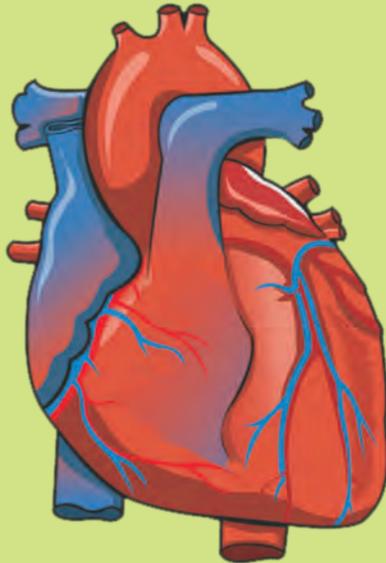


GDF 15 ALS ANTI-APOPTOTISCHER UND
PRO-HYPERTROPHER FAKTOR IN VENTRIKULÄREN
HERZMUSKELZELLEN DER RATTE

EIK SCHIEGNITZ



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin 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 2011

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 2011

© 2011 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

GDF 15 als anti-apoptotischer und pro-hypertropher Faktor in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte

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

vorgelegt von

Eik Schiegnitz
aus Würzburg

Gießen 2010

Aus dem Physiologischen Institut

Leiter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachterin: Prof. Dr. G. Euler

Gutachter: PD Dr. Sedding

Tag der Disputation: 02.02.2011

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Myokardiale Apoptose	4
1.1.1 Physiologie und Bedeutung der Apoptose	4
1.1.2 Apoptose in Herzmuskelzellen	7
1.1.3 Die Signaltransduktionskaskade von TGF- β bei der Apoptose	8
1.1.4 Der Wachstumsfaktor GDF 15 und Apoptose	11
1.2 Myokardiale Hypertrophie	15
1.2.1 Physiologie und Bedeutung der Myokardhypertrophie	15
1.2.2 Die adrenerge Signaltransduktion bei der myokardialen Hypertrophie	17
1.2.3 Der Wachstumsfaktor GDF 15 und Hypertrophie	19
1.3 Zielsetzung	22
2 Material	23
2.1 Vielfach verwendete Chemikalien	23
2.2 Puffer und Lösungen	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.2 Retardation-Assay	26
2.2.3 Immunologischer Proteinnachweis	28
2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	31
2.3 Geräte und Laborbedarf	31
2.3.1 Zellkultur	31
2.3.2 Retardation Assay	31
2.3.3 Immunologischer Proteinnachweis	32
2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.3.5 Hoechst 33258/Propidiumjodid-Doppelfärbung	32
2.3.6 Sonstige Geräte	32
2.4 Verbrauchsmaterialien	33
2.5 Software	33
3 Methoden	34
3.1 Isolierung ventrikulärer Herzmuskelzellen	34
3.1.1 Versuchstiere	34

3.1.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus dem Rattenherz.....	34
3.2 Zellkultur isolierter Herzmuskelzellen der Ratte	35
3.2.1 Vor- und Ausplattierung.....	35
3.2.2 Kultivierung isolierter Herzmuskelzellen	36
3.3 Transformation der Herzmuskelzellen mittels Decoy-Oligonukleotiden	36
3.4 Retardation Assay.....	37
3.4.1 Kernextraktion	37
3.4.2 Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide	37
3.4.3 Spezifische Bindung der Oligonukleotide an das Protein	38
3.4.4 Gelelektrophorese	38
3.5 Immunologischer Proteinnachweis	39
3.5.1 Proteinisolation für den ERK-Nachweis.....	39
3.5.2 Proteinisolation für den SMAD-Nachweis.....	40
3.5.3 Proteinmengenbestimmung mit dem Lowry Assay.....	40
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.5.5 Western-Blot-Verfahren.....	41
3.5.6 Immunologische Nachweisverfahren.....	42
3.6 Methoden zur Erfassung von Apoptose in Herzmuskelzellen	44
3.6.1 Apoptosestimulation in isolierten Herzmuskelzellen.....	44
3.6.2 Die Hoechst 33258/Propidiumiodid-Doppelfärbung.....	44
3.7 Methoden zur Erfassung von Hypertrophie in Herzmuskelzellen.....	45
3.7.1 Hypertrophiestimulation in isolierten Herzmuskelzellen.....	45
3.7.2 Bestimmung der Proteinsyntheserate nach Bradford	45
3.7.3 Hypertrophieerfassung durch Ermittlung der Cross Sectional Area	46
3.8 Statistische Auswertung.....	47
4 Ergebnisse.....	48
4.1 GDF 15 induziert keine Apoptose in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte ...	48
4.2 Die anti-apoptotischen Effekte von GDF 15.....	49
4.2.1 Inhibition der TGF- β induzierten Apoptose.....	49
4.2.2 Inhibition der SNAP induzierten Apoptose.....	50
4.2.3 Inhibition der Angiotensin II-Apoptoseinduktion.....	51
4.2.4 Aktivierung von SMAD1,5 aber nicht von SMAD2-Proteinen	52
4.3 GDF 15 induziert Hypertrophie in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte.....	53

4.4 Die Signalwege von GDF 15 in der kardialen Hypertrophie	56
4.4.1 GDF 15 induziert Hypertrophie über die Proteinkinase C.....	56
4.4.2 GDF 15 induziert Hypertrophie über die PI3-Kinase.....	57
4.4.3 GDF 15 induziert Hypertrophie über die ERK.....	58
4.4.4 GDF 15 induziert Hypertrophie über den Transkriptionsfaktor SMAD	59
5 Diskussion	63
5.1 Die anti-apoptotischen Effekte von GDF 15	63
5.2 Die pro-hypertrophen Effekte von GDF 15.....	68
5.3 Die Signaltransduktion von GDF 15 bei der kardialen Hypertrophie	72
5.3.1 GDF 15 und die Proteinkinase C.....	73
5.3.2 GDF 15 und die PI3-Kinase.....	74
5.3.3 GDF 15 und die ERK.....	75
5.3.4 GDF 15 und die SMAD-Proteine	76
5.4 Ausblick.....	78
6 Zusammenfassung.....	80
7 Summary	82
8 Literaturverzeichnis	84
9 Eigene Veröffentlichungen	96
10 Erklärung.....	98
11 Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
γ 32P-ATP	γ 32P-Adenosintriphosphat
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammonium-Persulfat
Aqua bidest.	aqua bidestillata
Aqua demin.	aqua demineralisata
BNP	brain natriuretisches Peptid
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CHI	Chronische Herzinsuffizienz
cpm	counts per minute (Zählvorgänge pro Minute)
CRE	cAMP-responsive element
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase

FCS	fetal calve serum (fetales Kälberserum)
GDF 15	Growth-differentiation factor 15
GSNO	S-Nitrosoglutathione
h	Stunden
HCL	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1 -piperazin
Hoe	Hoechst Farbstoff H33258
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Sythase
I/R	Ischämie/Reperfusion
ISO	Isoprenalin
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MIC-1	Macrophage Inhibitory Cytokine-1
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl der Versuche
nM	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSTE-ACS	Non-ST-segment-elevation acute coronar syndrom
NSTEMI	Non-ST-segment-elevation myocardial infarction
NYHA	New York Heart Association

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
proGDF 15	Precursor Form des Growth-differentiation factor 15
RNA	ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
SCR	scrambled Decoy-Oligonukleotiden
SMAD	small mother against decapentaplegic
SNAP	(±)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
STEMI	ST-Segment-Elevation-Infarkt
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF-β	Transforming growth factor β
TRE	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat responsive element
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V	Volt
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Myokardiale Apoptose

1.1.1 Physiologie und Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose ist als physiologischer, programmierter Zelltod definiert. Sie dient der Einstellung und Aufrechterhaltung eines exakt festgelegten biologischen Gleichgewichtes in sämtlichen Geweben und Organen. Dieser genetisch bestimmte und stark kontrollierte Prozess des Absterbens von Zellen besteht nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei Pflanzen und allgemein bei allen vielzelligen Organismen. Allein diese Aufrechterhaltung im Laufe der Evolution deutet auf ihre enorme physiologische Bedeutung hin. Die Analyse dieses altruistischen Zelltodes begann bereits im 19. Jahrhundert anhand von morphologischen Beobachtungen (Flemming, 1885; Nissen, 1886) und ist bis heute ein hochaktuelles Thema in der Forschung, wie die Vergabe des Nobelpreises für Medizin oder Physiologie im Jahre 2002 zeigt. Hierbei wurden Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston für ihre Forschungen auf dem Gebiet der genetischen Regulation der Organentwicklung und des programmierten Zelltods ausgezeichnet.

Die Apoptose hat einen gezielten Zelluntergang zur Folge und stellt einen aktiven Prozess der Zelle dar. Morphologisch ist sie durch geordnete Zellveränderungen gekennzeichnet (Cohen, 1993). Dabei kommt es zu einer Zellschrumpfung, einer maximalen Chromatinkondensation und Bildung von charakteristischen Ausstülpungen an der Zellmembran. Im schrumpfenden Zellkern erfolgt eine enzymatische Spaltung der DNA durch Endonukleasen (Wyllie, 1980; Arends et al., 1990; Zhivotovsky et al., 1994). Dabei entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 180 - 200 Basenpaaren (Wyllie, 1980).

Typisches Merkmal der Apoptose ist dabei die Aufrechterhaltung der Membranintegrität und des osmotischen Gradienten unter Abschnürung von Zellbestandteilen, die von einer Membran umschlossen sind (blebbing) und als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) bezeichnet werden. Die schrumpfende Zelle und die apoptotischen Körperchen werden von umgebenden Zellen an

Membranveränderungen, wie z.B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran, erkannt und phagozytiert. Um die Phagozytose zu erleichtern, reduziert die apoptotische Zelle ihr Volumen. Sie pumpt Ionen, vor allem K⁺, nach außen und kontrahiert ihr Zytoskelett. All diese Vorgänge sind nicht mit Entzündungsreaktionen assoziiert (Kerr et al., 1972). Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose, welche den akuten, unvorhergesehenen Zelltod beschreibt, zu einer Zellschwellung und Zellberstung mit einer nachfolgenden Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes.

Die Apoptose wird durch zwei Hauptsignalwege initiiert (Abb. 1.1). Der extrinsische Signalweg ist abhängig von einer Rezeptoraktivierung (Ashkenazi et al., 1998), der intrinsische Weg wird durch die Freisetzung von Apoptose-auslösenden Faktoren aus den Mitochondrien angeregt (Kroemer et al., 1997). An der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion sind unter anderem Fas- und TNF-Rezeptoren beteiligt. Bei einer Rezeptoraktivierung binden spezifische Proteine an die sog. zytosolische „Todesdomäne“. Dies führt zu einer Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, an denen vor allem intrazelluläre Proteasen, die Caspasen beteiligt sind (Ashkenazi et al., 1998). Caspasen sind in der Lage, eine Reihe von zellulären Strukturproteinen zu spalten und führen unter anderem auch zur Aktivierung endogener DNasen. Die oben genannten Rezeptoren aktivieren über verschiedene intermediäre Enzyme Caspase 3, das ein Schlüsselenzym für die Ausführung von Apoptose ist. Durch Caspase 3 wird direkt oder indirekt die Spaltung vieler zellulärer Proteine, eine Fragmentation der nukleären DNA, Veränderungen des Zytoskeletts und eine Desintegration der Zelle vermittelt (Enari et al., 1998). Der intrinsische Reaktionsweg der Apoptose wird beispielsweise durch verschiedene zytotoxische Stoffe, DNA-Schäden oder Oncogene (Fearnhead et al., 1998) ausgelöst. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen Caspase-aktivierenden Stoffen aus den Mitochondrien (Kroemer et al., 1997). Der weitere Reaktionsweg verläuft auch hier Caspase-abhängig (Slee et al., 1999).

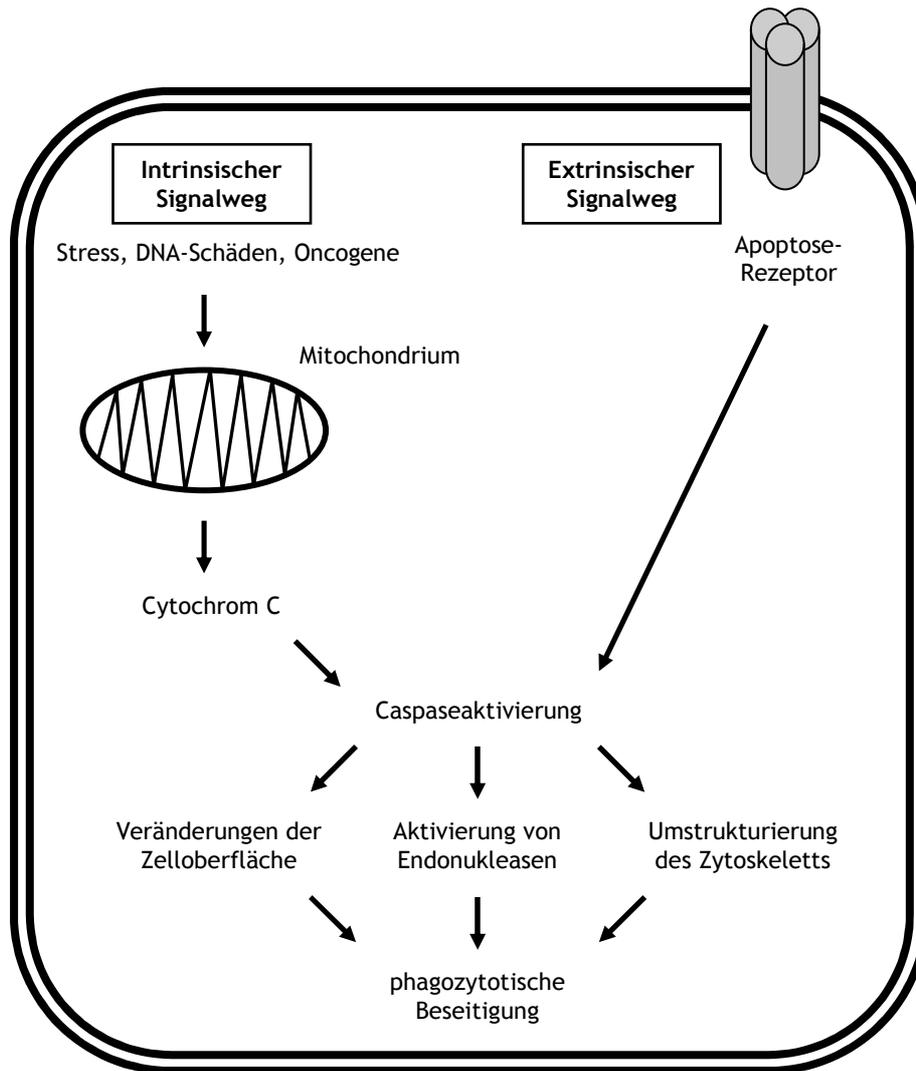


Abb. 1.1: Schema des Apoptosevorgangs: Sowohl die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien als auch die Ligandenbindung von extrazellulären Signalen an TNF-Rezeptoren führen zu einer Caspaseaktivierung. Dieser folgt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, einer Endonukleasenaktivierung und eine Veränderung der Zelloberfläche. Zellkomponenten werden in Membranvesikeln abgeschnürt und anschließend von phagozytierenden Zellen aufgenommen.

Im menschlichen Organismus werden jede Sekunde ca. 100.000 Zellen durch Mitose neu gebildet. Zur Erhaltung der Gewebemöostase wird eine entsprechende Anzahl an Zellen durch Apoptose entfernt, so dass insgesamt ca. 99,9 % aller menschlichen Zellen im Laufe des Lebens durch Apoptose beseitigt werden (Vaux et Korsmeyer, 1999). Sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus kann über Zellproliferation und Apoptose die jeweilige Zellzahl reguliert und an die funktionellen Anforderungen angepasst werden. Des Weiteren können beschädigte, mit intrazellulären Erregern infizierte Zellen oder Tumorzellen durch Apoptose

entfernt werden. Ebenfalls hat die Apoptose in der Pathophysiologie eine enorme Bedeutung. So kommt es bei vielen Krebsarten zu einer Inaktivierung der Apoptose und somit zu einer Zellwucherung (Wyllie, 1997). Zugleich spielt die Apoptose bei infektiösen Krankheitsbildern wie z.B. allgemein viralen Infektionen, AIDS, bakterielle Meningitis und Prionenerkrankungen, Atherosklerose und Neurodegenerative Krankheiten eine wichtige Rolle (Bauer et al., 2000).

1.1.2 Apoptose in Herzmuskelzellen

Auch im Herzen wurde bei verschiedenen Erkrankungen ein Zellverlust durch Apoptose nachgewiesen. So liegt im insuffizienten Herzen eine geringe, aber signifikant erhöhte Apoptoserate vor – ca. 0,1% der Kardiomyozyten vs. 0,001% im gesunden Herzen (Kempf et al., 2007). Apoptotische Herzmuskelzellen wurden in Autopsiematerial von Patienten mit der Diagnose Kardiomyopathie (Narula et al., 1996) und bei Zustand nach Herzinfarkt (Saraste et al., 1997) gefunden. Diese Erkenntnisse konnten *in vivo* an Ratten mit Myokardinfarkt (Kajustura et al., 1996) und nach Ischämie/Reperfusion (Fliss et Gattinger, 1996) bekräftigt werden.

Des Weiteren zeigten experimentelle Studien, dass ein geringer, aber kontinuierlicher Zellverlust durch Apoptose zu einer Herzinsuffizienz führen kann (Wencker et al., 2003). Entsprechend erzielten Caspase-Inhibitoren protektive Effekte bei Herzinsuffizienz (Donath et al., 2006). Nach simulierter Aortenstenose kommt es bei Verlust anti-apoptotischer Faktoren wie beispielsweise des Apoptose-Repressors mit Caspasen-Rekrutierungsdomäne (ARC) zu einer akzelerierten Herzinsuffizienz. Die Expression von ARC ist bei Patienten mit Herzinsuffizienz herunterreguliert, was auf eine mögliche pathophysiologische Bedeutung dieser Befunde beim Menschen hinweist (Donath et al., 2006).

Um die Frage zu klären, ob allein durch ischämische Bedingungen in Herzmuskelzellen Apoptose auslösbar ist, wurden an isolierten Herzmuskelzellen ischämische Bedingungen simuliert. In neonatalen Herzmuskelzellen, die sich in vielen Signalwegen evident von adulten Herzmuskelzellen unterscheiden, wurde Apoptose durch lang anhaltende Hypoxie induziert (Tanaka et al., 1994; Fliss et

Gattinger, 1996). In isolierten adulten Herzmuskelzellen konnte durch Sauerstoffentzug dagegen keine Apoptose ausgelöst werden (Taimor et al., 1999). Dies lässt darauf schließen, dass durch Ischämie/Reperfusion Faktoren von anderen Zelltypen des Herzens freigesetzt werden, die für die Apoptoseinduktion im ischämischen/reperfundiertem Bereich des Herzens verantwortlich sind. Stickstoffmonoxid (NO) und der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) sind hierfür potentielle pro-apoptotische Faktoren (Taimor et al., 1999; Taimor et al., 2006).

