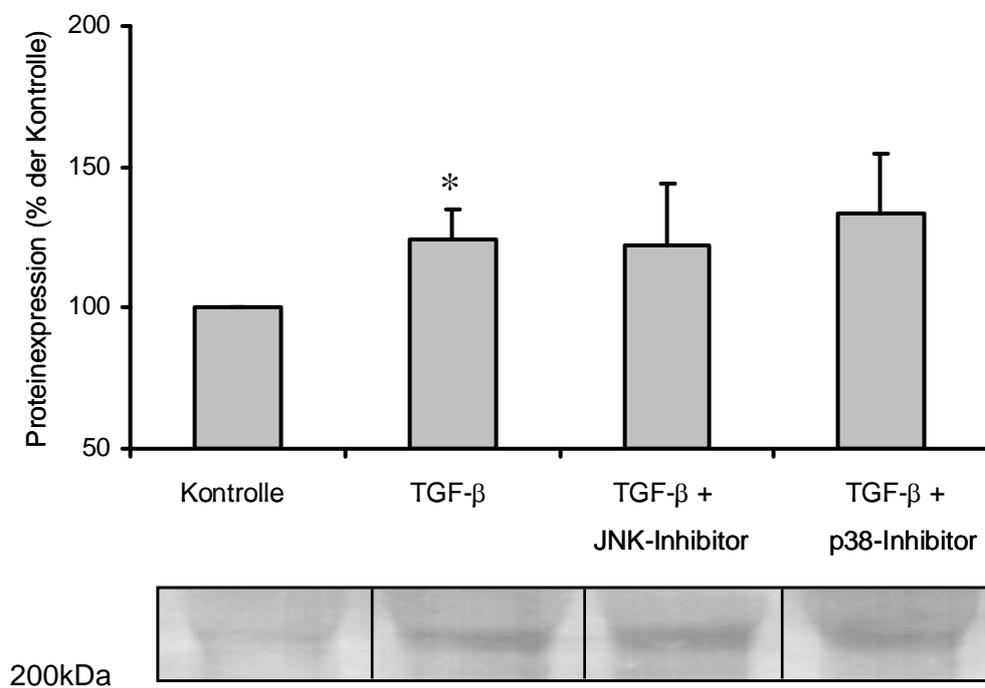


Abb. 4.2.2.4. Laminin-Expression nach spezifischer Hemmung der JNK und der p38-MAPK

Die Laminin-Expression wird durch die spezifische Hemmung der beiden MAPK nicht beeinflusst.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n=6$ Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. # = $p < 0,05$ versus alleiniger TGF- β Stimulation.*

4.2.2.5. Laminin - Rezeptor

Die Expression des Laminin-Rezeptors ist bei der spezifischen Inhibierung der p38-MAPK und der JNK signifikant gegenüber der Expression nach Stimulation mit TGF- β ohne einen Inhibitor (24h) erniedrigt. Zumindest der JNK Inhibitor scheint selbst die basale Expression des Laminin-Rezeptors (Kontrolle) unterschreiten zu lassen.

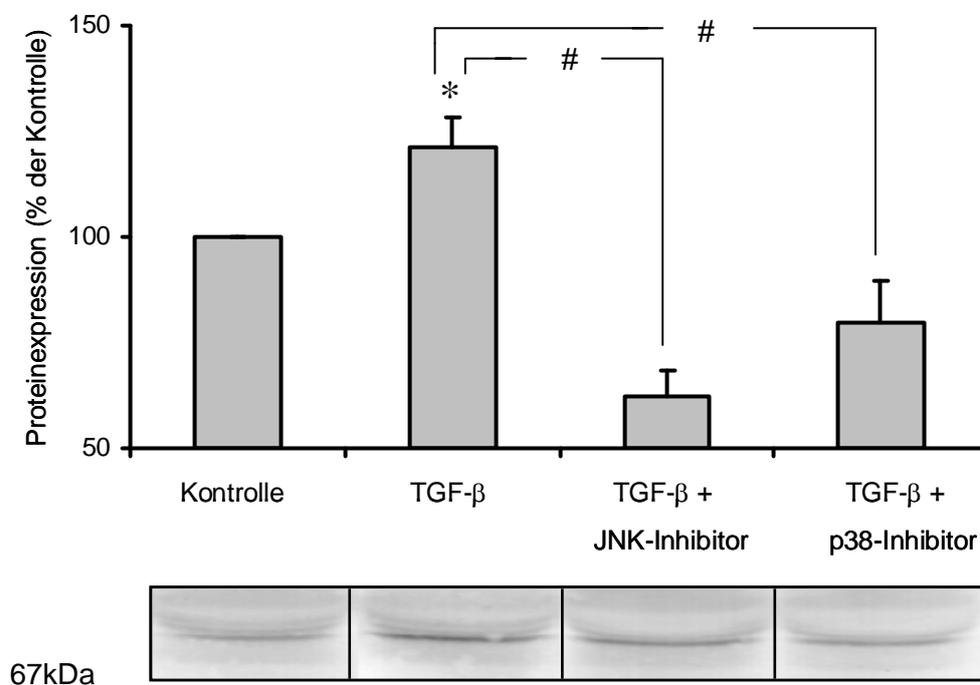


Abb. 4.2.2.5. Laminin-Rezeptor-Expression nach spezifischer Hemmung der JNK und der p38-MAPK

Signifikanter Verlust der Laminin-Rezeptor-Expression nach spezifischer Hemmung beider MAPK.

*Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen. * = $p < 0,05$ versus Kontrolle. # = $p < 0,05$ versus alleiniger TGF- β Stimulation.*

Zusammenfassend zeigt die Inhibierung der JNK eine signifikante Blockierung der TGF- β induzierten Steigerung der Kollagen- und Elastin-Expression,

wohingegen die Hemmung der p38-MAPK keinen Einfluss auf die durch TGF- β induzierte gesteigerte Expression von Kollagen und Elastin hat. Für Fibronectin und den Laminin-Rezeptor ergibt sich sowohl bei der Inhibierung der JNK als auch bei der p38-MAPK ein signifikanter Verlust der Proteinexpression nach Stimulation mit TGF- β . Bei Laminin erfolgt keine Einschränkung der Expression nach Inhibierung der MAPK.