1.1.3 Die Signaltransduktionskaskade von TGF- β bei der Apoptose

TGF- β ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie und ein ubiquitäres und multipotentes Zytokin. Es werden die drei Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 unterschieden. Diese Isoformen sind sich sehr ähnlich und haben auch übergreifende Funktionen (Border et al., 1998; Massague, 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde TGF- β 1 verwendet, welches der Einfachheit halber nur als TGF- β bezeichnet wird. Dessen dreigliedrige Struktur aus Signalpeptid für die Sekretion, Prodomäne und reifem Protein stimmt mit dem charakteristischen Aufbau sezernierter Signalmoleküle überein. Die biologisch aktive Form des TGF- β ist ein Homodimer, bestehend aus zwei jeweils 12,5 kD großen Peptiden, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Böttner et al., 2000; Dennler et al., 2002).

Die biologischen Wirkungen von TGF- β sind sehr vielförmig und hängen in erheblichem Maße von der Zielzelle, deren Differenzierungsgrad sowie Aktivierungszustand und auch von den lokalen Charakteristika der Extrazellulärsubstanz ab. Auf diese Weise schließt das Spektrum der TGF- β Effekte sogar gegensätzliche physiologische Reaktionen ein. Zu den biologischen Wirkungen zählen unter anderem die Regulation zellulärer, physiologischer Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose in der Embryonalentwicklung bis hin zur Homöostaseaufrechterhaltung adulter Gewebe (Massague, 1998; Herpin et al., 2004; Elliott et Blobe, 2005). Im Herzen ist TGF- β nach Infarkt erhöht und wird vor allem in der Randzone des Infarkts gefunden (Deten et al., 2001). Auch an fibrotischen Umbauprozessen (Remodeling) im Narbenbereich

und im gesamten Ventrikel (Bujak et Frangogiannis, 2007) und an der Hypertrophiereaktion nach Herzinfarkt ist TGF- β beteiligt (Schultz et al., 2002). Im Herzmuskel und in anderen Geweben wie z.B. der Leber und dem Epithel ist TGF- β als Apoptose auslösender Faktor bekannt (Yamamura et al., 2000).

Die Apoptoseinduktion erfolgt dabei durch das Anbinden von TGF- β an spezielle Serin-Threonin-Kinase-Rezeptorsysteme, welche aus den Rezeptortypen I und II bestehen. Diese Rezeptoren sind Glykoproteine und zählen zur Klasse der transmembranen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Ist TGF- β am Rezeptorkomplex an den Typ II-Rezeptor gebunden, kann dieser den Typ I-Rezeptors durch eine Phosphorylierung aktivieren. Aktivierte Typ I-Rezeptoren können im Anschluss mit einer Reihe von spezifischen, zytoplasmatischen Proteinen interagieren (Shi et Massague, 2003).

Als bedeutendste Gruppe ist hier die Familie der SMAD-Proteine zu nennen. SMAD-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und wesentliche Komponenten des TGF- β -Signal-Systems bei der Vermittlung pathophysiologischer Effekte wie Apoptose und Fibrose in der Herzmuskelzelle (Euler-Taimor et al., 2006). Nach deren strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden die SMADs in drei Klassen untergliedert: rezeptorregulierte R-SMADs (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8), Co-SMADs (SMAD 4) und inhibitorische I-SMADs (SMAD6, SMAD7) (Dennler et al., 2002). Die SMADs werden dabei nicht nur von TGF- β über Phosphorylierung aktiviert, sondern zugleich wird durch TGF- β ihre Bindungsaffinität zu ihren spezifischen Bindungsstellen erhöht (Schröder et al., 2006). Für den TGF- β Signalweg von entscheidender Bedeutung sind vor allem SMAD2 und SMAD3 (Nakao et al., 1997). Nach deren Aktivierung bilden die R-Smads über ihre MH2-Domänen Komplexe mit dem Co-SMAD 4 (Abb. 1.2). Der gebildete SMAD-Proteinkomplex wandert in den Nukleus, wo dieser mithilfe von weiteren Cofaktoren die Transkription von Genen reguliert und moduliert, welche die Differenzierung betreffende patho-biologische Effekte wie Fibrose und Apoptose vermitteln (Euler-Taimor et al., 2006).

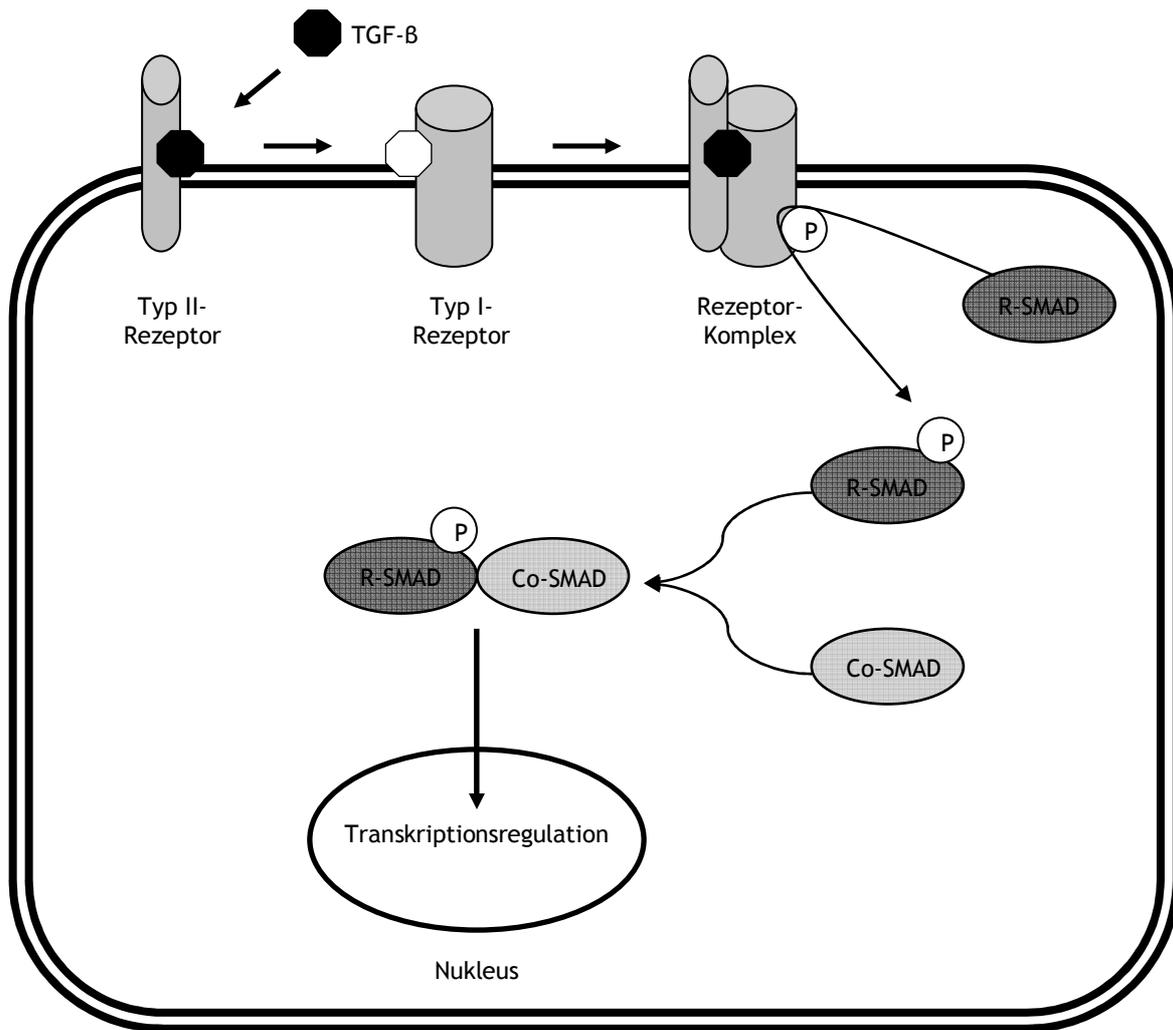


Abb. 1.2: Die TGF- β Signaltransduktion: Bindung von TGF- β an einen spezifischen Typ II Rezeptor, Dimerisierung von diesem Rezeptor und dem Typ I-Rezeptor, Phosphorylierung intrazellulärer R-SMADs durch den aktivierten Rezeptorkomplex, Bildung heteromerer Komplexe aus R-SMADs und Co-SMADs, sowie Transduktion dieser in den Nucleus, wo diese direkt die Transkriptionsregulation beeinflussen.

1.1.4 Der Wachstumsfaktor GDF 15 und Apoptose

Growth-differentiation factor 15 (GDF 15) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie und wurde zunächst unter dem Namen Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) bekannt. Bootcov et al. (1997) isolierten MIC-1 aus der cDNS aktivierter Makrophagen. Dabei erhielt MIC-1 seinen Namen, weil es die Lipopolysaccharid induzierte TNF- α Freisetzung hemmte. Die Charakterisierung als TGF- β Familienmitglied erfolgte aufgrund der typischen Dimer-Struktur, die sich aus sieben Cysteinresten zusammensetzt. Die Aminosäuresequenz-Homologie von GDF 15 zu anderen TGF- β Zytokinen ist jedoch trotz der strukturellen Ähnlichkeiten gering. Sie liegt zwischen 15 % bei TGF- β und 29 % bei BMP. Diese Ergebnisse stellen GDF 15 möglicherweise als erstes Mitglied einer neuen Subfamilie dar (Bootcov et al., 1997).

Analog zu anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie wird GDF 15 als Precursor-Protein synthetisiert. Dieses Vorläufermolekül wird strukturell in das Signalpeptid, die Prodomäne und den physiologisch aktiven Molekülabschnitt gegliedert. Das Signalpeptid leitet das Vorläufermolekül auf dem Weg zum Export durch die Zelle. Die so genannte Prodomäne ist dafür verantwortlich, dass sich das Molekül korrekt faltet. Dieser Teil sorgt auch für die Verbindung eines einzelnen Moleküls mit einem zweiten zu einem Dimer. Ferner regelt sie die biologische Aktivität des Moleküls. Eine kurze Domäne (RXXR) folgt der Prodomäne. Dieser Teil sorgt für die korrekte Abspaltung des reifen, die eigentliche biologische Aktivität tragenden Molekülabschnitts (Unsicker, 2001).

GDF 15 wird in der Plazenta und der Prostata hochgradig exprimiert, liegt jedoch in allen anderen Geweben unter physiologischen Bedingungen in einer niedrigen Konzentration vor (Bootcov et al., 1997; Tan et al., 2000). Als Antwort auf pathologische Reize kann die GDF 15 Synthese jedoch signifikant zunehmen. Beispielsweise stieg die GDF 15 Konzentration in Hepatozyten nach toxischem Leberschaden (Hsiao et al., 2000) und in kortikalen Neuronen nach kryogenen Schäden erheblich an (Schober et al., 2001). Diese Reaktionen werden möglicherweise dadurch erklärt, dass der GDF 15 Promotor Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren p53, AP-1, und EGR-1 aufweist (Baek et al., 2001; Böttner et

al., 1999; Tan et al., 2000). Diese Transkriptionsfaktoren werden vor allem bei zellulärem Schaden unterschiedlicher Genese induziert und können bei oxidativem Stress und Ischämie die Transkription ihrer Zielgene aktivieren. Des Weiteren spielen sie im Rahmen von Zellüberleben und Zelltod eine bedeutende Rolle (Lyn et al., 2000; Sasaki et al., 1999; Yan et al., 2000).

Entsprechend der Expressionserhöhung von GDF 15 bei zellulärem Stress und Verletzungen, wurden erhöhte GDF 15 Konzentration bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen, wie beispielsweise dem Bronchialkarzinom (Tan et al., 2000), dem Mammakarzinom (Welsh et al., 2003) und dem Pankreaskarzinom (Li et al., 2000). Zudem wurde GDF 15 beim Prostatakarzinom als neuer, unabhängiger Diagnosemarker beschrieben (Brown et al., 2006). Beim kolorektalen Karzinom korrelierte der GDF 15 Spiegel mit der Tumorausdehnung und gilt als unabhängiger Prädiktor für Metastasen und die Überlebenszeit (Brown et al., 2003). In den meisten Untersuchungen wurde dabei eine anti-tumorigene Wirkung von GDF 15 *in vitro* und *in vivo* dargestellt. Diese sind sowohl auf eine Hemmung des G1-Zellzyklus als auch auf eine pro-apoptotische Wirkung auf Tumorzellen zurückzuführen (Li et al., 2000; Tan et al., 2000).

Eine weitere interessante Entdeckung war, dass GDF 15 in Tumoren zumeist als unprozessierte, Propeptid enthaltende Precursor Form sezerniert und im Bereich der extrazellulären Matrix über das Propeptid als Anker gespeichert wurde (Abb. 1.3). Hierbei regulierte das Propeptid das Gleichgewicht zwischen den Speichern der Extrazellulären Matrix und dem Serumspiegel des reifen GDF 15 Proteins. Das Fehlen des Propeptids führte zu einem 20-fachen Anstieg der GDF 15 Konzentration (Bauskin et al., 2006). Diese Ergebnisse sind von enormer pathophysiologischer Relevanz, da der proGDF 15 Spiegel in der Extrazellulären Matrix mit der Prognose von Prostatakarzinompatienten nach radikaler Prostataektomie assoziiert war (Bauskin et al., 2005). Ein abnehmendes proGDF 15 Level stellte dabei einen unabhängigen Prädiktor für ein Tumorrezidiv dar. Da das unprozessierte proGDF 15 in vielen verschiedenen Tumoren sezerniert wird, erscheint es möglich, durch lokale Modulation der Bioverfügbarkeit von GDF 15 die klinische Prognose von Patienten mit Tumorleiden zu verbessern. Auch im Herzen könnte dieses Phänomen der extrazellulären Prozessierung von GDF 15 vorliegen, da im Zellkulturüberstand von

kultivierte Kardiomyozyten reifes GDF 15 gefunden wurde (Kempf et al., 2006). Ob diese Befunde von ähnlicher wichtiger pathophysiologischer Bedeutung wie bei malignen Erkrankungen sind, muss durch weitere Studien geklärt werden.

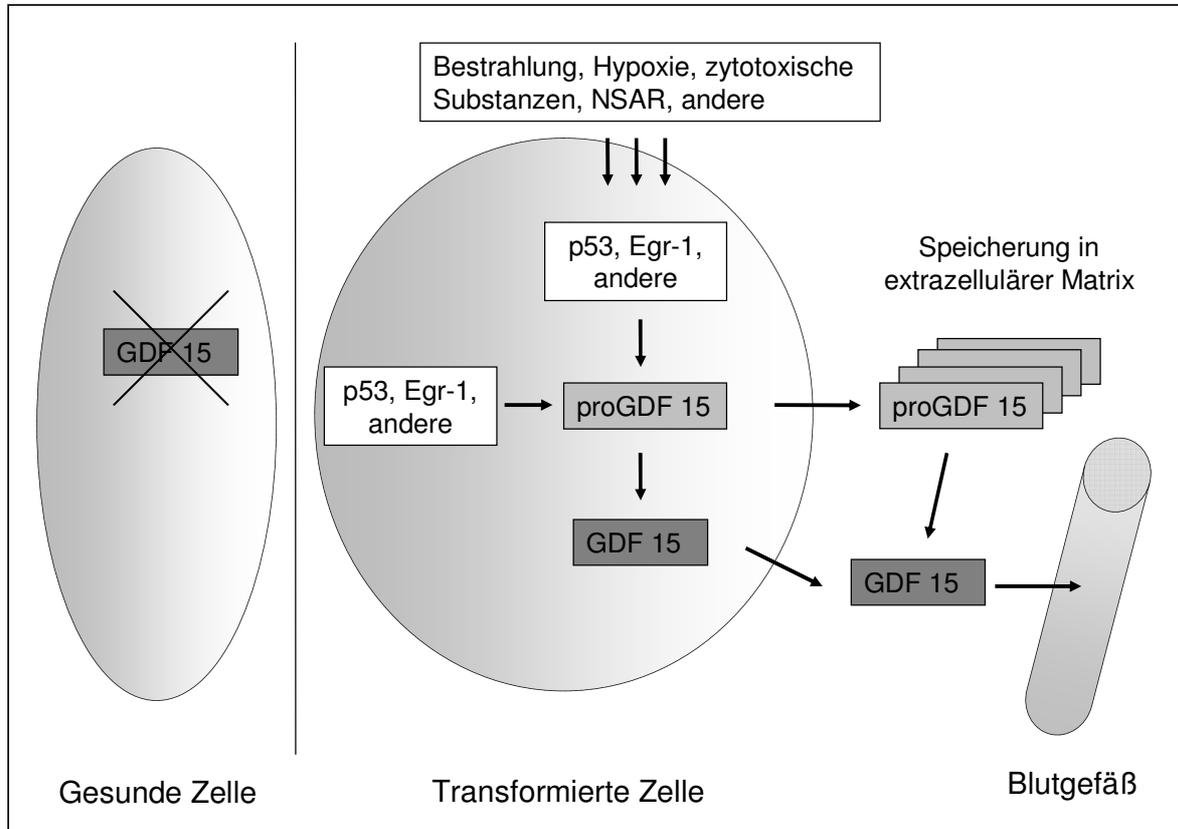


Abb. 1.3: GDF 15 in der Tumorgnese: Unter normalen Bedingungen liegt in Epithelzellen keine bis eine sehr geringe GDF 15 Expression vor. Bei neoplastischer Transformation steigt die GDF 15 Sekretion jedoch drastisch an. Diese Reaktion wird durch anti-tumorigene Stimuli wie Bestrahlung, zytotoxische Substanzen, Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), etc. verstärkt. Die Bioverfügbarkeit von GDF 15 wird dabei durch extrazelluläre Speicherung von unprozessiertem proGDF 15 reguliert. Nur diese unprozessierte Form bindet an die Extrazelluläre Matrix, wohingegen reifes GDF 15 frei löslich in das umgebende Bindegewebe und in Blutgefäße diffundieren kann. Somit reguliert sowohl der Umfang der intrazellulären als auch der extrazellulären Prozessierung das Level an physiologisch aktivem GDF 15. Abbildung modifiziert nach Bauskin et al. (2006)

In der Schwangerschaft erfolgte ein signifikanter Anstieg der GDF 15 Konzentration in Abhängigkeit von der Schwangerschaftswoche (Moore et al., 2000). Dabei soll GDF 15 durch Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine das fetale Überleben im Uterus erhalten. Daneben wurde GDF 15 bei Präeklampsie vermehrt gebildet und vermittelte die Apoptose der Zytotrophoblasten auf Kosten der Differenzierung (Li et

al., 2005). In cerebellaren Neuronen reduzierte GDF 15 dagegen die Apoptoserate und wirkte somit als neuronaler Überlebensfaktor (Subramaniam et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GDF 15 sowohl eine wichtige Rolle in Zelltod- als auch Zellüberlebensprozessen spielt und eine enorme Bedeutsamkeit in physiologischen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen innehat.