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von TGF- β auf die Expression von extrazellulären Matrixproteinen durch Kardiomyozyten zu untersuchen. Die durch ein gesteigertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erhöhte Expression von TGF- β und dessen Funktion auf kardiale Fibroblasten ist hinreichend erforscht. Insbesondere in der Pathophysiologie der Myokardhypertrophie ist TGF- β von besonderem Interesse, da es dort vor allem am Übergang einer kompensierten zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird. Der Anstieg von TGF- β lässt sich nicht nur im Rattenmodell [Boluyt et al. (1995)] bestätigen, er wird ebenso beim Menschen beschrieben [Li et al. (1997)]. In humanen Studien konnte eine enge Korrelation zwischen Erhöhung des Plasma-Zytokinspiegels und dem Überleben von Patienten nach kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden [Deswald et al. (2001)]. Am Übergang einer kompensierten zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz verstärkt TGF- β die hypertrophe Ansprechbarkeit für β -adrenerge Stimulation und erhöht die Expression von Neuropeptid Y [Schlüter et al. (1995), Goldberg et al. (1998)]. Bislang wenig erforscht ist die autochthone Expression extrazellulärer Matrixproteine durch Kardiomyozyten unter Einfluss von TGF- β sowie die Wege des kardiomyozytären Signallings. Bislang war der Zusammenhang von TGF- β und den Veränderungen der Matrixproteinexpression immer auf die Wirkung von TGF- β auf die Proliferation und Matrixbildung kardialer Fibroblasten fokussiert. Diese Untersuchungen berücksichtigen zwei wesentliche Aspekte nicht:

1. Das Mikromilieu, welches die kontrahierenden Herzmuskelzellen umgibt besteht zum Teil aus Matrixproteinen der Herzmuskelzelle selbst und
2. die durch Fibroblasten gebildete Gewebematrix ist mit der durch Herzmuskelzellen endogen gebildeten Matrix vernetzt.

5.1. Hauptbefunde der Studie

Als entscheidende und neue Erkenntnisse im Rahmen dieser Studie sind folgende Befunde zu nennen:

- Die autochthone Expression extrazellulärer Matrixproteine und des non-integrin Laminin-Rezeptors durch Kardiomyozyten wird unter Einfluss von TGF- β forciert.
- Die TGF- β induzierte Expression extrazellulärer Matrixproteine erfolgt durch TGF- β abhängige Aktivierung der p38-MAPK und JNK.

Um die in vivo herrschenden, komplexen, systemischen Zusammenhänge auszuschließen, wurden die Versuche mittels eines Zellkulturmodells isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten angefertigt. Auf diese Weise lässt sich der Einfluss von weiteren humoralen und mechanischen Einflüssen umgehen und es ist möglich, unter definierten Kulturbedingungen den Einfluss von TGF- β auf isolierte Kardiomyozyten zu untersuchen.

5.2. Beteiligung von Kardiomyozyten an der Expression von ECM nach Stimulation mit TGF- β

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β mit einer erhöhten Expression extrazellulärer Matrixproteine antworten. Im Herzen kann diese verstärkte Expression extrazellulärer Matrixproteine in einer myokardialen Fibrose münden. Diese myokardiale Fibrose ist als eine der bedeutendsten Grundlagen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz anzusehen [Schaper & Speiser (1992)].

Neben ihren vielfältigen Aufgaben dient die extrazelluläre Matrix den Organen als strukturelles und protektives Grundgerüst. Zu den Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix gehören die strukturellen Proteine Kollagen und Fibronectin. Aus einer erhöhten Expression von extrazellulären Matrixproteinen, vor allem von Fibronectin, Laminin und Kollagen, resultiert eine Fibrose im Herzen [Jane-Lise et al. (2000)]. Das bedeutet, dass in der Entstehung einer Fibrose vor allem ihr Anteil erhöht ist. Im Falle der Fibrose kommt es über eine erhöhte Gewebesteifigkeit zu Einschränkungen der Organfunktion, die im Falle des Herzens auch zu Arrhythmien führen kann. Außerdem versteift durch die Zunahme an Bindegewebe der Ventrikel, was wiederum in Veränderungen der Füllungsphase des Ventrikels mündet. Im Allgemeinen geht eine kardiale Fibrose mit der Entstehung von Relaxationsstörungen einher. Somit kommt dem ausgewogenen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix für eine störungsfreie Organfunktion eine wichtige Rolle zu.

Die vorliegende Studie zeigt, dass im Herzen nicht nur Fibroblasten auf die Stimulation mit TGF- β reagieren, sondern auch Kardiomyozyten selbst mit einer verstärkten Synthese extrazellulärer Matrixproteine auf die Stimulation mit TGF- β antworten.

In der ersten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass es bei den extrazellulären Matrixproteinen Kollagen I, Elastin, Fibronectin und Laminin zu einem signifikanten Anstieg der Expression nach Stimulation mit TGF- β kommt. Diese Ergebnisse basieren auf dem direkten Proteinnachweis mittels Western-Blot, die jedoch auch auf mRNA Ebene mittels Real Time PCR verifiziert

werden konnten. Das bedeutet nicht nur die Transkription, das Ablesen der DNA und die anschließende Umschreibung in eine mRNA finden auf dieser Ebene statt, sondern es schließt sich eine vollständige Proteinbiosynthese an. Das heißt, die erhöhte Transkription mündet in einer tatsächlichen Translation, dem erhöhten Anstieg an extrazellulären Matrixproteinen. Die Tatsache, dass die mRNA Expression zeitlich dem Proteinmuster vorausgeht untermauert diese Aussage.

Zusätzlich kann die Studie einen weitestgehend konzentrationsabhängigen Anstieg der extrazellulären Matrixproteinexpression nachweisen. Dieser signifikante und konzentrationsabhängige Anstieg zeigt sich vor allem bei Kollagen I, Elastin und dem Laminin-Rezeptor.

Die TGF- β induzierte Expression an ECM-Proteinen stellt sich im zeitlichen Verlauf unterschiedlich dar. Die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix Kollagen I und Fibronectin reagieren verzögert auf die Stimulation und erreichen erst nach 24stündiger Inkubation das Maximum der Proteinexpression. Wohingegen die Proteine Elastin und Laminin schon nach 8 Stunden ihr Expressionmaximum erreicht haben. Der Laminin-Rezeptor reagiert ebenfalls auf TGF- β mit einem Maximum in der Expression nach 8 Stunden Inkubation. Von Bauer (2007) konnte in kardialen Fibroblasten des Schweins nach Stimulation mit TGF- β ebenfalls einen zeitabhängigen Expressionsanstieg von Kollagen III nach 2 Stunden nachweisen.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie lässt sich die Lokalisation der extrazellulären Matrixproteine im zeitlichen Verlauf verfolgen. Hierbei konnte vor allem bei Kollagen I die Zunahme der Expression im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Es lässt sich zeigen, dass die Visualisierung durch die Fluoreszenzmikroskopie konform mit der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf einhergeht. Bei beiden Methoden lässt sich nach 24stündiger Inkubation mit TGF- β das Maximum der Kollagen I-Expression darstellen. Zusätzlich ist bei Kollagen I eine Zunahme der Fluoreszenz auch außerhalb der Zelle in ihrer direkten Umgebung festzustellen. Dies stellt sich als deutliche Wolke von verstärktem Fluoreszenzlicht dar, also deutliches intensives Rot bis Gelb,

welches sich vor allem bei dem Bild nach 24-stündiger Inkubation rund um die Kardiomyozyte zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass Kardiomyozyten durchaus in der Lage sind ihr eigenes Mikromilieu durch autochthone Expression von ECM zu beeinflussen. Ähnliche Ergebnisse konnte Calvet et al. (2009) in embryonalen Mausmyozyten zeigen. Hier war die Expression allerdings abhängig von der gleichzeitigen Infektion mit Trypanosomen.

Elastin zeigt im Rahmen der Immunfluoreszenz den gleichen zeitlichen Expressionsanstieg wie im Western Blot. Hier wurde das Expressionsmaximum nach 8-stündiger Inkubation erreicht. Dies zeigt ein konformes Ergebnis zur Immunfluoreszenz. Anders als bei Kollagen I lassen sich bei Elastin, Fibronectin oder Laminin die verstärkte Freisetzung der Proteine außerhalb der Kardiomyozyte fluoreszenzmikroskopisch nicht eindeutig darstellen. Allerdings zeigt sich bei Fibronectin und Laminin eine deutliche Proteinzunahme in der Wand der Kardiomyozyte, was durchaus durch ihre physiologischen Einlagerung in die Basalmembran der Zellen zu erklären ist. Einzig der Laminin-Rezeptor bestätigt die signifikanten Ergebnisse in der Protein Expression im Rahmen der konfokalen Lasermikroskopie nicht. Aufgrund der mittels Western Blot und PCR erzielten signifikanten Ergebnisse könnte die Möglichkeit eines nicht so effizient arbeitenden Antikörpers im Bereich der Immunfluoreszenz in Betracht gezogen werden.

In Anlehnung an die Abbildung 1.7.1. der Aufgabenstellung lässt sich nun die folgende Abbildung der TGF- β induzierten Mechanismen in Kardiomyozyten vervollständigen. Siehe Abb: 5.2.1.

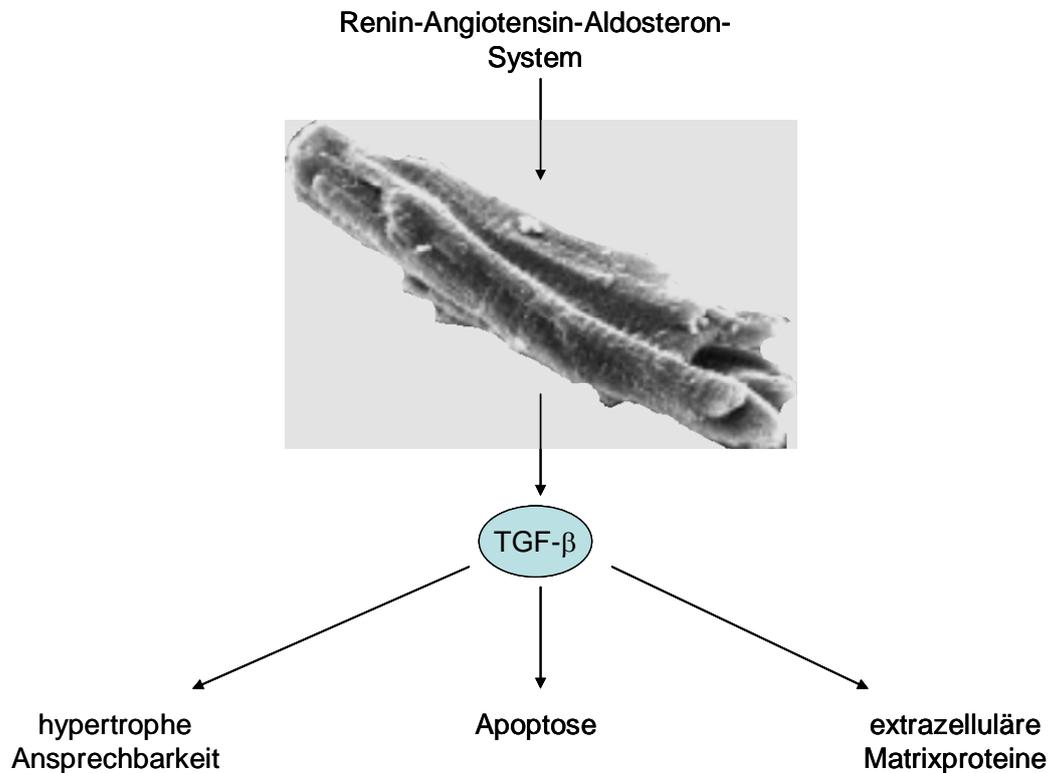


Abb. 5.2.1. Tatsächliche Mechanismen in isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten

TGF- β induzierte Mechanismen in adulten isolierten Kardiomyozyten. Die Veränderung der hypertrophen Ansprechbarkeit beta-adrenerger Stimulation und die erhöhte Apoptoserate wurden in früheren Arbeiten gezeigt. Die erhöhte Expression an ECM in Kardiomyozyten ist ein neuer Befund.

Dieses Schaubild demonstriert die Auswirkungen einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in Kardiomyozyten. Die Stimulation mit Angiotensin II erhöht die Expression von TGF- β . Dieses Zytokin induziert dann autokrin die folgenden Mechanismen:

1. Eine Veränderung der hypertrophen Ansprechbarkeit β -adrenerger Stimulation [Zhou et al. (1996), Taimor et al. (1999)]
2. Eine Erhöhung der Apoptoserate über die Transkriptionsfaktoren AP1 und smad 2/3 [Schröder et al. (2006)].

3. Eine Steigerung der Expression extrazellulärer Matrixbestandteile [Bestandteil dieser Promotionsarbeit].

5.3. Beteiligung von MAPK an der TGF- β induzierten ECM-Expression

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen stellen wichtige Signalmoleküle in verschiedenen zellphysiologischen Prozessen adulter Kardiomyozyten dar. In diese Familie gehören die, in dieser Studie untersuchten, p38-MAPK, die p42/44-MAPK (ERK) und die JNK.