In Herzmuskelzellen war die GDF 15 Expression nach Ischämie/Reperfusion (I/R) und in irreversibel geschädigten Myokardbereichen deutlich erhöht (Kempf et al., 2006). Der Ausgangspunkt erhöhter GDF 15 Induktion und Sekretion lag dabei im ischämischen Myokard selbst. Außerdem war die GDF 15 Induktion bei Kardiomyopathie gesteigert (Xu et al., 2006) und erhöhte GDF 15 Werte wurden bei Patienten im Herzmuskel gefunden, die an einem akuten Koronarsyndrom verstorbenen waren (Kempf et al., 2006). Folglich kann GDF 15 als Teil eines komplexen genetischen Programms angesehen werden, welches als Antwort auf externe Stressfaktoren aktiviert wird (Wollert, 2007a). Zudem zeigten klinische Studien, dass bei Frauen mit hohen GDF 15 Konzentrationen im Serum das Risiko für Myokardinfarkt, thrombembolischer Apoplex und plötzlicher Herztod um nahezu das Dreifache erhöht war. Hierbei wurde GDF 15 als unabhängiger Risikoindikator für kardiovaskuläre Krankheiten bei älteren gesunden Frauen beschrieben (Brown et al., 2002).

Kempf et al. (2006) konnten *in vitro* nachweisen, dass rekombinantes GDF 15 Herzmuskelzellen während simulierter I/R vor Apoptose schützte und dass die PI3-Kinase an diesen Prozessen beteiligt war. Des Weiteren entwickelten GDF 15 Knockout-Mäuse einen höhergradigen Infarktschaden und waren durch verstärkte Apoptoseraten in der Grenzzone des Infarktes nach I/R im Vergleich zu Kontrolltieren gekennzeichnet (Kempf et al., 2006). Diese Ergebnisse stellen GDF 15 als einen kardioprotektiven und anti-apoptotischen Faktor dar.

1.2 Myokardiale Hypertrophie

1.2.1 Physiologie und Bedeutung der Myokardhypertrophie

Die myokardiale Hypertrophie ist eine strukturelle Veränderung des Herzmuskels. Eine lang andauernde Druck- oder Volumenbelastung des Herzens, neurohumorale Faktoren oder ein Zusammenspiel dieser Größen sind Ursachen dieses Anpassungsmechanismus. Da Herzmuskelzellen des adulten Organismus nicht mehr zur Teilung befähigt sind, geschieht jede Zunahme der Myokardmasse ausschließlich durch eine Größenzunahme einzelner Kardiomyozyten. Charakterisiert ist die myokardiale Hypertrophie durch eine Zunahme der Zellgröße, gesteigerte Proteinsynthese, Reorganisation des Zytoskeletts und die Reinduktion eines fetalen Genexpressionsprogramms (Frey et Olson, 2003).

Bei einer Druckbelastung über einen längeren Zeitraum, zumeist die Folge von Stenosen der Herzklappen oder eines erhöhten Blutdrucks, führt die gesteigerte systolische Wandspannung zur Neubildung von Myofibrillen in paralleler Anordnung. Dies stellt sich makroskopisch als Vergrößerung der Ventrikelwanddicke bei gleich bleibendem Innenvolumen dar. Hierbei wird von einer konzentrischen Hypertrophie gesprochen. Diese Form der Hypertrophie vollzieht sich auch bei anhaltendem körperlichem Training (Heineke et Molkentin, 2006). Im Falle einer Volumenbelastung, die meist als Resultat von insuffizienten Klappen oder Shuntvitien auftritt, kommt es zum Anstieg der initialen diastolischen Wandspannung. Dies resultiert in einer Verlängerung des kontraktiven Apparats durch die Synthese neuer Sarkomere in Serie. Makroskopisch zeigt sich eine proportionale Steigerung der Ventrikelwanddicke und des Ventrikelvolumens. Dieser Prozess wird als exzentrische Hypertrophie bezeichnet.

Diese Anpassungsprozesse sind bis zum kritischen Herzgewicht von 500g weitestgehend reversibel und werden als Stadium der Kompensation bezeichnet. Durch anhaltende Wachstumsstimuli kann es jedoch zur Dekompensation der bislang adaptiven Prozesse kommen. Hierbei kommt es zur Dilatation des Ventrikels mit einer Zunahme der Wandspannung. Dadurch verschlechtert sich der energetische Wirkungsgrad der Herzarbeit und es resultiert eine Herzinsuffizienz mit

Minderversorgung der peripheren Organe. Mit zunehmendem Durchmesser der Herzmuskelzellen bei gleich bleibender Kapillarisation entwickelt sich zudem ein ungünstiges Verhältnis von Muskelmasse zur Sauerstoffversorgung. Strukturelle Veränderungen im Myokard wie Kollagen- und Fibroblasteneinlagerungen führen zu einem irreversiblen Fortschreiten der Herzinsuffizienz.

Die Analyse von zahlreichen klinischen Studien zeigte, dass eine linksventrikuläre Hypertrophie das Risiko für eine nachfolgende kardiovaskuläre Erkrankung bzw. das Sterblichkeitsrisiko durchschnittlich jeweils um mehr als das Doppelte vergrößert (Vakili et al., 2001). Entsprechend wiesen Patienten, deren linksventrikuläre Hypertrophie durch medikamentöse Behandlung zurückging, ein geringeres Risiko kardiovaskulärer Mortalität auf (Mathew et al., 2001). Daher gilt die Myokardhypertrophie als wichtiger Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz und eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Levi et al., 1990; Berenjii et al., 2005). Eine Aufklärung des Pathomechanismus der Hypertrophie ist deshalb von großem klinischem Interesse.

Die mechanischen Belastungen, die zur Hypertrophie des Myokards führen, werden durch neurohumorale Faktoren begleitet und beeinflusst. In letzter Zeit konnte eine Vielzahl von Botenstoffen identifiziert werden, die am hypertrophen Wachstum des Herzmuskels beteiligt sind. Als wichtige Faktoren sind hier die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als auch eine Erhöhung der Sympathikusaktivität zu nennen. Regulierend auf die Herzhypertrophie wirken auch endokrine, parakrine und autokrine Wachstumsfaktoren, welche membrangebundene Rezeptoren aktivieren und damit eine veränderte Genexpression und Proteinbildung bewirken (Heineke et Molkentin, 2006). Es sind sowohl Hypertrophie stimulierende als auch Hypertrophie inhibierende Faktoren beschrieben. Beispielsweise ist der Wachstumsfaktor Transforming Growth Faktor β (TGF- β) durch eine Aktivierung der PI3-Kinase an hypertrophen Prozessen beteiligt, wohingegen das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das Brain Natriuretic Peptide (BNP) als antihypertroph angesehen werden (Schultz et al., 2002; Molkentin, 2003).

1.2.2 Die adrenerge Signaltransduktion bei der myokardialen Hypertrophie

Mithilfe des α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin und des β_2 -Adrenozeptoren-Agonisten Isoprenalin konnte im Zellkulturmodell die adrenerge Signaltransduktion bei myokardialer Hypertrophie ermittelt werden. Eine Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren bewirkt über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), PI 3-Kinase sowie der p70^{S6}-Kinase eine vermehrte Proteinsynthese in Kurzzeitkulturen (Pinson et al., 1993, Pönicke et al., 2001) (Abb. 1.4).

Die Signaltransduktion β -adrenerger Hypertrophie ist aufgrund fehlender Ansprechbarkeit bei β -adrenerger Stimulation in Kurzzeitkulturen nur in Langzeitkulturen nachweisbar (Pinson et al., 1993). Der β -adrenerge Stimulus Isoprenalin aktiviert im Verlauf hypertropher Wachstumsregulation auch die PI 3-Kinase und die p70^{S6}-Kinase. Die bei α -Rezeptor vermittelter Stimulation initial aktivierte Proteinkinase C ist bei der β -adrenergen Signaltransduktion nicht beteiligt. An dieser Stelle wird durch Isoprenalin die cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Schlüter et al., 1998; Simm et al., 1998). Hierbei wird die β -adrenerg induzierte Hypertrophie über beta-2 Rezeptoren vermittelt (Zhou et al., 1996).

Der Wachstumsfaktor TGF- β spielt eine Schlüsselrolle in den kardialen Hypertrophie- und Remodeling-Prozessen nach Herzinfarkt (Schultz et al., 2002; Swynghedauw, 1999) und wird im hypertrophierten Myokard im Übergang von der kompensierten zur dekompenzierten Form der Myokardhypertrophie vermehrt exprimiert (Villarreal et Dillmann, 1992; Boluyt et al., 1994). TGF- β ist hierbei ursächlich an der Vermittlung β -adrenerg vermittelter Hypertrophie in Langzeitkulturen beteiligt (Schlüter et al., 1995) und verursacht eine Anbindung der Proteinkinase A an die PI 3-Kinase gekoppelte hypertrophe Wachstumsregulation, wie dies in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt ist (Schlüter et al., 1995, 1999). Daraus lässt sich schließen, dass TGF- β *in vivo* die hypertrophieinduzierende Wirkung β -adrenerger Stimulation beim Übergang von Hypertrophie zur Insuffizienz beeinflusst.

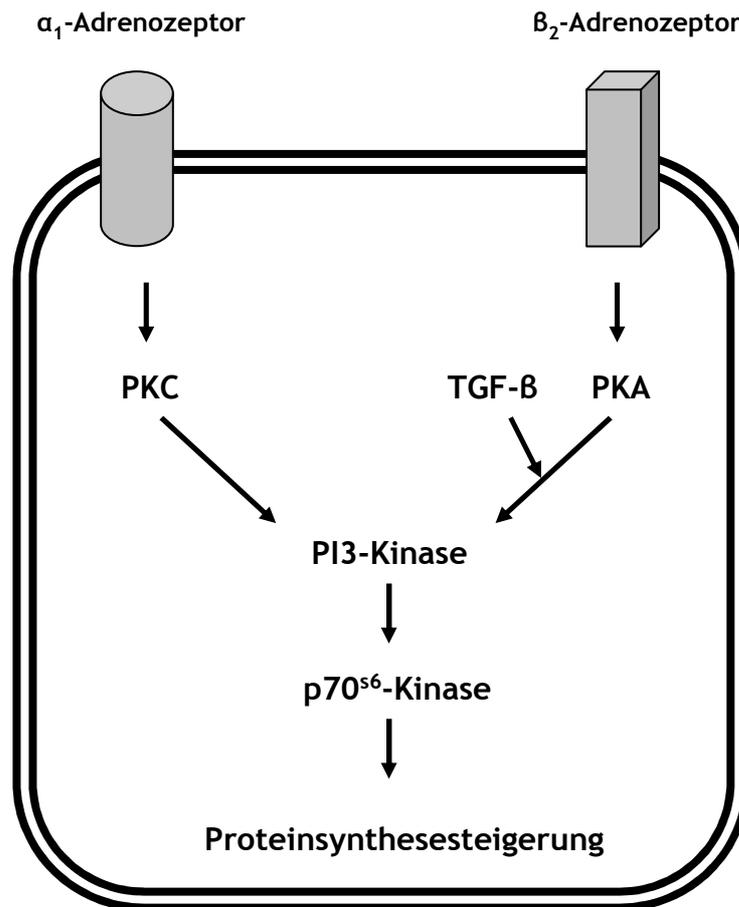


Abb. 1.4: Die α - und β -adrenerge Signaltransduktion bei der myokardialen Hypertrophie: Der α -adrenerge Stimulus führt über die PKC, PI 3-Kinase und weitere Schritte zum hypertrophen Wachstum. Die über β_2 -Rezeptoren induzierte Hypertrophie verläuft über die PKA in Anwesenheit von TGF- β .

1.2.3 Der Wachstumsfaktor GDF 15 und Hypertrophie

Das TGF- β Familienmitglied GDF 15 wird unter physiologischen Bedingungen im Herzen in geringem Maße exprimiert. Die Bestimmung der GDF 15 mRNA-Konzentration im Herzen nach akuter Druckbelastung zeigte im Mausmodell einen deutlichen Expressionsanstieg innerhalb eines Tages, der bei weiterer Druckstimulation bis zu 8 Wochen bestand. Dies deutet darauf hin, dass GDF 15 sowohl bei der akuten als auch bei der langfristigen Regulation von Herzschäden eine Rolle spielt (Xu et al., 2006).

Auch in klinischen Studien konnte die enorme Bedeutsamkeit von GDF 15 bei Herzerkrankungen dargestellt werden. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde von Kempf et al. (2007a) die GDF 15 Konzentration bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der GDF 15 Spiegel bei diesen Patienten signifikant erhöht war und deutlich mit der NYHA-Klasse übereinstimmte, d.h. Patienten mit gestiegenen GDF 15 Werten waren auch einer hohen NYHA-Klasse zugeordnet. Des Weiteren wurde gezeigt, dass hohe GDF 15 Konzentrationen mit einer Anzahl weiterer Faktoren wie einer schlechten LVEF, erhöhten NT-proBNP-Werten und einer reduzierten Nierenfunktion verbunden waren. Außerdem hatten Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und erhöhten GDF 15 Werten eine signifikant höhere 1-Jahres-Mortalitätsrate als Patienten mit niedrigen GDF 15 Werten (Kempf et al., 2007a).

Auch bei Patienten mit NSTEMI-ACS wurden eindeutig höhere GDF 15 Werte als bei gesunden Patienten gefunden. Dabei korrelierte die GDF 15 Konzentration mit klinisch etablierten Prognosemarkern wie Troponin, NT-proBNP und CRP. Darüber hinaus lag die 1-Jahresmortalitätsrate bei Patienten mit hohen GDF 15 Werten signifikant über der von Patienten mit geringen GDF 15 Werten (Wollert et al., 2007b). Daher ist mit GDF 15 ein neuer Biomarker identifiziert worden, der beim ACS und bei chronischer Herzinsuffizienz bisherige klinische Faktoren und etablierte Biomarker wie Troponin, CRP, NT-proBNP und die Kreatinin-Clearance in seiner prognostischen Aussagekraft übertrifft und in der Zukunft ein wertvolles Werkzeug bei der Risikostratifizierung von Herzerkrankungen darstellen könnte.

Experimente von Xu et al. (2006) mit GDF 15 Knockout-Mäusen zeigten eine Zunahme des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht nach simulierter Druckbelastung gegenüber Kontrolltieren. Die Kardiomyozytengröße war hierbei jedoch nicht verändert. Auch blieben die echokardiographisch bestimmte Dicke der linken Ventrikelwand und die fetale Genexpression unverändert. Somit scheint die Herzgewichtszunahme eher auf andere Remodeling Prozesse als auf die Hypertrophie von Herzmuskelzellen zurückzuführen zu sein. Darüber hinaus zeigte sich im Tiermodell (MLP $-/-$ Mäuse) eine signifikante Verbesserung einer Kardiomyopathie durch adenovirale GDF 15 Überexpression oder direkte GDF 15 Injektion. Dabei kam es zu einem Anstieg der fraktionellen Faserverkürzung (fractional shortening) und einer Abnahme der ventrikulären Dilatation. Dies deutet auf positive Eigenschaften von GDF 15 im Hypertrophieprozess im Herzen hin. Zudem wurde eine Aktivierung des ERK-Akt-Signalwegs durch GDF 15 aufgezeigt. Dieser Signalweg ist im Herzen mit hypertrophen Wirkungen verbunden (Schlüter et al., 1999; Bueno et al., 2000; Kempf et al., 2007). Überraschenderweise wurden in der gleichen Veröffentlichung anti-hypertrophe Eigenschaften für GDF 15 vorgestellt, da in neonatalen Zellen eine GDF 15 Überexpression signifikant die Zelloberfläche reduzierte (Xu et al., 2006). Hierzu sollte jedoch bedacht werden, dass sich neonatale und adulte Zellen der Ratte erheblich in ihren physiologischen Reaktionen unterscheiden und somit Ergebnisse von neonatalen Zellen nicht ohne Weiteres auf adulte Zellen übertragen werden können (Kasten, 1972; Takahashi et al., 1992).

In weiteren Versuchen von Xu et al. (2006) waren GDF 15 überexprimierende Mäuse durch eine Resistenz gegenüber druckinduzierte Hypertrophie gekennzeichnet. Dies stellt GDF 15 als einen anti-hypertrophen Faktor dar. Hierbei sollte jedoch erwägt werden, dass Herzzellen der Maus und der Ratte in Hypertrophieprozessen evident variieren (Deng et al., 2000). Des Weiteren handelt es sich dabei um Versuche, die nicht mit adulten Herzmuskelzellen verglichen werden können, da bereits in der Embryonalgeschichte in den überexprimierenden Mäusen erhöhte GDF 15 Konzentrationen vorliegen. Diese Überexpression könnte langfristige Folgen auf die Herzentwicklung haben.

Den anti-hypertrophen Schlussfolgerungen von Xu et al. (2006) stehen Versuche anderer Arbeitsgruppen gegenüber, die auf pro-hypertrophen Eigenschaften von

GDF 15 hindeuten. Bei Experimenten von Frank et al. (2008) wurden neonatale Herzmuskelzellen einem biomechanischem Dehnungsreiz für 24 h ausgesetzt, der ein hypertrophes Wachstum der Zellen zur Folge hatte. Anschließend wurden die Zellen konsekutiv auf ihr Genexpressionsmuster untersucht. Neben einer Vielzahl weiterer Moleküle fand sich GDF 15 durch Stretch signifikant am stärksten heraufreguliert. Auch eine Stimulation mit dem pro-hypertrophen Faktor Angiotensin II hatte eine GDF 15 Expression zur Folge. Umgekehrt inhibierte der Angiotensin-Rezeptor-Blocker Irbesartan die Stretch-Induzierte GDF 15 Sekretion.

Ebenso bekräftigen die Ergebnisse von Buitrago et al. (2005) diese pro-hypertrophe These. In dieser Arbeit wurde durch Überexpression des anti-hypertrophen transkriptionellen Repressors Nab1 die GDF 15 Synthese signifikant inhibiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über die Auswirkungen von GDF 15 auf den Hypertrophieprozess in Herzmuskelzellen adulter Tiere und die dabei vorliegende Signaltransduktion bisher keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen.

1.3 Zielsetzung

Aktuelle experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass GDF 15 in der Pathologie der Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle spielt und als potenter prognostischer Marker bei kardialen Erkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz gilt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die vielfältigen Wirkungen von GDF 15 am Herzen genauer zu untersuchen. Dabei sollten zum einen die Apoptoseeigenschaften von GDF 15 geklärt werden. Hat GDF 15 Einfluss auf die Apoptoserate von adulten Herzmuskelzellen? Und gegen welche Apoptose-Stimuli wirkt GDF 15? Zum anderen sollte das Wirken von GDF 15 auf die Hypertrophieentwicklung im Herzen geprüft werden. Ist GDF 15 ein pro-hypertropher Faktor? Und wenn ja, über welche Kaskade beteiligt sich GDF 15 an diesen Hypertrophieprozessen? Mithilfe dieser Daten sollte die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Entwicklung der Herzinsuffizienz liefern.