Die Aktivierung der MAPK erfolgt über Phosphorylierung verschiedener vorgeschalteter Enzymkaskaden, an deren Beginn ein spezifischer Stimulus steht.

In dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass für die Kinasen p38-MAPK und JNK die Stimulation mit TGF- β ein solcher Stimulus ist. Im Gegensatz zur p42/44-MAPK konnte bei den beiden anderen eine signifikante Phosphorylierung nach exogener Applikation mit TGF- β nachgewiesen werden. Damit konnten die MAPK p38 und JNK an der TGF- β induzierten Expression extrazellulärer Matrixproteine identifiziert werden. Hocevar et al. (1999) und Hanafusa et al. (1999) beschreiben ebenfalls eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38 und JNK durch TGF- β .

Ein Ausschalten der JNK mit ihrem spezifischen Inhibitor SP 600125 zeigte bei den extrazellulären Matrixproteinen, außer bei Laminin, einen signifikanten Verlust der Proteinexpression.

Die Hemmung der p38-MAPK mit ihrem spezifischen Hemmstoff SB 202190 führt zu einem signifikanten Verlust der Expression von Fibronectin und dem Laminin-Rezeptor. Im Trend nahm auch die Expression von Elastin ab. Keinen Einfluss scheint die p38-MAPK auf die Expression von Kollagen und Laminin zu nehmen.

In der folgenden Abbildung 5.3.1. ist dies graphisch dargestellt.

Proteinexpression nach spezifischer Hemmung der jeweiligen mitogen aktivierten Proteinkinase

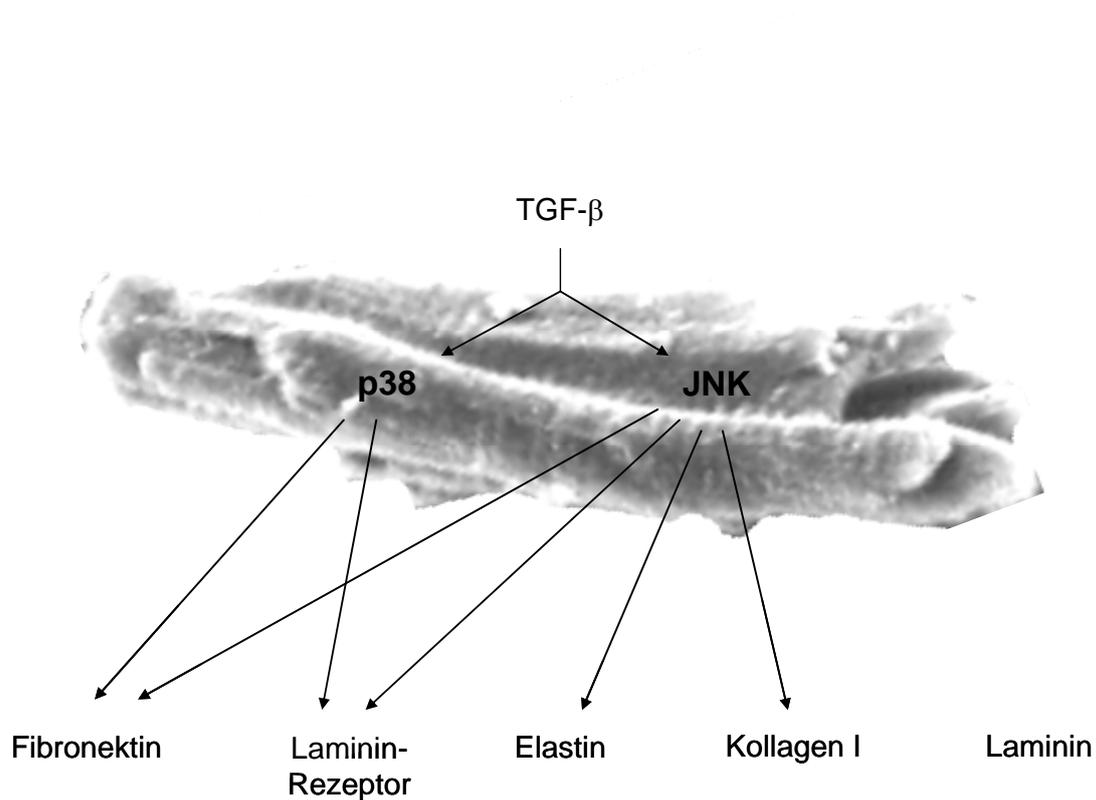


Abb. 5.3.1.

Die durchgezogenen Pfeile zeigen die signifikanten Ergebnisse der verminderten Proteinexpression nach Hemmung der p38-MAPK mit SB202190 und der JNK mit SP600125.

Ob die MAP-Kinasen im Remodelling Prozess des Herzens eine Rolle spielen wird kontrovers diskutiert. Nach Ramirez et al. (2007) spielt die JNK eine große Rolle in der Entstehung der Herzhypertrophie, wohingegen Sadoshima et al. (2002) eine protektive Funktion der JNK in MEKK 1^{-/-} Mäusen hervorheben. Auch der Einfluss der p38-MAPK wird ebenfalls kontrovers diskutiert. See et al. (2004) und Klein et al. (2005) beschreiben die Beteiligung der p38 MAP-Kinase in den Umbauprozessen des Herzens, wohingegen Frantz et al. (2007) keinen Einfluss in der Beteiligung der p38-MAPK in diesen Prozessen zu sehen scheint.

In der hier vorgestellten Studie konnte klar gezeigt werden, dass die MAP-Kinasen JNK und p38 an der TGF- β induzierten Steigerung der Expression extrazellulärer Matrixproteine beteiligt sind.

5.4. Bedeutung der p38-MAPK und der JNK für β -adrenerge Ansprechbarkeit und Apoptose

Die MAP-Kinasen p38 und JNK spielen als Signalmoleküle im Herzen eine große Rolle.

Sowohl die α - als auch die β -adrenerge Stimulation führt im Herzen zu einem hypertrophen Wachstum. Wenzel et al. (2005) konnten in einem Zellkulturmodell von isolierten ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten nachweisen, dass sowohl die Anwesenheit von TGF- β als auch die Aktivierung der p38-MAPK nötige Schritte in der β -adrenerg vermittelten Herzhypertrophie sind.

Verschiedene externe Einflüsse sind für die Aktivierung der MAP-Kinasen verantwortlich. Kuramochi et al. (2006) beschreiben die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK durch elektrische Stimulation in ventrikulären Myokardzellen adulter Ratten. Hierbei tragen sie zu einem pro-apoptotischen Effekt in den Kardiomyozyten bei. Auch oxidativer Stress induziert MAP-Kinasen. Yang et al. (2008) konnte die Aktivierung der beiden MAP-Kinasen p38 und JNK durch oxidativen Stress und die daraus folgende Apoptose der Kardiomyozyten aufzeigen. Durch Hemmung der JNK mit sodium tanshinone IIA konnte ein kardioprotektiver Effekt beschrieben werden.

Pathophysiologische Veränderungen wie Herzhypertrophie und Apoptose der Kardiomyozyten sind die ursächlichen Grundlagen für die Entstehung einer progredienten Herzinsuffizienz. Häufig geht diesen Veränderungen ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System voraus. Diese Aktivierung führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Angiotensin II [Wenzel et al. (2001)] welches über eine Aktivierung der p38-MAPK und über die Transkriptionsfaktoren GATA und AP-1 vermittelt, zu einer erhöhten TGF- β Expression führt. Das freigesetzte

TGF- β löst über eine autokrine Schleife die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD aus und führt damit zu einer Apoptose-Induktion in den Kardiomyozyten [Schröder et al. (2006)].

5.5. TGF- β signalling abseits der MAP-Kinasen p38 und JNK

Nicht nur die p38-MAPK und die JNK sind über TGF- β für Apoptose und modulierte β -adrenerge Ansprechbarkeit in Kardiomyozyten verantwortlich. In einer Studie von Schneiders et al. (2005) wurde beschrieben, dass TGF- β über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD Apoptose im Herzen auslösen kann.

Im Rahmen des TGF- β signalling spielen die Transkriptionsfaktoren SMAD eine große Rolle. Der TGF- β induzierte, SMAD abhängige Signalweg scheint v.a. einen antihypertrophen Effekt im Herz zu haben [Xiao & Zhang (2008)]. In Bezug auf die Entstehung der Herzfibrose schreibt Rosenkranz (2004) der TGF- β vermittelten SMAD Signaltransduktion eine Verringerung der Entstehung der Fibrose und auch eine Normalisierung der Herzfunktion zu. Dagegen halten Xiao & Zhang (2008), um diese Aussage zu bestätigen, weitere Untersuchungen für nötig.

Heger konnte in noch nicht publizierten Arbeiten zeigen, dass die TGF- β induzierte Kollagenexpression nicht SMAD abhängig ist.

Generell wird der Zusammenhang der TGF- β induzierten Signaltransduktion von SMAD und der p38-MAPK kontrovers diskutiert. Khimji et al. (2008) beschreiben eine Aktivierung beider Signalwege in der Wundheilung von Sternzellen in der Leber, wohingegen Margulis et al. (2008) eine SMAD unabhängige aber p38-MAPK abhängige Apoptose in Karzinomzellen der Niere beschreiben.

Außerdem konnten Chen et al. (2000) nachweisen, dass TGF- β die Synthese der extrazellulären Matrix sowohl in Fibroblasten als auch in den Kardiomyozyten über den Connective Tissue Growth Factor (CTGF) induziert.

Bei diesen Untersuchungen wurde herausgefunden, dass sowohl die mRNA von TGF- β als auch die von CTGF im linken Ventrikel und im Septum von Rattenherzen 2-16 Wochen nach einem Myokardinfarkt anstieg.

5.6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kardiomyozyten in der Lage sind ihr eigenes Mikromillieu durch die mögliche Freisetzung von ECM selbstständig zu beeinflussen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass nach Stimulation mit TGF- β Kardiomyozyten autochthon extrazelluläre Matrixproteine bilden. Die Expression der ECM folgt einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit TGF- β . Im Fall von Kollagen I lässt sich nicht nur eine Expression sondern auch eine Deposition des Proteins in die unmittelbare Umgebung der Kardiomyozyte nachweisen. Dadurch beeinflusst die Herzmuskelzelle aktiv die Zusammensetzung des sie umgebenden Mikromillieus.

In der TGF- β vermittelten Signaltransduktion in Kardiomyozyten konnten die MAP-Kinasen p38 sowie die JNK als Signalmoleküle identifiziert werden. Die Beteiligung der p42/44 MAP-Kinase kann dagegen ausgeschlossen werden, da hier keine Phosphoryllierung nach Stimulation mit TGF- β nachgewiesen werden konnte.

5.7. Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass Kardiomyozyten in der Lage sind ihr eigenes Mikromillieu zu beeinflussen. In der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. K.D. Schlüter wird der Einfluss von TGF- β auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass es nach Stimulation mit TGF- β zu

einer Abnahme der kontraktilen Funktion von Kardiomyozyten kommt. Dagegen war diese Abnahme nicht vorhanden, wenn die zu untersuchenden Zellen in Zellkulturschalen verbracht wurden, deren Böden zuvor mit Laminin beschichtet wurden.

Ob beide Effekte, die TGF- β stimulierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine und die Veränderung der kontraktilen Funktion, in Zusammenhang stehen und welche weiteren Signalwege in diesem Geschehen involviert sind, sind Gegenstand aktueller Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Charakteristische Merkmale für den fibrösen Umbau im Herzen sind eine verstärkte Expression und Deposition extrazellulärer Matrixproteine. Diese verstärkte Deposition an extrazellulärer Matrix kann Ausdruck einer gesteigerten Bildung und Freisetzung von Zytokinen sein. Insbesondere dem in dieser Studie untersuchten Zytokin Transforming growth factor- β kommt hier eine große Bedeutung zu. Es ist bekannt, dass TGF- β im Geschehen der Herzfibrose, der Apoptose, der Myokardhypertrophie sowie der kontraktilen Dysfunktion eine große Rolle spielt. TGF- β wird hauptsächlich am Übergang einer kompensierten zu einer dekompenzierten Hypertrophie vermehrt exprimiert. In Fibroblasten nimmt TGF- β einen Einfluss auf die Expression und Deposition der extrazellulären Matrix, in adulten Kardiomyozyten beeinflusst TGF- β Apoptose sowie die kontraktile Funktion und die β -adrenerg vermittelte Hypertrophie.

Bei der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf Ebene der einzelnen Kardiomyozyten die Stimulation mit TGF- β eine vermehrte Expression und Deposition extrazellulärer Matrixproteine zur Folge hat. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit TGF- β konnte ein Anstieg der Expression und Freisetzung der extrazellulären Matrixproteine Kollagen I, Fibronectin, Elastin, Laminin und Laminin-Rezeptors nachgewiesen werden. Die Expression autochthon gebildeter ECM beeinflusst das Mikromillieu der Herzmuskelzellen wesentlich.