2 Material

2.1 Vielfach verwendete Chemikalien

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammonium-Persulfat	Serva, Heidelberg
Angiotensin II	Calbiochem, Bad Soden
Anti-mouse IgG	Sigma, Taufkirchen
Anti-rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen
Anti-rat p42 map-Kinase	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cy3-dcTP-Farbstoff	GE Healthcare Europe, Freiburg
Cytosin- β -Arabinfuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetal calve serum	PAA Laboratories, Cölbe
γ^{32} P-ATP	GE Healthcare Europe, Freiburg
GDF 15	R&D Systems, Wiesbaden
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Goe6850	Calbiochem, Bad Soden
Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
L-(U14C)-Phenylalanin	GE Healthcare Europe, Freiburg
LY294002	Calbiochem, Bad Soden
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
PD98059	Calbiochem, Bad Soden

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Taufkirchen
poly-(dIdC)	Roche Diagnostics, Mannheim
pR-SMAD1, pRSMAD1,5, pR-SMAD2	Invitrogen, Karlsruhe
Sephadex-G50	Calbiochem, Bad Soden
Shrimps alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
SMAD-Decoy-Oligonukleotide	Biomers, Ulm
SNAP	Axxora, Grünberg
Szintillationslösung: Ultima Gold®	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, Sankt Leon-Rot
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Terminale Transferase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TGF- β	Calbiochem, Bad Soden
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Wortmannin	Calbiochem, Bad Soden

Alle übrigen Chemikalien wurden in der höchsten, bei den Firmen Calbiochem (Bad Soden), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) erhältlichen Qualität bezogen und verwendet. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde Aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet, falls nichts anderes angegeben wurde.

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Zellkultur

Häufig verwendete Puffer wurden als mehrfach konzentrierte Stammlösungen mit Aqua bidest. angesetzt und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf einen Liter Puffer.

Powell-Medium

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

Collagenasepuffer

Powell-Medium	50 ml
Collagenase	20 mg (chargenabhängig)
Calcium-Stammlösung (100 mmol/l)	2,5 µl

M 199/ HEPES-Stammlösung

2 Pakete M 199 (9,62 g/l) HEPES	15,1 mM
Ad 10 l mit aqua bidest	
pH 7,4	

Vorinkubationsmedium :

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

CCT-Kulturmedium:

M 199 / HEPES-Stammlösung	x ml
---------------------------	------

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

Vorplattiermedium

CCT-Medium	x ml
Laminin	0,1%

Ausplattiermedium/Waschmedium für isolierte Zellen

CCT-Medium	x ml
Streptomycin/Penicillin	2 %
Gentamycin	0,1 %

10 x PBS

KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,1 mM

2.2.2 Retardation-Assay

10 x Schwellungspuffer

Tris-HCl, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
Dithiothreitol (1:500)	1 mM

10 x Homogenisierungspuffer

Saccharose	300 mM
Tris-HCl, pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM

DTT (1:500)	1 mM
Triton X-100	0,3 % (wt/vol)

10 x Storage-Puffer

NaCl	300 mM
KCl	50 mM
HEPES (pH 7,5)	10 mM
DTT (1:500)	1 mM
Ethylendiamintetraacetat	1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (1:100)	1 mM
Glycerol	20 % (wt/vol)

Bindungspuffer (TXN)

Glycerin	10 % (vol/vol)
Tris/HCl	20 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	3 mM
PMSF	0,2 mM

Retardation-Gel-Lösung

Acrylamid/Bisacrylamid (79 g/1 g)	4 ml
Ammonium-Persulfat 10 % (wt/vol)	300 µl
Aqua bidest.	35 ml
Glycerin	1 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	34 µl
10 x RA-Puffer	400 µl

100 x RA-Puffer

EDTA	100 mmol/l
Natriumacetat	330 mmol/l
Tris/HCl	670 mmol/l
pH 7,9	

Gefärbter 10 x Tris-acetat/EDTA (TAE)-Puffer

Bromphenolblau	1 % (vol/vol)
EDTA	1 mM
Saccharose	50 %
Tris-acetat	40 mM

2.2.3 Immunologischer Proteinnachweis*Lysispuffer*

Tris/HCl	50 mmol/l
SDS	2 % (w/v)
Natriumvanadat (1 mM)	10 % (v/v)
Mercaptopropandiol	10 % (v/v)
pH 6,7	

Laemmli-Puffer

Tris/HCl	500 mmol/l
Glycerin	25 % (v/v)
SDS (10%ig)	4 % (w/v)
Mercaptopropandiol	1 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
pH 6,8	

Trenngel (12,5 %)

AA/BA	12,5 ml (100:1)
Trenngelpuffer	7,5 ml
aqua bidest	10,0 ml
APS 10% (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl
SDS 10% (wt/vol)	300 µl

4x Trenngelpuffer

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

SDS 0,4% (wt/vol)

Sammelgel

AA/BA (30:1) 2,4 ml

Sammelgelpuffer 5 ml

aqua bidest 12,8 ml

APS 10% (vol/vol) 300 µl

TEMED 30 µl

SDS 10 % (wt/vol) 300 µl

Sammelgelpuffer

Tris/HCl 0,5 mol/l (pH 6,8)

SDS 0,4% (wt/vol)

Laufpuffer

Glycin 1,44% (wt/vol)

Tris/HCl 0,3% (wt/vol)

SDS 0,1% (wt/vol)

pH 8,2

konzentrierter Anodenpuffer

Tris/HCl 300 mmol/l

Methanol 20 % (v/v)

pH 10,4

Anodenpuffer

Tris/HCl 30 mmol/l

Methanol 20 % (v/v)

pH 10,4

Kathodenpuffer

Tris/HCl 25 mmol/l

6-Aminohexansäure 40 mmol/l

Methanol 20 % (v/v)

pH 9,4

Antikörperlösung

PBS

Tween 20 0,05 % (v/v)

BSA 2 % (w/v)

pH 7,4

Entwicklerlösung

AP-Puffer 40,0 ml

BCIP 5,2 mg

NBT 13,2 mg

AP-Puffer

Tris/HCl 100 mmol/l

MgCl₂ 5 mmol/l

NaCl 10 mmol/l

pH 9,5

BSA-Lösung

3 % BSA in 1x PBS

Reagenz A

Na-K-Tatrat 3,3% (wt/vol) 200 µl

CuSO₄ 1,25% (wt/vol) 200 µl

Na₂CO₃ 2,5% (wt/vol) 19,6 ml

Trenngel (10 %)

Acrylamid (30%) 6,6 ml

aqua bidest 8,4 ml

Tris, 1,5 M, pH 8,8 5 ml

SDS 10% (wt/vol) 200 µl

APS, 10 % (wt/vol) 50 µl

TEMED	40 µl
-------	-------

Blocklösung

Tween 20	0,1 % (vol/vol)
BSA/Magermilchpulver	5 % (wt/vol)
1xTBS	ad 1 l

2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz

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

vor Gebrauch filtrieren

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Zellkultur

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

2.3.2 Retardation Assay

Fluoreszenz-Molecular-Imager	BioRad, München
Glasmörser	B. Braun, Melsungen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton Bonaduz, Schweiz

Hoefler-Elektrophoresekammer	GE Healthcare Europe, Freiburg
Netzgerät (TypBiometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid

2.3.3 Immunologischer Proteinnachweis

Elektrophorese-Netzgerät	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
PVDF-Blotmembran	Millipore, Eschborn
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 III)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefler-Elektrophoresekammer	GE Healthcare Europe, Freiburg
Hoefler-Glasplatte	GE Healthcare Europe, Freiburg
Hoefler-Spacer	GE Healthcare Europe, Freiburg
Hoefler-Kamm	GE Healthcare Europe, Freiburg
Hoefler-Plattenklemme	GE Healthcare Europe, Freiburg

2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Flüssigkeits-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt a.M.
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf

2.3.5 Hoechst 33258/Propidiumjodid-Doppelfärbung

Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
----------------------	------------------

2.3.6 Sonstige Geräte

Demineralisierungsanlage	Millipore, Schwabach
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke &Kunkel, Staufen

PH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Perkin Elmer, Langen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Video-Dokumentation	Intas, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Zentrifugenröhrchen	Kendro, Hanau

2.4 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen Typ Falcon 3001/3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten Typ Falcon 3910	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, 0,2 µm Porenweite	GE Healthcare Europe, Freiburg

2.5 Software

Microsoft Word	Microsoft Corp., USA
Microsoft Exel 2000	Microsoft Corp., USA
Quantity One	BioRad, München
SPSS	SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA

3 Methoden

3.1 Isolierung ventrikulärer Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus 3-4 Monate alten adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 200-300 g isoliert. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen und hatten freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter: Altromin®) und Wasser.

3.1.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus dem Rattenherz

Die ventrikulären Kardiomyozyten wurden nach der von Piper et al. (1982) beschriebenen Methode isoliert. Dabei wurde die Langendorff-Perfusionsanlage zu Beginn mit Powell-Medium gespült, luftblasenfrei mit 80 ml des gleichen Mediums befüllt und auf 37°C erwärmt. Während der gesamten Präparation wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast, um den pH-Wert konstant zu halten.

Nach kurzer Diethylethernarkose von ca. 1-2 min wurde den Ratten mit einem kräftigen Zug das Rückenmark durchtrennt, der Thorax eröffnet und das Zwerchfell entfernt. Anschließend wurden sowohl Lunge als auch Herz entnommen und in eine bereitstehende Petrischale mit kalter (+4°C) physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dort wurde das dem Herzen noch anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt und die Aorta ascendens weiter freipräpariert. Das Herz wurde anschließend mit der Aorta an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und retrograd perfundiert. Das in dem Herzen verbliebene Blut wurde zunächst mit 40 ml Powell-Medium ausgespült. Danach wurde das Herz mit 50 ml Collagenasepuffer für 25 min rezirkulierend perfundiert. Hierbei wurde die Flußrate durch ein Ventil auf ca. 2-3 ml/min pro Herz (5 ml/g Frischgewicht/Minute) eingestellt.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Aorta und die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mithilfe eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm

mechanisch zerkleinert. Der dabei entstandene Gewebebrei wurde anschließend für 5 min in 30 ml Collagenasepuffer bei 37°C und ständiger Carbogen-Begasung nachverdaut. Die Trennung des Gewebebreis in Einzelzellen wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mittels einer 5 ml Pipette unterstützt.

Die so gewonnene Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und zentrifugiert (3 min, 25 x g). Dadurch wurden Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Collagenase-Lösung von den intakten Zellen abgetrennt. Die Herzmuskelzellen wurden in Powell-Medium, das zusätzlich 200 µM CaCl₂ enthielt, aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 25 x g) und Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in Powell-Medium mit einem gesteigertem CaCl₂ Anteil von 400 µM aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde auf eine der Anzahl der präparierten Herzen abgestimmte Zahl von Reagenzgläsern (pro Herz 1 Reagenzglas) aufgeteilt. Die Reagenzgläser wurden zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule von Powellmedium mit 1 mM CaCl₂ (100 MM) gefüllt. Nach letztmaliger Zentrifugation (1 min, 25 x g) und Absaugung erhielt man eine Zellpopulation, die zu 40-60 % aus intakten, stäbchenförmigen Zellen bestand.

3.2 Zellkultur isolierter Herzmuskelzellen der Ratte

3.2.1 Vor- und Ausplattierung

Um ein Anheften der Herzmuskelzellen an die Kulturschalen zu gewährleisten, wurden die verwendeten Kulturschalen für mindestens 4 h mit Vorinkubationsmedium bei 37°C beschichtet. Kurz vor dem Ausplattieren wurde dieses Medium wieder abgesaugt. Die isolierten adulten Herzmuskelzellen wurden in CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 5×10^4 Zellen pro cm² ausplattiert.

3.2.2 Kultivierung isolierter Herzmuskelzellen

Zum Anheften der intakten Zellen auf dem Boden der Kulturschalen wurden diese bei 37°C und unter CO²-freien Bedingungen für 2-4 h inkubiert und danach mindestens zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Hierbei wurden Zelltrümmer und nicht angehefteten Zellen entfernt. Die verbliebene Zellkultur bestand zu etwa 90 % aus stäbchenförmigen und somit intakten Zellen, die für die anschließenden Versuche benutzt werden konnten. Nach dem Waschen mit dem CCT-Kulturmedium und einer ca. zehnmütigen Ruhephase wurden die isolierten Herzmuskelzellen entsprechend der jeweiligen Versuchsvorschriften behandelt.

3.3 Transformation der Herzmuskelzellen mittels Decoy-Oligonukleotiden

Für den Retardation Assay wurde folgendes Decoy-Oligonukleotiden verwendet.

SMAD-Decoy 5'-GTACATTGTCAGTCTAGACATACT-3'

Das Decoy-Oligonukleotid ist ein Doppelstrang-DNA-Fragment und besitzt eine Konsensus-Bindungssequenz (unterstrichene Sequenz). Um 2 komplementäre Oligonukleotidstränge miteinander zu hybridisieren, wurden äquimolare Mengen miteinander vermischt, diese in TE-Puffer (Tris/HCl/EDTA) gelöst und im Thermocycler auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde das Oligonukleotid über mehrere Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierbei durchliefen die Oligonukleotide ihre Schmelz- und Hybridisierungstemperatur und banden sich zu einem Doppelstrang zusammen. Um die Stabilität der Oligonukleotide gegen intrazelluläre Exonukleasen zu verstärken, wurden die 4 endständigen Basen der Oligonukleotide mit Phosphothioestern versetzt. Zur Transformation der Zellen wurden die Decoys (500 nM) direkt nach dem Waschen der Zellen mit CCT-Kulturmedium in das Medium gegeben und über 5 h im Brutschrank bei 37°C, ca. 95 % Luftfeuchtigkeit und unter normoxen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit GDF 15 und den jeweiligen Inhibitoren der PKC und der PI3-Kinase stimuliert.

3.4 Retardation Assay

3.4.1 Kernextraktion

Mithilfe des Retardation Assay können Protein-DNA-Komplexe über ihre verzögerte Laufgeschwindigkeit über ein Polyacrylamidgel von freier DNA unterschieden werden. Um Kernextrakte für den Retardation Assay zu gewinnen, wurden die Zellen aus 3.2.3 nach 2 h vom Schalenboden abgeschabt und in ein Röhrchen gegeben. Durch Zentrifugation (2.000 x g, 3 min) sedimentierten die Zellen und der Überstand konnte entfernt werden. Nach der Resuspension in 1 ml PBS und der Gabe in ein Reaktionsgefäß wurde erneut zentrifugiert (2.500 x g, 3 min) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet entweder bei -80°C tief gefroren oder sofort zur Kernextraktion verwendet.

Das in der Zellernte erworbene Pellet wurde mit 400 µl 1 x Schwellungspuffer versetzt, durch wiederholtes Mischen vollständig suspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde es für 10 min bei 4°C mit 900 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zu dem verbliebenem Pellet wurden 400 µl 1 x Homogenisierungspuffer gegeben. Dieses Substrat wurde durch mehrmaliges Mischen vollständig in Lösung gebracht und danach für 5-10 min auf Eis gestellt. Danach wurde es mit 8 Stößen in einem Glasmörser homogenisiert und für 10 min bei 4°C mit 900 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 40 µl Storagepuffer überführt, darin vollständig gelöst und für 30 min auf Eis gestellt. Innerhalb dieser 30 min wurden die Ansätze alle 5 min geschüttelt. Die überflüssigen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation mit 13.000 x g für 5 min bei 4°C entfernt. Der Überstand mit den darin enthaltenen Kernextrakten wurde entweder sofort oder nach Lagerung bei -80°C weiterverarbeitet.

3.4.2 Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide

Für den Retardation Assay wurde das Oligonukleotid TRE (5'-CATCCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') mittels Fluoreszenz markiert. Komplementäre Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert (vgl. 3.3.1) und mit folgendem Ansatz fluoreszenzmarkiert:

TRE-Oligonukleotide (10 μ M)	4,0 μ l
10 x NEB-Puffer	5,0 μ l
CoCl ₂ (2,5mM)	5,0 μ l
Cy3-dCTP-Farbstoff (10mM)	2,5 μ l
Terminale Transferase (20U/ μ l)	0,5 μ l
Aqua bidest.	33 μ l

Danach wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 10 μ l Ethylendiamintetraacetat (0,3 M; pH 8,0) abgestoppt. Währenddessen fügt die Terminale Transferase die fluoreszenzmarkierten dNTPs an das 3'-Ende der Oligonukleotide hinzu. Diese konnten nun durch die Fluoreszenzmarkierung im Retardation Assay sichtbar gemacht werden.

3.4.3 Spezifische Bindung der Oligonukleotide an das Protein

Um unspezifisch DNA-bindende Proteine abzufangen, wurden 10 μ l der extrahierten Kernextrakte (siehe 3.3) mit 4,5 μ l Bindungspuffer (TXN) und 0,5 μ l unspezifischer DNA (poly-dIdC; 1 μ g/ μ l) gemischt und inkubiert (15 min, 30°C). Dieses Substrat wurde nach Hinzufügen des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidfragments (1 μ l) erneut inkubiert (30 min, 30°C). Währenddessen konnte SMAD spezifisch an das markierte Oligonukleotid binden.

3.4.4 Gelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese basiert auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität eines Protein-Nukleotid-Komplexes im Vergleich zu einem proteinfreien, markierten DNA-Fragment bzw. Oligonukleotides.

Für diese Gelelektrophorese wurden 2 Glasplatten gereinigt und entfettet. Zwischen die beiden Glasplatten wurden eine Schablone und 2 Spacer als Abstandhalter bzw. seitliche Begrenzungen des Zwischenraumes eingefügt und mittels Schraubzwingen befestigt. Um diese Konstruktion abzudichten, wurde sie in einen Gelgießstand

3.5.2 Proteinisolation für den SMAD-Nachweis

Zur Isolierung von Gesamtprotein zum SMAD-Nachweis wurden die Herzmuskelzellen nach der Inkubation mit GDF 15 (3 ng/ml) zweimalig mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Nach Entnahme der PBS-Lösung wurden jeder 2ml-Schale 125 µl Ripa-Puffer zugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber entfernt und mit Ripa-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 12000 Upm, 4°C). Der Proteinüberstand wurde abgenommen, und das Pellet entsorgt.