Weiterhin wurde festgestellt, dass zwei Mitglieder aus der Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen, die JNK und die p38-MAPK, in das TGF- β vermittelte Signalling von Kardiomyozyten involviert sind. Hier konnte gezeigt werden, dass TGF- β in adulten Kardiomyozyten den Phosphorylierungsgrad vor allem der JNK aber auch der p38-MAPK erhöhen, und sie auf diese Weise aktivieren. Die Aktivierung der p38-MAPK zeigt einen monophasischen Verlauf

mit einem Peak nach 15 Minuten, wohingegen die Aktivierung der JNK einen biphasischen Verlauf nimmt. Ihre Peaks finden sich nach 10- bzw. 90-minütiger Inkubation mit TGF- β . Nach einer spezifischen Hemmung der JNK und der p38-MAPK durch ihre pharmakologischen Inhibitoren konnte eine Reduktion der Expression und Deposition extrazellulärer Matrixproteine nachgewiesen werden. Nach der spezifischen Hemmung der JNK zeigt sich eine signifikant verminderte Expression und Deposition von Kollagen I, Elastin, Fibronectin sowie des Laminin-Rezeptors. Die TGF- β induzierte Expression und Deposition von Fibronectin und des Lamin-Rezeptors wurde durch die pharmakologische Hemmung der p38-MAPK reduziert. Weder die reduzierte Aktivierung der JNK noch die der p38-MAPK nehmen einen Einfluss auf die Expression von Laminin.

Die Tatsache, dass nicht nur Fibroblasten für die Bildung extrazellulärer Matrixproteine verantwortlich sind, sondern dass das Mikromillieu direkt durch die Kardiomyozyten beeinflusst wird, wirft ein neues Licht auf die Pathologie der Entstehung der Myokardhypertrophie. Ob der Einbau der von Kardiomyozyten selbst exprimierten ECM - neben dem Einfluss auf die kontraktile Funktion - spezifische intrazelluläre Signalwegen durch Integrin und Non-Integrin Rezeptoren nutzt, bedarf weiterer Untersuchungen.

7. Summary

Characterizing features of the fibrous remodelling in the heart are accentuated expression and deposition of extracellular matrix proteins (ECM). This accentuated deposition of extracellular matrix could be manifested in a higher development and release of cytokines. In particular the examined cytokine transforming growth factor- β (TGF- β) gets a pivotal importance. It is well known, that TGF- β plays an important role in cardiac fibrosis, apoptosis, hypertrophic induction, and contractile dysfunction. This cytokine is mainly expressed during the transition of compensated to decompensated hypertrophy. In fibroblasts TGF- β influences expression of ECM. In adult cardiomyocytes TGF- β influences apoptosis, contractile function and modulation of β -adrenoceptor mediated hypertrophy.

In this study an increased expression and deposition of extracellular matrix proteins caused by stimulation with TGF- β was shown in isolated single cardiomyocytes. All examined ECM proteins (collagen I, fibronectin, laminin, elastin and the laminin-receptor) become increased expressed and released after 24h of TGF- β (10 ng/ml) treatment. This expression of autochthonically produced ECM proteins influences the micromilieu of cardiomyocytes.

Moreover JNK and p38-MAPK, two members of the family of mitogen activated proteinkinases, were identified to be involved in the TGF- β dependent signalling in cardiomyocytes. As a result it was shown that in the presence of TGF- β the degree of phosphorylation of JNK and p38-MAPK in adult cardiomyocytes was activated. p38-MAPK phosphorylation was increased monophasically after 15 min of TGF- β treatment, whereas JNK was phosphorylated biphasically 10 min and 90 min after TGF- β stimulation. After specific inhibition of both kinases by their pharmacological inhibitors a reduced expression and deposition of extracellular matrix proteins was achieved. The TGF- β mediated expression of fibronectin, collagen I, elastin and of the laminin-receptor was significantly reduced by pretreatment of cells with a pharmacological inhibitor of JNK.

Inhibition of p38- MAPK reduced the TGF- β induced increase in expression of fibronectin and of the laminin-receptor. Laminin was neither influenced by the use of the JNK inhibitor nor of the p38-MAPK inhibitor.

The fact that not only fibroblast are responsible for the production of ECM sheds a new light on the development of a pathological myocardial hypertrophy. The surrounding of myocytes is influenced autonomously. If the produced ECM insert – beside the influence in contractile function - the specific intracellular signalling pathways through integrin or non-integrin receptors needs to be further elucidated.

8. Literaturverzeichnis

Antonelli-Orlidge A, Saunders KM, Smith SR, D`Amore PA

An activated form of transforming growth factor- β is produced by coculture of endothelial cells and pericytes.

Proc Natl Acad Sci USA; 86:4544-8 (1988)

Boluyt MO, Bing OH, Lakatta EG

The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure.

Eur Heart J; 16 Suppl N:19-30 (1995)

Border WA, Ruoslahti E

Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair.

J Clin Invest; 90:1-7 (1992)

Border WA, Noble NA

Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis.

Hypertension; 31:181-8 (1998)

Breitmaier E, Jung G

Peptide und Proteine

In: Organische Chemie; Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur

Georg Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage; 792-4 (2005)

Calvet CM, Oliveira FO Jr, Araújo-Jorge TC, Pereira MC.

Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes.

Int J Med Microbiol; 299:301-12 (2009)

Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH

CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis.

J Mol Cell Cardiol; 32:1805-19 (2000)

Coker ML, Thomas CV, Clair MJ, Hendrick JW, Krombach RS, Galis ZS, Spinale FG

Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure.

Am J Physiol; 274:1516-23 (1998)

Deswald A, Petersen NJ, Feldmann AM, Young JB, White BG, Mann DL

Cytokines and cytokine receptor in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST)

Circulation; 103:2055-9 (2001)

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM

Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease.

Circulation Research; 77:863 (1995)

Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LM

Angiotensin II - mediated phenotypic cardiomyocyte remodelling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure.

Hypertension; 46:426-32 (2005)

Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R

Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin.

Science; 262:900-2 (1993)

Erdmann E

Ursachen der akuten und chronischen Herzinsuffizienz

In: Herzinsuffizienz; Ursachen, Pathophysiologie und Therapie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 3. Auflage; 3 (2003)

Frantz S, Behr T, Hu K, Fraccarollo D, Strotman J, Goldberg E, Ertl G, Angermann CE, Bauersachs J

Role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac remodelling.

Br J Pharmacol; 150:130-5 (2007)

Frey RS, Mulder KM

Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase-activation by transforming growth factor- β in the negative growth control of breast cancer cells.

Cancer Res; 57:628-33 (1997)

Fuller SJ, Gaitanaki CJ, Sugden PH

Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. Stimulation of translation is mediated through the alpha 1-adrenoceptor.

Biochem J; 266:727-36 (1990)

Garrat AN, Humphries MJ

Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors.

Acta Anat (Basel); 154:34-45 (1995)

Gloe T, Pohl U.

Laminin binding conveys mechanosensing in endothelial cells.

News Physiol Sci; 17, 166-9 (2002)

Goldberg Y, Taimor G, Piper HM, Schlüter KD

Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y.

Am J Physiol; 275:C1207-15 (1998)

Gurfinkel EP, Lernoud VS

Prevention of myocardial infarction.

Curr Opin Cardiol; 21:503-9 (2006)

Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E

Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression.

J Biol Chem; 274:27161-7 (1999)

Hay ED

Collagen and embryonic development

In: Cell Biology of Extracellular Matrix

Plenum Press, New York, London, 2.Auflage 379-410 (1983)

Haynes RO

Fibronektine

Spektrum der Wissenschaft; 7:80-90 (1986)

He ZY, Feng B, Yang SL, Luo HL

Intracardiac basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 mRNA and their proteins expression level in patients with pressure or volume overload right or left ventricular hypertrophy.

Acta Cardiol; 60:21-5 (2005)

Heenemann S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, Cleutjens KB, Daemen MJ

The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis

The Journal of Pathology, 200:516-25 (2001)

Heine Hartmut

Struktur- und Vernetzungsglykoproteine

In: Lehrbuch der biologischen Medizin; Grundlagen und Systematik

Hippokrates Verlag Stuttgart, 1 Auflage; 66-8 (1991)

Hinz, B

Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.

J Invest Dermatol; 127:526-37 (2007)

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G

The myofibroblast: one function, multiple origins.

Am J Pathol; 170:1807-16 (2007)

Hocevar BA, Brown TL, Howe PH

TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway.

EMBO J; 18:1345-56 (1999)

Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L

The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure.

Heart Failure Rev; 5:239-50 (2000)

Kannel WB

Incidence and epidemiology of heart failure.

Heart Fail Rev; 67:167-173 (2000)

Khimji AK, Shao R, Rockey DC

Divergent transforming growth factor-beta signalling in hepatic stellate cells after liver injury: functional effects on ECE-1 regulation.

Am J Pathol; 173:716-27 (2008)

Kim DJ, Park SH, Lim CS, Chun JS, Kim JK, Song WK.

Cellular localization of integrin isoforms in phenylephrine-induced hypertrophic cardiac myocytes.

Cell Biochem Funct; 21:41-8. (2003)

Klein G, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Oppermann D, Shukla P, Quint A, Podewski E, Hilfiker A, Schröder F, Leitges M, Drexler H

Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PK Cepsilon.

Circ Res; 96:748-55 (2005)

Kuramochi Y, Guo X, Sawyer DB, Lim CC

Rapid electrical stimulation induces early activation of kinase signal transduction pathways and apoptosis in adult rat ventricular myocytes.

Exp Physiol; 91:773-80 (2006)

Kyhse-Anderson J

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J Biochem Biophys Methods; 10:203-9 (1984)

Laemmli UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature; 227:680-85 (1970)

Laiho M, Keski-Oja J

Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis - a review.

Cancer Res; 49:2533-53 (1989)

Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT, Williams WG

Overexpression of transforming growth factor-beta 1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy.

Circulation; 96:874-81 (1997)

Li YY, McTiernan CF, Feldmann AM

Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodelling.

Cardiovasc Res; 46:214-24 (2000)

Lijnen PJ, Petrow VV, Fagard RH

Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).

Molecular Genetics and Metabolism; 71:418-35 (2000)

Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL

Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium.

J Cell Biol; 106:1659-65 (1988)

Manabe I, Shindo T, Nagai R

Gene expression in fibroblasts and fibrosis. Involvement in cardiac hypertrophy

Circulation Research; 91:1103 (2002)

Margulis V, Maity T, Zhang XY, Cooper SJ, Copland JA, Wood CG

Typ III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediates apoptosis in renal cell carcinoma independent of canonical TGF-beta signalling pathway.

Clin Cancer Res; 14:5722-30 (2008)

Markou T, Lazou A

Phosphorylation and activation of mitogen- and stress- activated protein kinase-1 in adult rat cardiac myocytes by G-Protein-coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase.

Biochem J; 365:757-63 (2002)

Marshall CJ

Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.

Cell; 80:179-85 (1995)

Massague J.

The transforming growth factor- β family.

Ann Rev Biochem; 6:597-641 (1990)

Massague J.

TGF- β signal transduction.

Ann Rev Biochem; 67:753-91 (1998)

Mc Kee PA, Castelli WP, Mc.Namara PM, Kannel WB

The natural history of congestive heart failure: the Framingham study.

N Engl J Med; 285:1441-6 (1971)

Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR

Cytokines and cardiovascular disease.

J Leukoc Biol; 78:805-18 (2005)

Meurer DG

Entzündung

In: AllgemeinePathologie; Kompendium für die Veterinärmedizin

F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 1. Auflage, 7 (1999)

Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Nakajima T, Oda K, Iwaska T

Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

Circ Res; 84:1073-84 (1999)

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter JF, Spieckermann PJ

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J Mol Cell Cardiol; 14:397-412 (1982)

Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH

The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy.

J Biol Chem; 272:14057-61 (1997)

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C

Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: Role in aldosterone-salt-induced fibrosis

Hypertension; 33:981-6 (1999)

Rosenkranz S

TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodelling.

Cardiovasc Res; 63:423-32 (2004)

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schlüter KD, Böhm M

Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β 1.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 283:H1253-H62 (2002)

Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, Vatner SF

The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy.

J Clin Invest; 110:271-9 (2002)

Schaper J, Speiser B

The extracellular matrix in the failing human heart.

Basic Res Cardiol; 87:303-9 (1992)

Schild D

Laser scanning microscopy and calcium imaging.

Cell Calcium; 19:281-96 (1996)

Schlüter KD, Zhou XJ, Piper HM

Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes.

Am. J. Physiol; 269:C1311-6 (1995)

Schlüter KD, Simm A, Schäfer M

Early response kinase and PI3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy.

Am J Physiol; 276:H1655-63 (1999)

Schmelter M

Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf die Endothelzell- und Kardiomyozytendifferenzierung embryonaler Stammzellen der Maus.

Inaugural-Dissertation, Justus Liebig Universität Giessen (2007)

Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G.

SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes.

Cardiovasc Res; 67:87-96 (2005)

Schröder D, Heger J, Piper HM, Euler G

Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta 1 signalling in ventricular cardiomyocytes of rat.