3.5.3 Proteinmengenbestimmung mit dem Lowry Assay

Zur Ermittlung der in den einzelnen Proben enthaltenen Proteinmenge für den SMAD-Nachweis wurde ein Lowry Assay durchgeführt (Lowry et al., 1951). Hierfür wurde zunächst eine Standardverdünnungsreihe von BSA in Wasser benötigt (0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml). Von dieser Standardreihe wurden jeweils 10 µl mit 50 µl Ripa-Puffer und von den Proben 10 µl mit 50 µl Wasser vermischt. Anschließend wurden jedem Ansatz 50 µl NaOH (0,5 M) und 500 µl Lösung A hinzugefügt. Nach Inkubation der Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur, wurden 100 µl Folin-ciocalteusches Phenolreagenz (Merck 9001; 22,73ml Originalreagenz/l Millipore Wasser) zugegeben. Daraufhin wurde eine Inkubation bei 37°C für 30 min und eine Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) durchgeführt. 200 µl der Überstände der Standardreihe und der Proben wurden jeweils auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend im Mikrotiterplatten-Photometer bei 578 nm photometrisch ausgewertet. Mit Hilfe der Standardreihe konnte danach eine Standardgerade ermittelt werden und damit die einzelnen Proteinkonzentrationen errechnet werden. Nachdem die Proteinkonzentrationen der einzelnen Ansätze ermittelt worden waren, wurden die Proben auf dieselbe Konzentration eingestellt. Im Anschluss wurden zu 45 µl der Versuchsansätze je 15 µl 4x Laemmli-Puffer und 1,8 µl DTT hinzupipettiert (Laemmli, 1970). Dieses Gemisch wurde bei 95°C für 5 min aufgekocht und danach sogleich wieder auf Eis abgekühlt.

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Laemmli beschrieb 1970 das diskontinuierliche System der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, welches noch heute verwendet wird. Hierbei stellt die Diskontinuität die biphasische Gelstruktur, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel dar. Es liegen Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration des Acrylamids vor. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zwischen 2 Glasplatten ein 1,5 mm starkes Trenngel gegeben, welches ca. 2/3 der Gesamtlaufstrecke ausmachte. Dabei wurde für den ERK-Nachweis ein 12,5-prozentiges Trenngel und für den SMAD-Nachweis ein 10-prozentiges Trenngel eingesetzt. Unter Sauerstoffabschluss wurde das Gel für ca. 25 min polymerisiert. Danach wurde das Sammelgel gegossen, in das mit Hilfe eines Profilformers Taschen zur Probenaufnahme eingebaut wurden. Nach weiteren 30 min war das Sammelgel vollständig polymerisiert. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt, die Proben aufgetragen und eine Spannung von 200 mV angelegt.

Nach dem Lauf erhielt man Bereiche, die eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der Proteine anzeigten. Anhand eines vorgegebenen Standards (Spektrum: 250 kD - 10 kD) ließen sich die Molekulargewichte der Proteine bestimmen. Die hohe Auflösung der diskontinuierlichen Elektrophorese ermöglichte es, die p42 MAP-Kinase auf einem Gel in die aktivierte (phosphorylierte) und nicht-aktivierte (dephosphorylierte) Form aufzutrennen.

3.5.5 Western-Blot-Verfahren

Mithilfe der Technik des ElektrobloTTings lassen sich die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels vollständig auf eine synthetische Trägermembran übertragen. Von den zwei allgemein bekannten Transfermethoden wurde in dieser Arbeit das Semidry-Blotting verwendet (Kyhse-Andersen, 1984). Hierbei wurde zwischen zwei Plattenelektroden ein Blotsandwich horizontal in einer bestimmten Reihenfolge erstellt (Abb. 3.1). Für den SMAD-Nachweis wurde hierfür

zusätzlich konzentrierter Anodenpuffer eingesetzt. Das diskontinuierliche Puffersystem garantierte einen relativ einheitlichen Transfer und zugleich geringfügige Störungen durch reaktive Verunreinigungen. Die in die 3 Puffer gegebenen Filterpapiere umgaben die PVDF-Blotmembran mit dem darüber gelegten Trenngel. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten mussten behutsam mit einem Glasstab ausgerollt werden. Eine Stromstärke von 1 mA/cm^2 wurde für den zweistündigen Transfer angelegt.

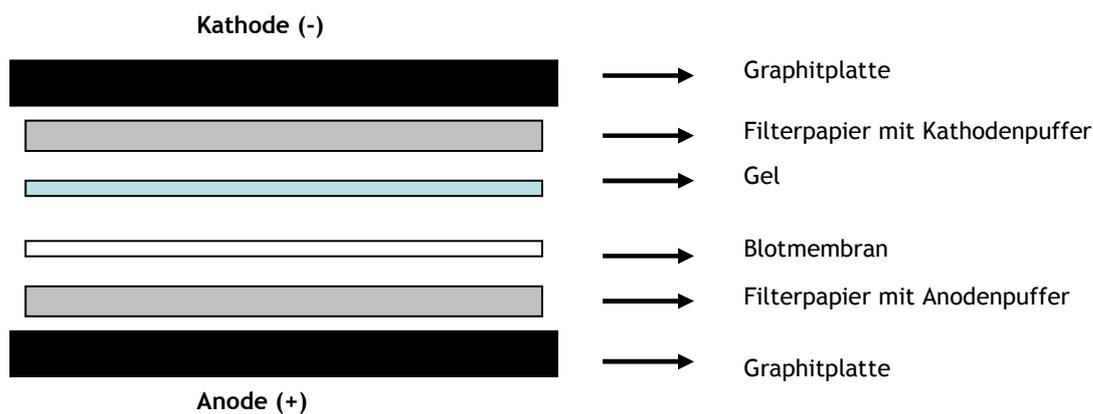


Abb. 3.1: Semidry-Blotting. Querschnitt durch den Aufbau eines Blotsandwich

Anschließend wurde die Membran mit Ponceaurot-S-Lösung gefärbt. Dieser Farbstoff lagerte sich unspezifisch an alle Proteine an und machte die Bandenmuster somit erkennbar. Nach Entfernen des überschüssigen Farbstoffes durch mehrfaches Waschen mit Millipore-Wasser, wurde die Bandenhöhe der Marker markiert und fotografiert.

3.5.6 Immunologische Nachweisverfahren

Das Immunologische Nachweisverfahren ermöglicht es, mithilfe einer Antigen-Antikörper Reaktion die elektrophoretische Auftrennung der Proteine zu visualisieren. Dabei bindet ein Primärantikörper spezifisch an sein immobilisiertes Antigen auf der Membran, während ein zweiter Antikörper, der mit einem Amplifikator markiert ist, an alle Primärantikörper derselben Spezies bindet. Diese so genannte indirekte Anordnung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig einfacher Realisierung aus. Bei diesem Verfahren wurde zunächst die Blotmembran für 2 h in 3% BSA-Lösung abgesättigt und zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über die Nacht.

Die Anbindung der p42 MAP-Kinase resultierte über einen polyklonalen Antikörper, der in einer Konzentration von 0,2 µg/ml eingesetzt wurde. Nach 3 Waschgängen (jeweils 10 min) mit 0,2% (vol/vol) Triton in PBS, wurden die Blotmembranen für 2 h mit dem Sekundärantikörper beschichtet. Bei den Zweitantikörpern handelte es sich um polyklonale anti-rabbit IgG (50 mU/50 ml), die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden durch 2 Waschvorgänge (jeweils 5 min) mit 0,5 % (vol/vol) Triton in PBS entfernt. Die Fähigkeit der alkalischen Phosphatase, katalytisch optische Substrate wie BCIP/NBT umzusetzen, führte zur Bildung eines violetten Präzipitates. Die Intensität der Banden konnte durch die Entwicklungszeit und einem abrupten Stopp im Wasserbad beeinflusst werden. Die entwickelten Blotmembranen wurden getrocknet, eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Nach Schlüter et al. 1999 ist die p42 MAP-Kinase im aktivierten Zustand zweifach phosphoryliert und separiert sich so von der nicht-aktivierten, dephosphorylierten Form. Daher mussten für die Ergebnissauswertung der p42 MAP-Kinase für jede Probe 2 Banden detektiert werden. Die Ergebnisse der ERK-Aktivierung wurden als Verhältnis der dimensionslosen Einheiten (AU) von phosphorylierter ERK zu gesamt ERK angegeben.

Für den Nachweis der Aktivierung der SMAD-Proteine wurden als Primärantikörper pR-SMAD1, pRSMAD1,5 und pR-SMAD2 eingesetzt. Die Antikörper wurden in Blocklösung mit BSA gelöst (1:500). In dieser Antikörperlösung wurde die Membran bei 4°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut dreimal gewaschen. Als Zweitantikörper wurde an Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter goat anti-rabbit Antikörper in Blocklösung mit Magermilchpulver gelöst (1:2000). In dieser Lösung wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter, dreimaliger Reinigung mit Waschlösung, wurde die Membran in ECL (enhanced chemiluminescence)-Lösung getränkt. Als nächstes wurde die Membran auf eine Glasplatte gelegt und mit Klarsichtfolie überspannt. Anschließend ließ sich im Fluoreszenzimager die Chemolumineszenz darstellen. ECL steht hierbei für das Phänomen der Fluoreszenzzunahme bei Oxidation von Luminol, katalysiert durch die

Meerrettichperoxidase (HRP). Da die Meerrettichperoxidase fest an den Zweitantikörper gebunden war, ließen sich die entsprechenden Proteinbanden als fluoreszierende Banden nachweisen.

3.6 Methoden zur Erfassung von Apoptose in Herzmuskelzellen

3.6.1 Apoptosestimulation in isolierten Herzmuskelzellen

Zur Apoptoseinduktion wurden die Herzmuskelzellen aus 3.2.2 mit TGF- β , SNAP oder Angiotensin II stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Stoffe durch leichtes Schwenken in der Kulturschale verteilt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden alle Schalen im Brutschrank bei 37°C, ca. 95 % Luftfeuchtigkeit und unter normoxen Bedingungen inkubiert. Die zugegebenen Substanzen wurden auf den Schalen belassen.

Für die Untersuchung anti-apoptotischer Effekte von GDF 15 wurden die Zellen nach dem Waschen mit GDF 15 (3 ng/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit TGF- β (1 ng/ml), SNAP (100 μ M) oder Angiotensin II (100 nM) behandelt. Zudem wurden mit Angiotensin II (100 nM) Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen nach dem Waschen zunächst mit Angiotensin II und 8 h später mit GDF 15 stimuliert wurden.

3.6.2 Die Hoechst 33258/Propidiumiodid-Doppelfärbung

24 h nach Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit den beiden Farbstoffen Hoechst 33258 (5 μ g/ml) und Propidiumiodid (1 μ g/ml) versetzt und für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Hoechst 33258 ist ein zellmembrangängiger DNA-Farbstoff, der alle Zellkerne bzw. deren Chromatin anfärbt. Deswegen kann die für die Spätphase der Apoptose typische Kondensation der Kerne, mit oder ohne Fragmentierung, besonders gut erkannt werden. Hoe 33258 wird bei einer Wellenlänge von 340-360 nm angeregt und es resultiert bei Anregung eine intensive blaue Fluoreszenz. Propidiumiodid ist im Gegensatz zu Hoechst 33258 ein nicht membrangängiger

DNA-Farbstoff und färbt daher nur die Zellkerne nekrotischer Zellen, deren Zellmembran bereits geschädigt ist an. Propidiumiodid wird mit einem Spektrum von 510-550 nm angeregt und ist dabei sehr gut an der intensiven roten Fluoreszenz erkennbar.

Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde am Fluoreszenzmikroskop bestimmt, genauso wie die Gesamtzellzahl, die im Durchlicht ermittelt wurde. Dieses Methodik wurde bei jedem zufällig gewählten Gesichtsfeld angewandt und solange wiederholt bis in der Summe mehr als 150 Zellen pro Versuchsbedingung/Schale erfasst waren. Zur Ergebnisauswertung wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen zu Gesamtzellzahl ausgerechnet.

3.7 Methoden zur Erfassung von Hypertrophie in Herzmuskelzellen

3.7.1 Hypertrophiestimulation in isolierten Herzmuskelzellen

Zur Stimulation von hypertrophem Wachstum wurden die isolierten Zellen aus 3.2.2 mit dem α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (10 μ M) stimuliert. Unbehandelte Herzmuskelzellkulturen wurden als Kontrolle verwendet. Darauf wurden alle Schalen im Brutschrank bei 37 °C, ca. 95 % Luftfeuchtigkeit und unter normoxen Bedingungen kultiviert. Zur pharmakologischen Hemmung der PKC, ERK, PI3-Kinase und SMAD-Kinase wurden die Kardiomyozyten ca. 30 min mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert, bevor diese mit GDF 15 in einer Konzentration von 3 ng/ml stimuliert wurden.

3.7.2 Bestimmung der Proteinsyntheserate nach Bradford

Hypertrophe Herzmuskelzellen sind im Vergleich zu normalen Zellen durch eine höhere Proteinsyntheserate gekennzeichnet. Deshalb lässt eine erhöhte Proteinsyntheserate in der Zelle auf einen hypertrophen Prozess schließen. Diese Proteinsyntheserate kann durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren gemessen werden.

Zur Hypertrophiemessung wurden die mit Phenylephrin (10 μM) stimulierten Herzmuskelzellen mit radioaktiv markiertem Phenylalanin versetzt. Die Aminosäure Phenylalanin dient fast ausschließlich der Proteinsynthese, da sie nicht von Kardiomyozyten metabolisiert wird (Morgan et al., 1971). Daher eignet sich die Inkorporation von radioaktivem Phenylalanin zur Quantifizierung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten. Nach 24 h wurde das nicht eingebaute Phenylalanin durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Die Proteinfraction der Kulturen wurde mit 1 ml TCA (wt/ vol) bei 4° C über Nacht gefällt.

Nach 48 h wurden 500 μl des Überstandes in Szintillationslösung überführt, um die Menge des markierten Phenylalanins im Extrazellulärraum zu bestimmen. Der Überstand wurde abgesaugt, mit 1x PBS gewaschen und durch NaOH aufgefüllt, um die Zellen zu destruieren. 2 h später wurden 500 μl dieser Lösung in Szintillationslösung überführt und im Beta-Counter die intrazelluläre Menge des eingebauten radioaktiven ^{14}C -Phenylalanins ermittelt. Die Gesamtproteinmenge wurde mittels des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 quantitativ ermittelt. Dabei wurden 10 μl des Zelllysates in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 μl Bradford-Reagenz vermengt. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Als Standard zur Quantifizierung des Proteingehalts diente hierbei BSA, das in 1N NaOH/0,01% (wt/vol) SDS gelöst wurde und in folgenden Konzentrationen vorliegt: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

3.7.3 Hypertrophieerfassung durch Ermittlung der Cross Sectional Area

Als Parameter für Hypertrophie in Herzmuskelzellen diente die Zunahme der Zellquerschnittsfläche, die Cross Sectional Area. Dazu wurden nach 24 h Inkubation mit PE pro Schale ca. 30 Zellen fotografiert, die Zellen vermessen und die Cross Sectional Area mithilfe der Formel $\text{Cross Section} = \text{Radius}^2 \times \pi$ ermittelt.

3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SD) aus n verschiedenen Zellpräparationen angegeben ($n > 3$). Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgenden Tukey-Test oder einem zweiseitigen Student-T-Test ausgewertet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Datenanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 GDF 15 induziert keine Apoptose in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Isolierte adulte Herzmuskelzellen der Ratte wurden mit GDF 15 (3 ng/ml) stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen für 10 min mit Hoechst 33258 (5 µg/ml) und Propidiumiodid (1 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. GDF 15 induzierte hierbei im Vergleich zu den Kontrollen (11,1 ± 0,8 %) keine Apoptose (11,3 ± 0,8 %) (Abb. 4.1). Dies steht im Gegensatz zu anderen Faktoren der TGF-β Superfamilie, die vor allem pro-apoptische Eigenschaften besitzen. Um mögliche anti-apoptischen Wirkungen von GDF 15 genauer zu analysieren, wurden im Folgenden die Herzzellen mit GDF 15 und verschiedenen pro-apoptischen Substanzen stimuliert.

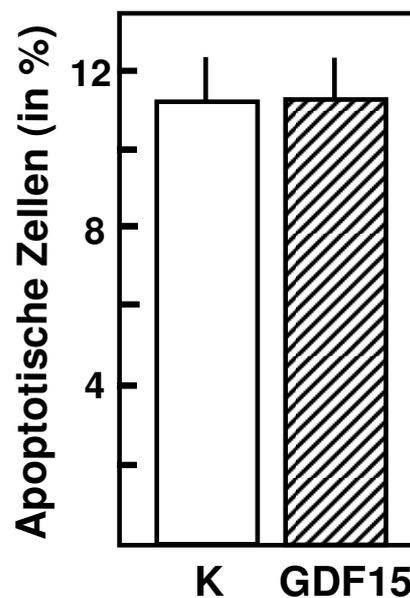


Abb. 4.1: GDF 15 induziert keine Apoptose: Die kultivierten Kardiomyozyten wurden mit GDF 15 (3 ng/ml) für 24 h stimuliert und anschließend mithilfe von Hoechst 33258 (5 µg/ml) und Propidiumiodid (1 µg/ml) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Darstellung von MW ± SE aus n=5.

4.2 Die anti-apoptotischen Effekte von GDF 15

4.2.1 Inhibition der TGF- β induzierten Apoptose

Abbildung 4.1 zeigt, dass GDF 15 keine Apoptose induziert. Wurden Zellen mit TGF- β (1 ng/ml) behandelt, führte dies zu einem signifikantem Anstieg der Apoptoserate auf 17.4 ± 1.1 % gegenüber der Kontrolle ($n=5$, $p<0.05$ vs. Kontrolle 11.4 ± 0.9 %) (Abb. 4.2). Wurden Zellen sowohl mit GDF 15 (3 ng/ml, 30 min vorher) als auch TGF- β stimuliert, reduzierte GDF 15 den apoptotischen Effekt von TGF- β von 17.4 ± 1.1 % auf 12.0 ± 0.9 % apoptotischer Zellen ($n=5$, $p<0.05$ vs. Kontrolle 11.4 ± 0.9 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass GDF 15 anti-apoptotische Effekte in adulten Herzmuskelzellen besitzt.

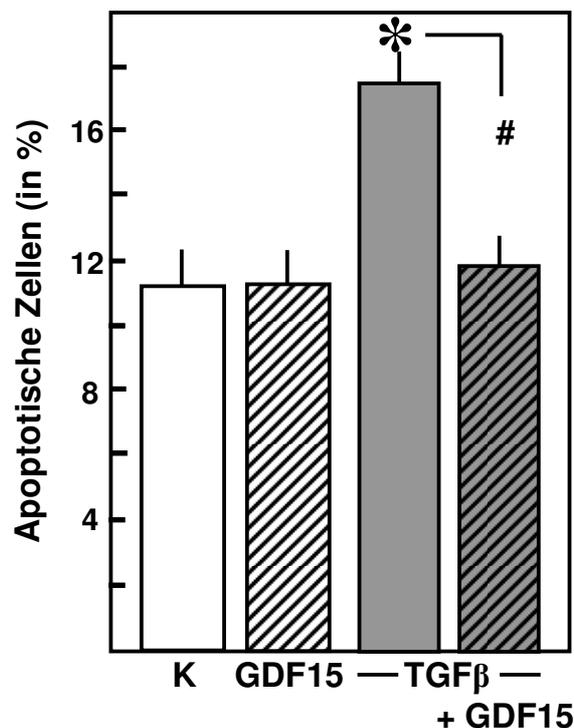


Abb. 4.2: GDF 15 inhibiert die pro-apoptotischen Effekte von TGF- β : Die kultivierten Kardiomyozyten wurden mit GDF 15 (3 ng/ml, 30 min vorher) und TGF- β (1 ng/ml) für 24 h stimuliert und anschließend mithilfe von Hoechst 33258 (5 μ g/ml) und Propidiumiodid (1 μ g/ml) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Darstellung von MW \pm SE aus $n=5$. * = $p<0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p<0,05$ vs. mit TGF- β stimulierte Zellen.

4.2.2 Inhibition der SNAP induzierten Apoptose

Eine Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen mit dem NO-Donor SNAP (100 μ M) führte zu einer Apoptoseinduktion von $17,1 \pm 1,0$ % gegenüber $11,4 \pm 0,9$ % bei den Kontrollzellen (Abb. 4.3). Wurden die Herzmuskelzellen mit GDF 15 (3 ng/ml, 30 min vorher) und SNAP behandelt, so verringerte sich die apoptotische Wirkung von SNAP auf $12,1 \pm 0,9$ % ($n=5$, $p<0.05$ vs. Kontrolle 11.4 ± 0.9 %). Diese Ergebnisse verdeutlichen die anti-apoptotischen Eigenschaften von GDF 15.

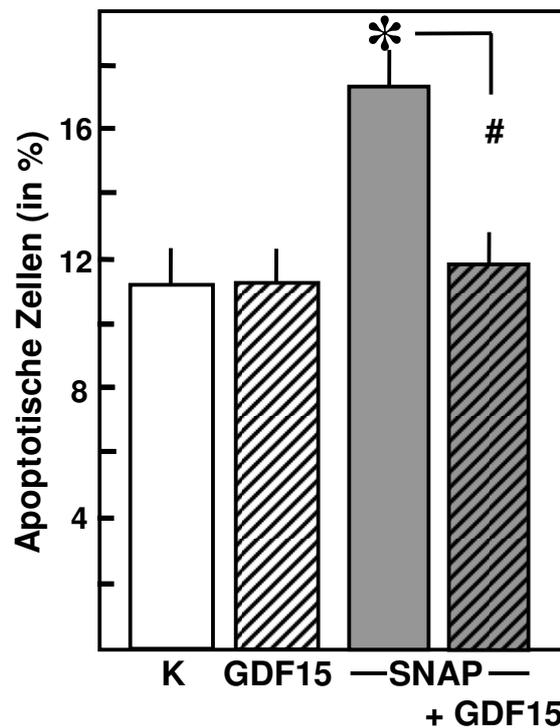


Abb. 4.3: GDF 15 inhibiert die pro-apoptotischen Effekte von SNAP: Die kultivierten Kardiomyozyten wurden mit GDF 15 (3 ng/ml, 30 min vorher) und SNAP (100 μ M) für 24 h stimuliert und anschließend mithilfe von Hoechst 33258 (5 μ g/ml) und Propidiumiodid (1 μ g/ml) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Darstellung von MW \pm SE aus $n=5$. * = $p<0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p<0,05$ vs. mit SNAP stimulierte Zellen.

4.2.3 Inhibition der Angiotensin II-Apoptoseinduktion

Im Gegensatz zu den anti-apoptotischen Auswirkungen bei TGF- β und SNAP, zeigte GDF 15 diese zunächst nicht bei Stimulation mit Angiotensin II (100 nM). Wurden die Zellen mit GDF 15 und 30 min später mit Ang II behandelt, so zeigte sich keine anti-apoptotische Wirkung von GDF 15. Die durch Ang II induzierte Apoptoserate von $14,9 \pm 0,7\%$ wurde hierbei durch GDF 15 nicht signifikant verändert ($n=7$, $p<0.05$ vs. Angiotensin II + GDF 15 $14,7 \pm 0,7\%$) (Abb. 4.4). Jedoch konnten anti-apoptotische Eigenschaften von GDF 15 nachgewiesen werden, wenn die Herzmuskelzellen erst 8 h nach der Gabe von Angiotensin II mit GDF 15 behandelt wurden. Dabei verringerte die Behandlung von kultivierten Herzmuskelzellen mit Ang II und GDF 15 (3 ng/ml, 8 h später) die Apoptoseinduktion durch Ang II von $15,3 \pm 0,8 \%$ auf $12,0 \pm 0,8 \%$ ($n=7$, $p<0.05$) apoptotischer Zellen (Abb. 4.4).

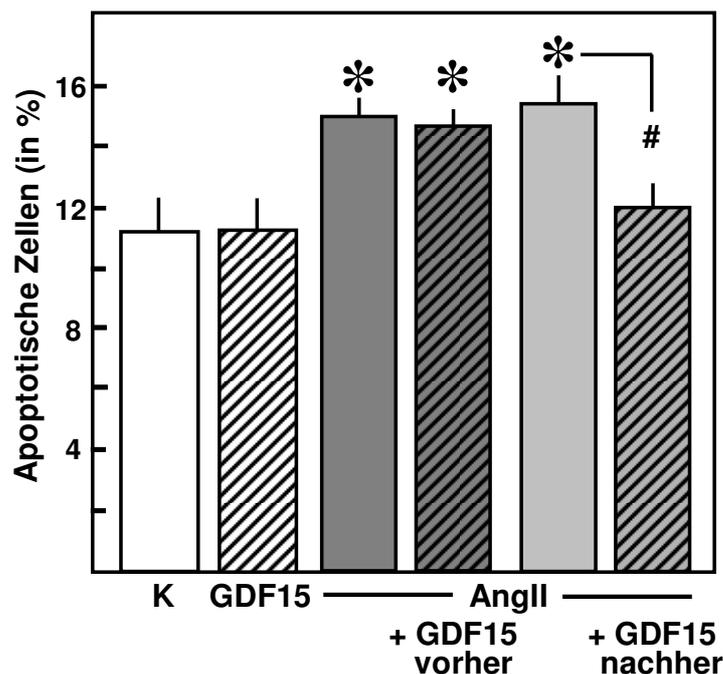


Abb. 4.4: GDF 15 inhibiert die pro-apoptotischen Effekte von Angiotensin II: Die kultivierten Kardiomyozyten wurden mit GDF 15 (3 ng/ml) und Angiotensin II (100 nM) stimuliert und anschließend mithilfe von Hoechst 33258 (5 $\mu\text{g/ml}$) und Propidiumiodid (1 $\mu\text{g/ml}$) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei zeigten sich für GDF 15 nur dann anti-apoptotische Effekte, wenn die Zellen 8 h nach Angiotensin II-Gabe mit GDF 15 stimuliert wurden. Darstellung von $MW \pm SE$ aus $n=7$. * = $p<0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p<0,05$ vs. mit Angiotensin II stimulierte Zellen.

4.2.4 Aktivierung von SMAD1,5 aber nicht von SMAD2-Proteinen

Um die Signaltransduktion von GDF 15 näher zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von SMAD-Proteinen als Maß für ihre Aktivierung durch GDF 15 in Western Blots mithilfe der spezifischen Antikörper pR-SMAD1, pRSMAD1,5 und pR-SMAD2 gemessen. Dazu wurden die Kardiomyozyten mit GDF 15 (3 ng/ml) für 15 min, 30 min, 60 min oder 120 min stimuliert. Dabei zeigte sich eine Aktivierung von SMAD1 und SMAD5 durch GDF 15 (Abb. 4.5). Im Gegensatz dazu, wurde SMAD2 durch GDF 15 nicht aktiviert. Daraus lässt sich folgern, dass sowohl SMAD1 als auch SMAD5 in der Signaltransduktion von GDF 15 in kultivierten Herzmuskelzellen der Ratte beteiligt sind. Ein Mitwirken von SMAD2 scheint dagegen nicht vorzuliegen.

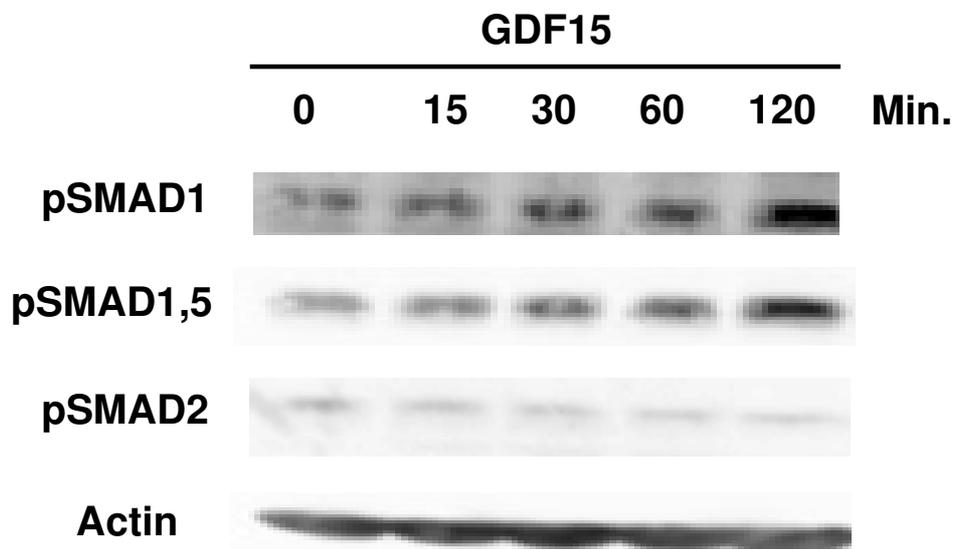


Abb. 4.5: GDF 15 aktiviert SMAD1,5 jedoch nicht SMAD2 in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte: Die kultivierten Kardiomyozyten wurden mit GDF 15 (3 ng/ml) für 15 min, 30 min, 60 min oder 120 min stimuliert. Anschließend wurden die Gesamtproteine isoliert, in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und in Western Blots mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen pR-SMAD1, pRSMAD1,5 und pR-SMAD2 analysiert. Actin wurde als Kontrolle von spezifischen Antikörpern detektiert.

4.3 GDF 15 induziert Hypertrophie in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Um die Auswirkungen von GDF 15 auf den myokardialen Hypertrophieprozess zu untersuchen, wurde anhand der Inkorporation von radioaktiv markiertem Phenylalanin die Proteinsyntheserate ermittelt. Eine Erhöhung der Proteinsyntheserate ist ein geeignetes Merkmal für die Hypertrophie der Kardiomyozyten.

Die Inkubation der isolierten Herzmuskelzellen mit GDF 15 (3 ng/ml) über 24 h vergrößerte die Proteinsyntheserate auf $147 \pm 15 \%$ ($n=14$, $p<0,05$) gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse stellen GDF 15 als einen pro-hypertrophen Faktor dar. Die Höhe der Hypertrophie entsprach der unter alpha-adrenerger Stimulation mit Phenylephrin (10 μ M) ($157 \pm 12 \%$, $n=14$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

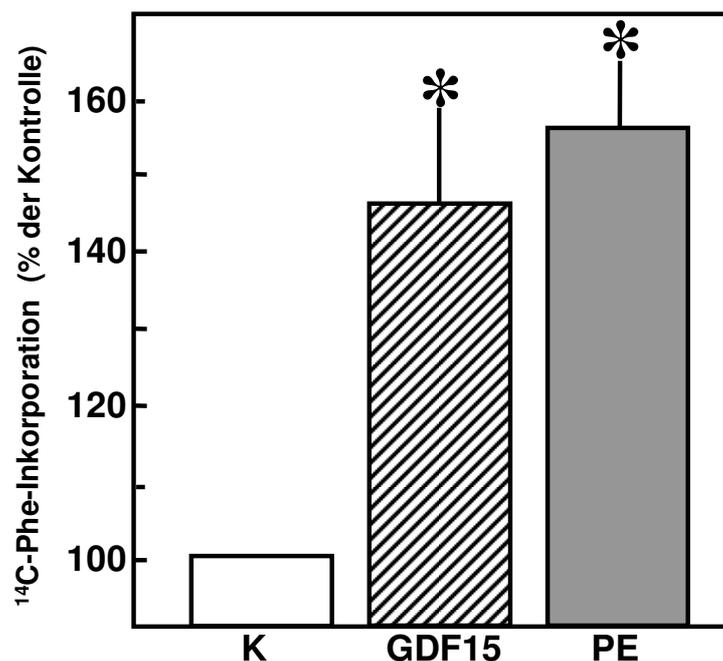


Abb. 4.6: GDF 15 induziert Hypertrophie in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte: Die Induktion mit GDF 15 erhöht die Proteinsyntheserate signifikant. Der Syntheseanstieg entspricht dabei dem von Phenylephrin (PE). Darstellung von $MW \pm SE$ aus $n=14$, * = $p<0,05$ vs. Kontrolle.

Als zusätzlicher Marker für die Hypertrophie der Kardiomyozyten wurde die Zellgröße der stimulierten Zellen bestimmt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Die Zelllänge und -breite wurde mit dem Programm Analysis® anhand von mikroskopischen Fotos, die mit einer CCD-Videokamera angefertigt wurden, gemessen und anschließend der Zellquerschnitt nach der Formel $\text{Cross section} = \text{radius}^2 \times \pi$ berechnet (Abb. 4.7).

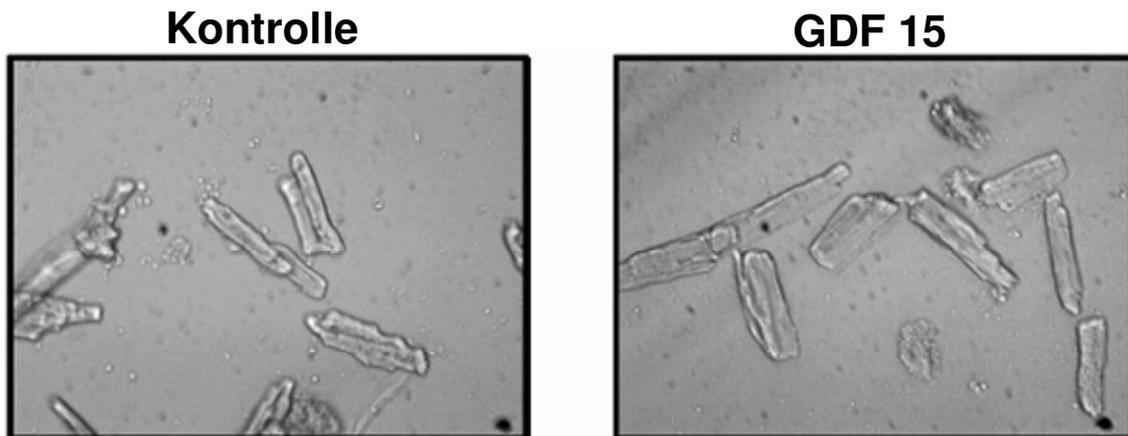


Abb. 4.7: Die Zellgröße von Herzmuskelzellen nach GDF 15-Induktion: Die Induktion mit GDF 15 (3 ng/ml) erhöhte die Zellgröße der Herzmuskelzellen signifikant. Dargestellt sind repräsentative Fotos einer CCD-Videokamera von Herzmuskelzellen ohne und mit GDF 15-Stimulation.

Die Berechnung der Zellquerschnitte ergaben einen signifikanten Anstieg der Querschnitte auf $127 \pm 5 \%$ durch GDF 15-Stimulation über 24 h (n=19, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (Abb. 4.8). Diese Resultate bestätigen die pro-hypertrophen Wirkungen von GDF 15.

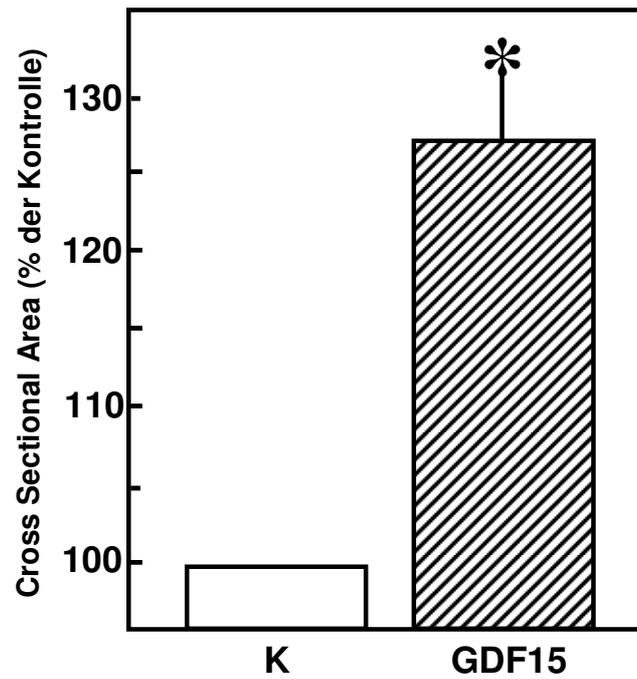


Abb. 4.8: Anstieg der Zellgröße von Herzmuskelzellen nach GDF 15 Stimulation: Die Zellquerschnitte wurden in voneinander unabhängigen Versuchsreihen ($n=19$) berechnet und zu Mittelwerten zusammengefasst. Die Stimulation mit GDF 15 für 24 h erhöhte den Querschnitt der Kardiomyozyten auf 127 ± 5 % gegenüber den Kontrollen. Darstellung von $MW \pm SE$ aus $n=19$, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4 Die Signalwege von GDF 15 in der kardialen Hypertrophie

4.4.1 GDF 15 induziert Hypertrophie über die Proteinkinase C

Die Ergebnisse aus 4.3 stellen GDF 15 als pro-hypertrophen Faktor dar. Um Erkenntnisse über die Signaltransduktionskaskade bei der durch GDF 15 vermittelten Hypertrophie zu erhalten, wurden isolierte Herzmuskelzellen der Ratte mit GDF 15 und verschiedenen Inhibitoren bekannter hypertropher Signalwege behandelt. Anschließend wurde die Proteinsynthese im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt.

Bei der PKC handelt es sich um eine Serin/Threoninkinase, die als ubiquitär vorkommendes Protein für viele Signaltransduktionsprozesse bedeutsam ist. Besonderes Interesse gilt der Beteiligung dieses Enzyms an Wachstums- und Differenzierungsprozessen (Nishizuka, 1992). Zur Untersuchung des PKC-Signalweges wurden die kultivierten Kardiomyozyten nach dem Waschen mit dem Inhibitor Goe6850 (1 μ M) behandelt. Mit 30 min Verzögerung wurde GDF 15 (3 ng/ml) zu den Schalen hinzugegeben. Goe6850 verhinderte die Steigerung der Proteinsyntheserate unter GDF 15 signifikant (118.3 ± 3.1 % vs. 99.5 ± 2.2 %, $n=5$, $p<0.05$ vs. Kontrolle) (Abb. 4.9). Dies deutet darauf hin, dass GDF 15 über die PKC Hypertrophie in adulten isolierten Herzmuskelzellen der Ratte vermittelt.