J Mol Med; 84:975-83 (2006)

Schuppan D, Somasundaram R, Dietrich W, Ehnis T, Bauer M

The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation.

Ann N Y Acad Sci; 733:87-103 (1994)

Schwarzbauer JE

Fibronectin: From gene to protein.

Curr Opin Cell Biol; 3:786-91 (1991)

See F, Thomas W, Way K, Tanidis A, Kompa A, Lewis D, Itescu S, Krum H

P38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodelling following myocardial infarction in the rat.

J AM Coll Cardiol; 44:1679-89 (2004)

Shih NL, Cheng TH, Loh SH, Cheng PY, Wang DL, Chen YS, Liu SH, Liew CC, Chen JJ

Reactive oxygen species modulate angiotensin II-induced beta-myosin heavy chain gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in neonatal rat cardiomyocytes.

Biochem Biophys Res Commun; 283:143-8 (2001)

Silbernagl S, Lang F

Fibrose und Zirrhose der Leber

In: Taschenatlas der Pathophysiologie

Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York; 2.korrigierte Auflage, 6 (2005)

Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C

Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: Effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis.

Circulation; 99:2694-701 (1999)

Simon EE, McDonald JA.

Extracellular matrix receptors in the kidney cortex.

Am J Physiol; 259, F783-92 (1990)

Speiser B, Riess CF, Schaper J

The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV and VI

Cardioscience; 2:225-32 (1991)

Taimor G, Schlüter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM

Autocrine regulation of TGF beta expression in adult cardiomyocytes.

J Moll Cell Cardiol; 31:2127-36 (1999)

Tomy PM, Anilkumar NP, Sudhakaran PR

Multiple laminin binding proteins in human fetal heart.

Develop Growth & Differ; 36:333-40 (1994)

Tryggvason K

The laminin family.

Curr Opin Cell Biol; 5:877-82 (1993)

Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA

Transforming growth factor beta (TGF-beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts.

Biochem J; 247:597-604 (1987)

Volpin D, Urry DW, Cox BA, Gotte L

Optical diffraction of tropoelastin and alpha-elastin coacervates

Biochem Biophys Acta; 439:253-8 (1976)

Von Bauer H-R

Auswirkungen von Ischämien und Reperfusion auf kardiale Fibroblasten

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin (2007)

Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schlüter KD

Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes.

FASEB J; 15:2291-3 (2001)

Wenzel S, Müller C, Piper HM, Schlüter KD

P38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling.

Eur J Heart Fail; 7:453-60 (2005)

Wilke A, Schönian U, Herzum M, Hengstenberg C, Hufnagel G, Brilla CG, Maisch B

Extrazelluläre Matrix und Zytoskelett des Myokards bei kardialer Entzündungsreaktion.

Herz; 20:95-108 (1995)

Wynn TA

Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.

J Pathol; 214:199-210 (2008)

Xiao H, Zhang Y-Y

Understanding the role of transforming growth factor- β signalling in the heart: overview of studies using genetic mouse models

Clin Exp Pharmacol and Physiol; 35:335-341 (2008)

Yang R, Liu A, Ma X, Li L, Su D, Liu J

Sodium tanshinone IIA sulfonate protects cardiomyocytes against oxidative stress-mediated apoptosis through inhibiting JNK activation.

J Cardiovasc Pharmacol; 51:396-401 (2008)

Zhou XJ, Schlüter KD, Piper HM

Hypertrophic responsiveness to α_2 -adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes.

Mol Cell Biochem; 163-164:211-6 (1996)

Zhu YC, Zhu YZ, Lu N, Wang MJ, Wang YX, Yao T

Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling.

Clin Exp Pharmacol Physiol; 30:911-18 (2003)

9. Veröffentlichungen

Henning K, Habbig AB, Wenzel S, Schlüter KD

TGF-beta induced deposition of ECM proteins with resulting loss of contractile function in ventricular cardiac myocytes.

Acta physiologica, 189, Suppl. 653, P17-L6-07 (2007)

Henning K, Wenzel S, Habbig AB, Schlüter KD

TGF-beta induzierte Deposition extrazellulärer Matrix bei gleichzeitigem Verlust der kontraktilen Funktion in adulten Kardiomyozyten.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie Herz und Kreislaufforschung e.v. 73. Jahrestagung, Congress Centrum Mannheim (2007).

Sibylle Wenzel, Kirsten Henning, Andreas Habbig, Sascha Kassecker, Rolf Schreckenberger, Hagen Maxeiner, Hans Michael Piper, Klaus-Dieter Schlüter
Matrix deposition by adult ventricular cardiomyocytes: Notable role for TGFbeta
Eingereicht 2009, FASBJ

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Kirsten Henning

Pfaffenwiesbach, Januar 2009

11. Danksagung

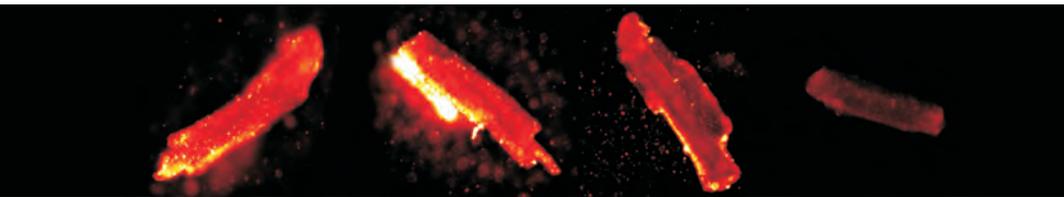
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin für die Bereitstellung des Themas, für die nicht endenden Anregungen und seine Geduld und Freundlichkeit, sowie für die nicht selbstverständliche finanzielle Unterstützung in Form eines Hausstipendiums.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sibylle Wenzel bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit ihrer fachlichen Unterstützung außerordentlich viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

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

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die freundliche Unterstützung danken. Allen voran Nadine Woitasky die nie müde wurde meine Fragen zu beantworten und Daniela Schreiber für die Korrektur dieser Arbeit. Meinen Mitdoktoranden vor allem Bettina Meyering und Alexandra Dingendorf danke ich für ihre Unterstützung und für eine schöne Doktorandenzeit.

Danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Motivation, meinem Mann Mark für die vielen Nerven die ich ihn gekostet habe und die Geduld mit der er mein Computerwissen erweitert hat. Meinem Bruder Jens danke ich für die geduldige computertechnische Unterstützung. Mein letzter ganz besondere Dank gilt meinen Eltern ohne die ich nie das geworden wäre was ich jetzt bin.



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5558-6



9 417 83833 17 53383