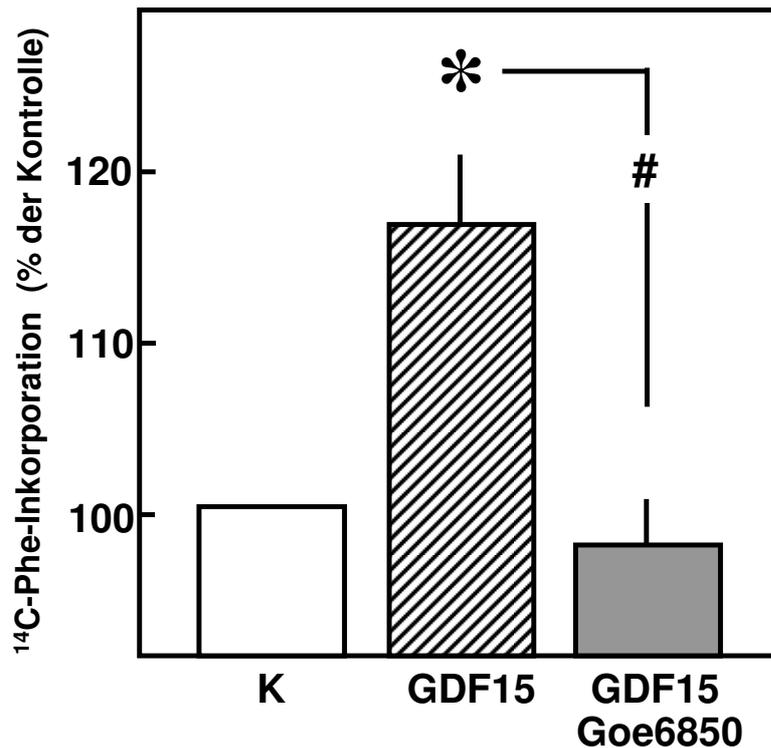


Abb. 4.9: GDF 15 induziert Hypertrophie über die PKC: Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen der Ratte mit Goe6850 (1 μ M) und GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später) verringerte die Steigerung der Proteinsyntheserate signifikant. Darstellung von MW \pm SE aus n=5, * = p<0,05 vs. unstimulierte Kontrolle. # = p<0,05 vs. mit GDF 15 stimulierte Zellen.

4.4.2 GDF 15 induziert Hypertrophie über die PI3-Kinase

Die PI3-Kinasen stellen eine Enzymfamilie dar, die sowohl Protein- als auch Lipidkinaseaktivitäten vorweisen und die eine bedeutende Rolle in zahlreichen Signaltransduktionswegen, insbesondere bei Zellwachstum und -differenzierung spielen (Xiao, 2001). Mithilfe der Inhibitoren LY294002 (10 μ M) und Wortmannin (10 nM), wurde die Beteiligung der PI3K am pro-hypertrophen Effekt von GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später) untersucht. Stimulation mit diesen beiden Inhibitoren verringerte die Proteinsynthesesteigerung von GDF 15 deutlich (Abb. 4.10). So reduzierte die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit GDF 15 und Wortmannin die durch alleinige Gabe von GDF 15 erhöhte Proteinsyntheserate von 189.7 ± 8.2 % auf 101.8 ± 9.1 % (n=7, p<0,05 vs. Kontrolle). Auch bei der Stimulation der Zellen mit LY294002 und GDF 15 wurde die Proteinsyntheserate signifikant auf 99.6 ± 16.1 % reduziert (n=5, p<0,05 vs. Kontrolle). Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung

der PI3K am Hypertrophieprozess von GDF 15 schließen. Dies steht im Einklang mit dem durch PE stimulierten, alpha-adrenergen hypertrophen Signalweg.

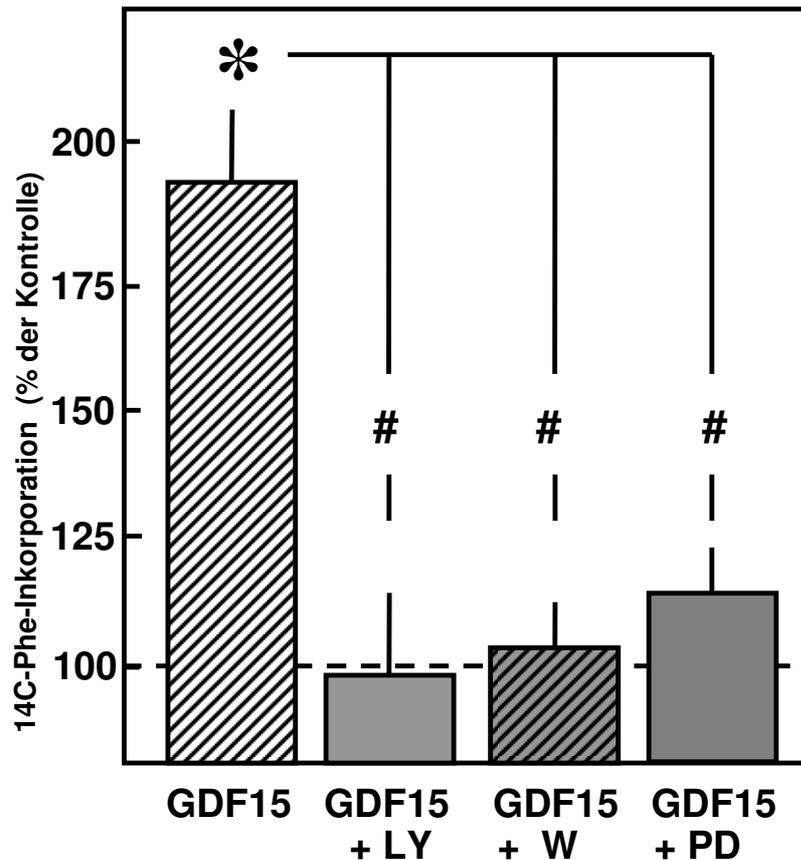


Abb. 4.10: GDF 15 induziert Hypertrophie über die PI3-Kinase und die ERK: Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen der Ratte mit LY294002 (10 μ M) und GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später), Wortmannin (10 nM) und GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später) oder PD98059 (10 μ M) und GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später) verringerte die Steigerung der Proteinsyntheserate durch alleinige GDF 15-Stimulation signifikant. Darstellung von MW \pm SE aus n=5, 7 oder 7, * = $p < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p < 0,05$ vs. mit GDF 15 stimulierte Zellen.

4.4.3 GDF 15 induziert Hypertrophie über die ERK

Die Extracellular regulated kinase (ERK), ein Mitglied der Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen war die erste der so genannten mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), der man in Herzmuskelzellen eine Beteiligung an hypertrophen Wachstumsprozessen zugeschrieben hat (Bogoyevitch et al., 1993; Sugden, 2001). Versuche mit dem hochspezifischen MAP-Kinase Kinase Inhibitor PD98059 (10 μ M) zeigten, dass dieser die hypertrophen Effekte von GDF 15 (3 ng/ml, 30 min später)

auf 116.1 ± 9.1 % reduzierte ($n=7$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) (Abb. 4.10). Eine Beteiligung der ERK am Signalweg von GDF 15 ist somit wahrscheinlich.

Zur Analyse der Kinetik der ERK-Aktivierung wurde die Phosphorylierung von ERK im Vergleich zur Gesamt-ERK mittels Western Blot gemessen. Dabei zeigte sich, dass 5 min nach GDF 15 Stimulation eine ERK-Phosphorylierung nachweisbar war (Abb. 4.11). Diese Aktivierung war über einen Zeitraum von 4 h sichtbar, mit einem Maximum der Aktivierung nach 3 h (164.2 ± 17.6 %, $n=5$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). Diese Resultate verdeutlichen die Beteiligung der ERK in der Signaltransduktion von GDF 15.

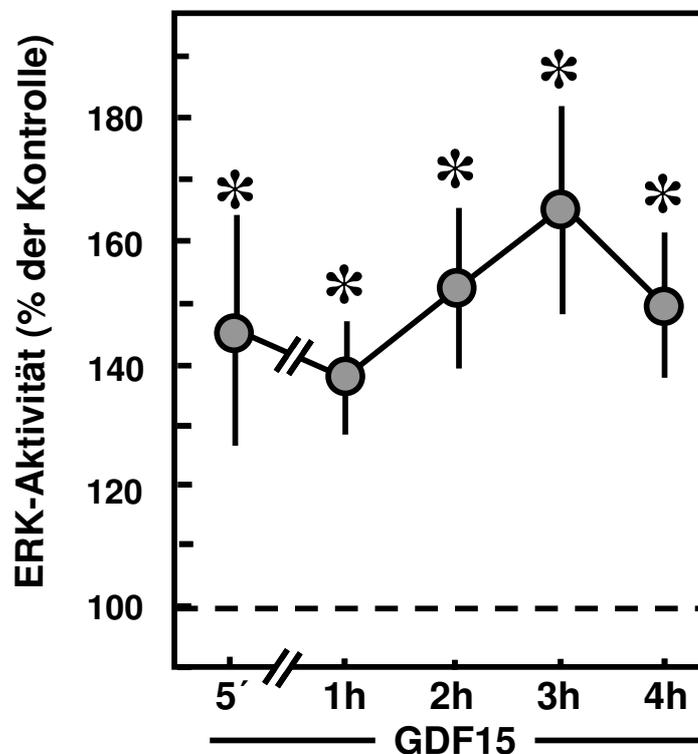


Abb. 4.11: Die Kinetik der ERK-Aktivierung: Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen der Ratte mit GDF 15 (3 ng/ml) führte zu einem langfristigen Anstieg der ERK-Aktivierung im Western Blot. Darstellung von $MW \pm SE$ aus $n=5$, * = $p<0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle.

4.4.4 GDF 15 induziert Hypertrophie über den Transkriptionsfaktor SMAD

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie sind klassische Aktivatoren des Transkriptionsfaktors SMAD. Gesteigerte Expression von TGF- β und weiterer

Familienmitglieder unter pathophysiologischen Bedingungen im Herzen sind die ersten Anzeichen für eine SMAD-Aktivierung (Hao et al., 1999; Yndestad et al., 2004). Auch bei GDF 15 zeigte sich eine SMAD-Beteiligung an der Hypertrophieentwicklung (Abb. 4.12). Eine Transformation der Kardiomyozyten mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden ($0.5 \mu\text{M}$), welche die SMAD-Aktivität intrazellulär abfangen, führte zu einer Senkung der durch GDF 15 auf $131.1 \pm 8.2 \%$ gesteigerten Proteinsyntheserate auf $111.2 \pm 7.3 \%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

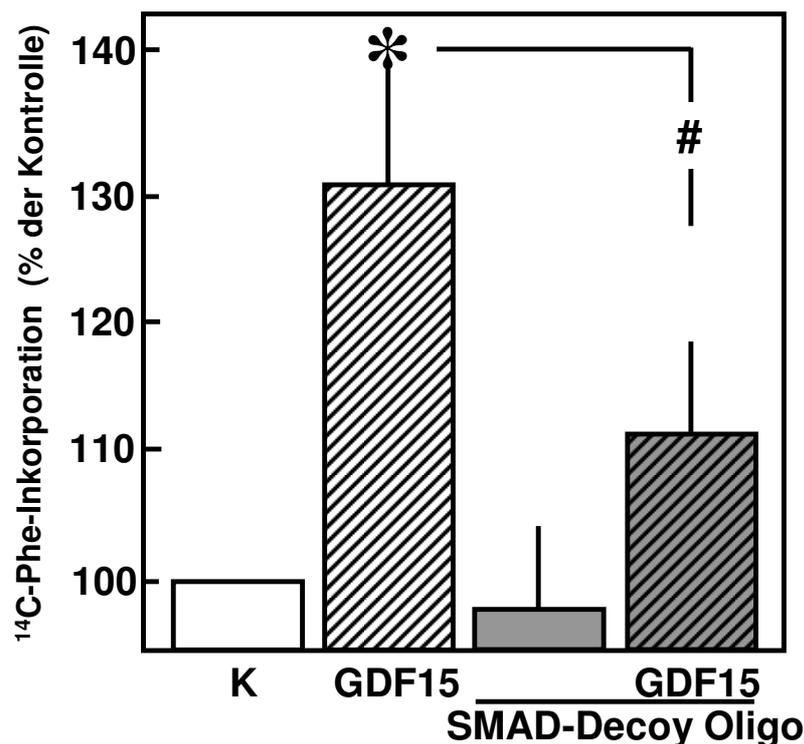


Abb. 4.12: GDF 15 induziert Hypertrophie über den Transkriptionsfaktor SMAD: Transformation von isolierten Herzmuskelzellen der Ratte mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden ($0.5 \mu\text{M}$) und GDF 15 (3 ng/ml , 30 min später) verringerte die Steigerung der Proteinsyntheserate. Darstellung von $\text{MW} \pm \text{SE}$ aus $n=11$, * = $p<0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p<0,05$ vs. mit GDF 15 stimulierte Zellen.

Im Retardation Assay steigerte die Stimulation mit GDF 15 (3 ng/ml) die SMAD-Bindungsaktivität innerhalb von 2 h auf $123 \pm 6 \%$ ($n=7$, $p<0.05$ vs. Kontrolle) (Abb. 4.13). Dieses Ergebnis bekräftigt die These, dass SMAD-Proteine in der Signaltransduktion von GDF 15 beteiligt sind.

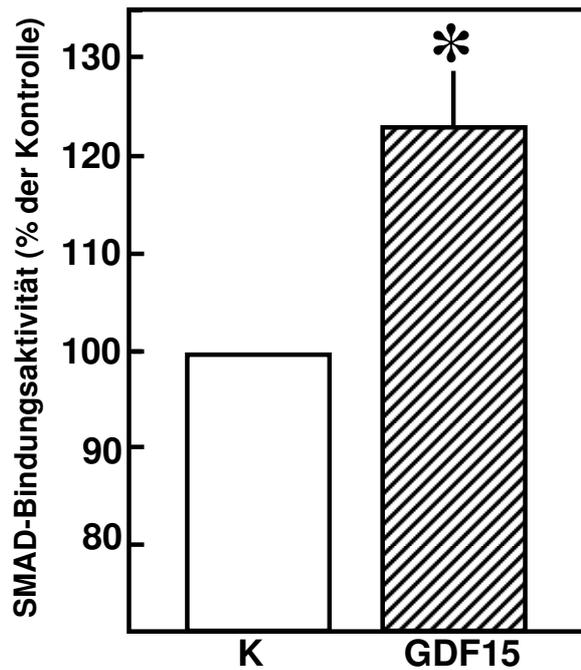


Abb. 4.13: GDF 15 steigert im Retardation Assay die SMAD-Bindungsaktivität: Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen mit GDF 15 (3 ng/ml) führte zu einer Steigerung der SMAD-Bindungsaktivität. Darstellung von MW \pm SE aus n=7, * = p<0,05 vs. unstimulierte Kontrolle.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Proteinkinase C, die PI3-Kinase, die ERK und SMAD-Proteine als Signalmoleküle in der GDF 15 stimulierten Hypertrophie beteiligt sind. Deshalb erfolgte nun eine Analyse der Reihenfolge dieser Stoffe. Inhibitoren der PI3-Kinase (LY294002, 10 μ M), der PKC (BIM, 5 μ M) und der ERK (PD98059, 10 μ M) verhinderten die Aktivierung der SMAD-Bindungsaktivität unter GDF 15 im Retardation Assay (Abb. 4.14). Dabei wurde die durch GDF 15 gesteigerte Proteinsyntheserate durch die simultane Gabe von GDF 15 und LY von $125,5 \pm 3,1$ auf $111,8 \pm 6,2$ (n=20, p<0.05 vs. Kontrolle) gesenkt, bei BIM von $137,7 \pm 9,9$ auf $104,6 \pm 7,9$ (n=13, p<0.05 vs. Kontrolle) und bei PD von $133,7 \pm 6,5$ auf $105,0 \pm 8,6$ (n=14, p<0.05 vs. Kontrolle). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die SMAD-Proteine der PI3-Kinase, der PKC und der ERK in der Signaltransduktion von GDF 15 nachgeschaltet sind.

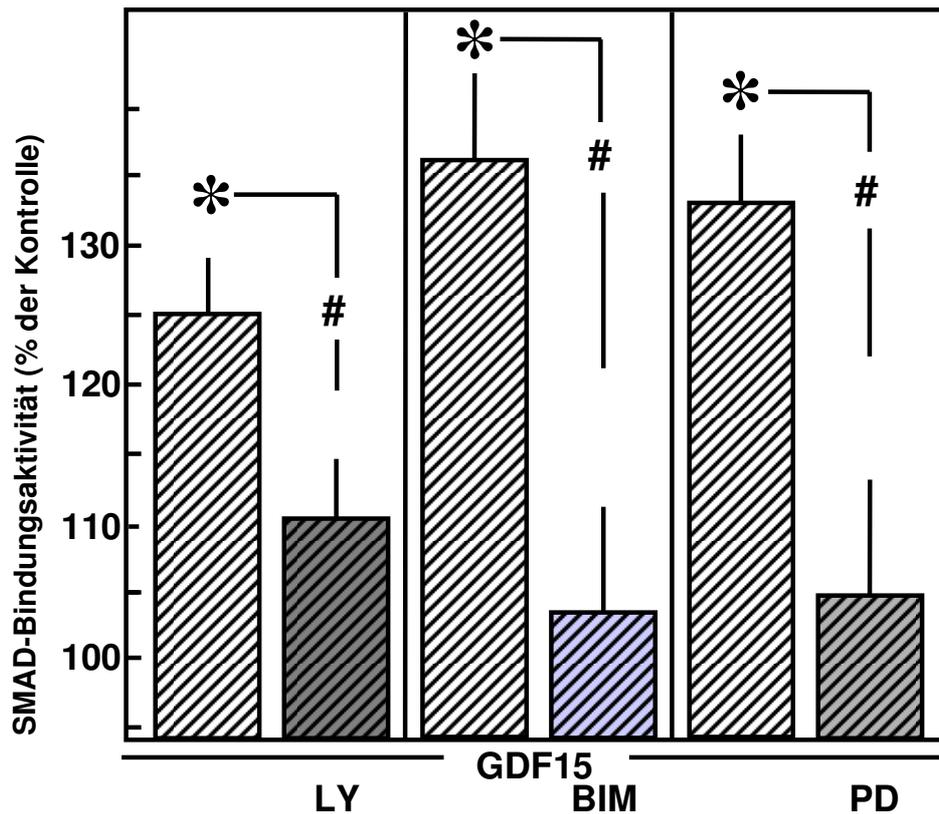


Abb. 4.14: Inhibitoren der PI3-Kinase, der PKC und der ERK verhindern im Retardation Assay den Anstieg der SMAD-Bindungsaktivität durch GDF 15: Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen mit GDF 15 (3 ng/ml) führte zu einer Steigerung der SMAD-Bindungsaktivität. Simultane Behandlung von GDF 15 mit LY294002 (10 μ M), BIM (5 μ M) oder PD98059 (10 μ M) verringerte diese SMAD-Aktivierung signifikant. Darstellung von MW \pm SE aus n=20, n=13 oder n=14, * = $p < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle. # = $p < 0,05$ vs. mit GDF 15 stimulierte Zellen.

5 Diskussion

Herzerkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Dabei stellt die Herzinsuffizienz die am schnellsten wachsende Untergruppe dar. Die 5-Jahres-Mortalität liegt trotz Fortschritten in der medikamentösen Therapie weiterhin bei über 50 % (Haldeman et al., 1999; Owan et al., 2006). Neue effektive Therapieansätze sind nur durch ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen zu erwarten. Bei der Herzinsuffizienz werden, weitgehend unabhängig von der auslösenden Ursache, prinzipielle pathophysiologische Mechanismen aktiviert, zu denen vor allem die myokardiale Apoptose, die Myokardhypertrophie und das ventrikuläre Remodeling zählen. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass GDF 15 während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermehrt induziert wird (Kempf et al., 2007a). Ziel dieser Arbeit war es daher, den Wachstumsfaktor GDF 15 näher auf seine Beteiligung bei diesen kardialen Prozessen hin zu untersuchen.

5.1 Die anti-apoptotischen Effekte von GDF 15

In der vorliegenden Arbeit konnten GDF 15 anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden und somit dessen Beteiligung in regulatorischen Mechanismen der Herzmuskelzelle gezeigt werden. Die Bedeutung der Apoptose für die Initiierung und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz wurde erst in den letzten Jahren bekannt. Deshalb wurde der apoptotische Zelltod als wichtige Interventionsstelle für neue Therapiemöglichkeiten entdeckt (Gill et al., 2002). Auch bereits bekannte Therapien wirken in Teilen über die Inhibition von Apoptose. Beispielsweise werden den weit verbreitet eingesetzten Beta-Blockern Carvedilol und Propranolol anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben (Yue et al., 1998).

Dieser anti-apoptotische Effekt von GDF 15 wurde auch von anderen Arbeitsgruppen vorgestellt. Dabei wurde von Kempf et al. (2006) GDF 15 als ein Zytokin identifiziert, welches in Herzmuskelzellen *in vitro* durch simulierte Ischämie/Reperfusion verstärkt exprimiert wurde. Stimulation der Zellen mit GDF 15 eine Stunde vor dem ischämischen Ereignis, verminderte die Nekroserate während der Ischämie und die

Apoptoserate während der folgenden Reperfusion. Ein *in vivo* Modell myokardialer Ischämie/Reperfusion und humanes Autopsiematerial von an Myokardinfarkt verstorbenen Patienten zeigte zudem, dass sowohl chronische Ischämie als auch Ischämie mit anschließender Reperfusion zu einer deutlichen und andauernden GDF 15 Expression im ischämischen Bereich führte (Kempf et al., 2006). Vor allem die Kardiomyozyten im Infarkt- und Infarkttrandbereich schienen für diese gesteigerte GDF 15 Expression verantwortlich zu sein. Daneben wurden GDF 15 Knockout-Mäuse einer einstündigen Koronarligatur mit anschließender 24-stündiger Reperfusion unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die GDF 15 Knockout-Mäuse gegenüber Kontrolltieren eine ausgedehntere Infarktfläche und eine höhere Apoptoserate im Infarktgrenzgebiet aufwiesen. Damit wurde experimentell bewiesen, dass endogenes GDF 15 myokardialen Gewebeschaden verringert und *in vivo* ein entscheidendes Protein für das Zellüberleben darstellt.

Ferner wurden anti-apoptotische Effekte von GDF 15 bei cerebellaren Neuronen beschrieben (Subramaniam et al., 2003). GDF 15 senkte hier die Apoptoserate über zwei unterschiedliche Signalwege. Erstens durch Aktivierung von Akt und GSK der PI3-Kinase. Zweitens durch endogene Inhibition des ERK/c-Jun Signalweges. Außerdem schwächt GDF 15 die ROS Bildung, einem Induktor der ERK ab und verhindert dadurch den Zelltod. Die Erkenntnisse, dass die GDF 15 Expression in geschädigten kortikalen Neuronen und Kardiomyozyten gesteigert ist und das GDF 15 als neuronaler und kardialer Überlebensfaktor *in vitro* über die PI3-Kinase wirkt, unterstützen das aufkommende Denkmuster, dass die Zelltodregulation im Gehirn und im Herz durch gleiche Überlebensfaktoren und durch überlappende Signaltransduktionswege kontrolliert ist (Cai et al., 2004; Dudek et al., 1997; Siren et al., 2001; Parsa et al., 2003). Pro-apoptotische Eigenschaften von GDF 15 wurden dagegen in Prostata- und Kolorektalen Tumoren berichtet (Li et al., 2000; Tan et al., 2000). Diese Wirkungen können jedoch auch als zellprotektiv angesehen werden, da sie die weitere Tumorausbreitung verhindern (Baek et al., 2001; Liu et al., 2003).

Insgesamt wurde GDF 15 bisher als anti-apoptotisches Zytokin im ischämischen/reperfundierten Herzen und in anderen Geweben beschrieben. Gegen welche spezifischen apoptotischen Stimuli GDF 15 dabei wirkte, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Daher wurden in eigenen Untersuchungen die

Wirkungen von GDF 15 gegen drei verschiedene Apoptoseinduktoren getestet. Die einzelne Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen mit GDF 15 hatte keinen direkten Effekt auf die Apoptoserate. Dies steht im Kontrast zu anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie. So wirkten beispielsweise TGF- β , Myostatin, Activin A und BMP-2 bei alleiniger Gabe pro-apoptotisch in Kardiomyozyten (Yamamura et al., 2000). Jedoch wurden durch Vorinkubation von Herzmuskelzellen mit GDF 15 und anschließender TGF- β Stimulation die pro-apoptotischen Wirkungen von TGF- β abgeschwächt. Diese Ergebnisse deuten auf eine anti-apoptotische Wirkung von GDF 15 hin. Betrachtet man dieses Ergebnis für sich, könnte dieser Effekt auf eine kompetitive Rezeptorblockierung von GDF 15 und TGF- β zurück zu führen sein.

TGF- β wirkt über Serin-Threonin-Kinase-Rezeptorsysteme mit oder ohne nachfolgende SMAD-Aktivierung (Shi et Massague, 2003). Über welche Rezeptoren GDF 15 wirkt, ist bisher noch nicht eindeutig belegt, es sind aber sowohl SMAD-abhängige wie SMAD-unabhängige Signaltransduktionswege beschrieben. Da beide Faktoren Mitglieder der TGF- β Familie sind, wäre ein Andocken an dieselben Rezeptorsysteme möglich. Die unterschiedlichen Wirkungen von GDF 15 und TGF- β könnte dann durch die Aktivierung verschiedener Rezeptorsubtypen innerhalb der TGF- β Rezeptoren zustande kommen. Einige Mitglieder der TGF- β Superfamilie verwenden darüber hinaus einen anderen Rezeptortyp, der sich aus einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase und einem Glycosylphosphoinositol-gekoppeltem Alpha-Rezeptor zusammensetzt (Durbec et al., 1996). Ob die Effekte einer GDF 15 Stimulation auch über diesen Signalweg verlaufen, ist bisher nicht untersucht worden.

Ebenfalls bewirkte GDF 15 bei gleichzeitiger Stimulation mit dem pro-apoptotischen Faktor SNAP eine Abschwächung der Apoptoserate. Bei SNAP handelt es sich um einen NO-Donor, der in isolierten adulten Kardiomyozyten Apoptose auslöst (Taimor et al., 2000). NO wirkt hierbei cGMP-abhängig pro-apoptotisch. Da TGF- β und SNAP über unterschiedliche Rezeptoren wirken, erscheinen die anti-apoptotischen Effekte von GDF 15 daher nicht durch eine wie oben beschriebene kompetitive Rezeptorblockierung von GDF 15 und TGF- β zustande zu kommen. Vielmehr hat GDF 15 wohl selbst anti-apoptotische Effekte, die durch eine eigene Signaltransduktionskaskade bewirkt werden.

Auch gegenüber dem pro-apoptotischen Faktor Angiotensin II wirkte GDF 15 kardioprotektiv. Bei Ang II handelt es sich um die aktive Komponente des Renin-Angiotensin-Systems. Ang II spielt vor allem in der myokardialen Hypertrophie und Apoptose eine wichtige Rolle (Lee et Lindpaintner, 1993; Kajstura et al., 1996). Aufgrund von pharmakologischen Inhibitoren werden zwei Subtypen von Ang II Rezeptoren, AT1-Rezeptoren und AT2-Rezeptoren unterschieden. Bei beiden handelt es sich um G-Protein-gekoppelte 7-Helixtransmembranrezeptoren. Die Apoptosewirkung von Ang II wird durch AT1-Rezeptoren vermittelt. Nach Ang II-Bindung an den AT1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von zwei second-Messengern, IP3 und DAG (Abdellatif et al., 1991). IP3 mobilisiert Kalzium aus den intrazellulären Speichern und DAG ist der physiologische Aktivator der Proteinkinase C (Nishizuka, 1986).

Wurden kultivierte Herzmuskelzellen mit GDF 15 und Ang II (30 min später) behandelt, war zunächst keine Veränderung der Apoptoserate nachweisbar. Eine signifikante Abschwächung der Apoptoserate wurde erst sichtbar, nachdem GDF 15 8 h nach Ang II zugegeben wurde. Dies steht im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen von TGF- β und SNAP, bei denen durch vorherige GDF 15 Gabe die Apoptoserate vermindert werden konnte. Schröder et al. (2006) zeigten, dass für die Apoptoseinduktion von Ang II die Kardiomyozyten erst TGF- β freisetzen müssen, welches dann die Apoptose in einer autokrinen Schleife anregt. Daher scheint GDF 15 bereits abgebaut zu sein, wenn man es vor der Ang II Stimulation zu den Zellen gibt. Wird GDF 15 dagegen nach der Ang II Stimulation hinzugefügt, resultiert ein Schutz gegenüber der Ang II induzierten Apoptose, da die TGF- β induzierte Apoptose nun verhindert werden kann.

Über welchen Signalweg GDF 15 anti-apoptotisch wirkt, war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Im Western Blot konnten wir erstmalig eine Aktivierung von SMAD1- und SMAD5-Proteinen durch GDF 15 nachweisen. Diesen Ergebnissen entsprechend, zeigten Masaki et al. (2005), dass SMAD1 bei Ischämie/Reperfusion aktiviert wird und sowohl die Infarktfläche als auch die Apoptoserate durch Hochregulation von Bcl-xL und β -catenin vermindert. Auch das kardioprotektive BMP wirkte in Kardiomyozyten anti-apoptotisch über SMAD1-Aktivierung (Izumi et al., 2001). Darüber hinaus führte der Verlust von SMAD5 in Kardiomyozyten zu einem

Anstieg der Apoptose (Sun et al., 2005). Somit halten wir eine Beteiligung von SMAD1- und SMAD5-Proteinen bei den anti-apoptotischen Effekten von GDF 15 für sehr wahrscheinlich. SMAD2-Proteine wurden dagegen im Western Blot durch GDF 15 im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der TGF- β Familie Aktivin, Myostatin und TGF- β nicht aktiviert. Diese Faktoren wirken pro-apoptotisch in kultivierten Herzmuskelzellen. Zudem wird eine SMAD2-Aktivierung mit einer Apoptoseinduktion verbunden (Euler-Taimor et Heger, 2006).

Weitere Signalwege von GDF 15 in der Apoptose konnten von anderen Arbeitsgruppen identifiziert werden. Kempf et al. (2006) zeigten eine Beteiligung der PI3-Kinase und der Serin-Threonine-Kinase Akt in den anti-apoptotischen Wirkungen von GDF 15. Dieser PI3K-Akt-Signalweg ist im Herzen mit anti-apoptotischen Prozessen verbunden (Cai et Semenza, 2004; Gao et al., 2002). Die Aktivierung der PI3-Kinase regt verschiedenste weitere Kinasen an, die direkt oder indirekt das Zellüberleben beeinflussen. Ein wichtiges Zielprotein der PI3-Kinase ist die Proteinkinase Akt, die in Kardiomyozyten zellprotektiven Charakter besitzt, der auch vor den Auswirkungen von Ischämie/Reperfusion schützt (Fujio et al., 2000). Die PI3-Kinase greift hierbei über die Akt-abhängige Phosphorylierung des BH₃ Peptids Bad aus der BCL-Familie sowohl in den apoptotischen als auch den nekrotischen Zelltod ein (Datta et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, das GDF 15 in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte anti-apoptotisch wirkt. Die Signaltransduktion könnte hierbei über SMAD1 und SMAD5-Proteine laufen. Andere Arbeitsgruppen zeigten zudem eine Beteiligung des PI3K-Akt-Signalweges bei den anti-apoptotischen Prozessen im Herzen. Unter klinisch therapeutischen Gesichtspunkten könnte zukünftig an eine lokale GDF 15 Konzentrationserhöhung gedacht werden, um Herzmuskelzellen nach Ischämie vor Apoptose zu schützen und somit die Prognose des Patienten zu verbessern. Eine systemische Therapie erscheint eher kontraindiziert, da die vielfältigen systemischen Wirkungen von GDF 15 bisher nicht überschaubar sind.

5.2 Die pro-hypertrophen Effekte von GDF 15

Ein potenter Prädiktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die linksventrikuläre Hypertrophie (Levy et al., 1990). Es handelt sich dabei zunächst um einen Kompensationsmechanismus, der bei beginnender Dilatation des Ventrikels die Wandspannung senkt und die Hämodynamik verbessert. Langfristig ist das Bestehen der Myokardhypertrophie jedoch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit verbunden, eine linksventrikuläre Dysfunktion mit nachfolgender Herzinsuffizienz zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Stimulation von adulten Herzmuskelzellen der Ratte mit GDF 15 über 24 h eine signifikante Steigerung der Proteinsynthese. Dies ist ein geeignetes Merkmal für hypertrophe Prozesse in den Zellen. Das Ausmaß der Hypertrophie entsprach dabei der unter alpha-adrenerger Stimulation mit Phenylephrin. Zudem wurden mithilfe der Zellquerschnittsfläche die Auswirkungen von GDF 15 auf die Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten gemessen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellgröße gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnisse verdeutlichen die pro-hypertrophe These für GDF 15.

Xu et al. (2006) zeigten in kultivierten neonatalen Herzzellen der Ratte dagegen anti-hypertrophe Effekte für GDF 15. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass sich neonatale und adulte Kardiomyozyten bedeutend unterscheiden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen auf dem Zellkulturmodell isolierter adulter Kardiomyozyten nach Piper et al. (1982). Die Ursachen einer myokardialen Hypertrophie lassen sich *in vivo* nur schwer untersuchen, da eine Abgrenzung neurohumoraler von mechanischen Effekten kaum möglich ist. Im Zellkulturmodell nach Piper ist es dagegen möglich, durch den Einsatz definierter Medien die Zellantwort direkt auf die Wirkung eines bestimmten Agonisten oder Antagonisten abzuleiten. Darüber hinaus kann auch der Einfluss anderer Zelltypen durch die reine Myozytenkultur vermieden werden. Aufgrund der hohen Komplexität, adulte Kardiomyozyten nach Piper zu isolieren, wird dieses Kulturmodell seltener als das der neonatalen Kardiomyozyten verwendet. Doch gerade bei Fragestellungen, die sich mit der Entstehung der myokardialen Hypertrophie befassen, bieten adulte Herzmuskelzellen entscheidende Vorteile.

Zum einen handelt es sich bei adulten Kardiomyozyten um ausdifferenzierte Zellen. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu neonatalen Zellen keine Proliferation mehr stattfindet (Kasten, 1972; Schwarzfeld et Jacobson, 1981). Des Weiteren entspricht die basale Proteinsyntheserate der adulten Kardiomyozyten *in vitro* ungefähr der *in vivo*-Syntheserate, wobei sie bei neonatalen Zellen um ein Vielfaches höher liegt (Clark et al., 1993). Ein weiterer Gesichtspunkt sind die Expression verschiedener Proteinisoformen in den beiden Zelltypen (Takahashi et al., 1992). Diese Unterschiede gestatten auch unter klinischen Aspekten eine bessere Vergleichbarkeit der Myokardhypertrophie des Menschen mit dem Kulturmodell der adulten Herzmuskelzellen, da es sich in beiden Fällen um terminal differenzierte, postmitotische Zellen handelt. Daher lassen sich die Ergebnisse der neonatalen Zellen mit denen in dieser Arbeit vorliegenden kaum vergleichen. So zeigten sich auch bei der Untersuchung der Signaltransduktion von GDF 15 wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. In den neonatalen Herzmuskelzellen wurden SMAD2-Proteine aktiviert (Xu et al., 2006), während die adulten Zellen in unseren Versuchen durch eine SMAD1,5-Induktion charakterisiert waren.

Bei weiteren Versuchen von Xu et al. (2006) waren GDF 15 Knockout-Mäuse durch ein erhöhtes Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis gekennzeichnet. Jedoch war die Kardiomyozytengröße hierbei nicht signifikant vergrößert. Dazu zeigte die echokardiographische Untersuchung der linken Ventrikelwand keine Größenzunahme. Auch die fetale Genexpression, die normalerweise bei hypertrophen Prozessen gesteigert ist, blieb unverändert. Folglich scheint nicht die kardiale Hypertrophie für diese Herzgewichtszunahme verantwortlich zu sein. Vielmehr sind wohl andere Remodeling-Prozesse wie die kardiale Fibrose daran beteiligt. Dazu zeigte eine zweiwöchige simulierte Druckbelastung der GDF 15 Knockout-Mäuse eine signifikante Reduktion der kardialen Leistungsfähigkeit gegenüber den Kontrolltieren (Xu et al., 2006). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den vom Autor geforderten anti-hypertrophen Eigenschaften von GDF 15. Hätte GDF 15 tatsächlich eine anti-hypertrophe Wirkung, so würde das Fehlen dieser Eigenschaften in den GDF 15 Knockout-Mäusen zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit der Herzen führen. Vielmehr zeigt dieser Versuch, dass GDF 15 kardioprotektiv in Herzmuskelzellen wirkt. Die anti-hypertrophe These von Xu et al.

(2006) erscheint darüber hinaus als sehr fragwürdig, da diese Arbeitsgruppe eine Aktivierung des ERK-Akt-Signalwegs durch GDF 15 in ihren Versuchen zeigte. Für die ERK-Akt-Signaltransduktion sind bisher jedoch eindeutig pro-hypertrophe Eigenschaften beschrieben worden (Schlüter et al., 1999; Bueno et al., 2000; Kempf et al., 2007).

Bei Experimenten mit GDF 15 überexprimierenden Mäusen zeigte sich eine Resistenz gegenüber druckinduzierter Hypertrophie (Xu et al., 2006). Deswegen beschreibt der Verfasser anti-hypertrophe Eigenschaften für GDF 15. Hierbei sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass die GDF 15 überexprimierenden Mäusen bereits in ihrer Embryonalentwicklung durch überhöhte GDF 15 Konzentrationen gekennzeichnet sind. Somit kann es im Fetus zu nicht nachvollziehbaren GDF 15 Wirkungen am Herzen kommen. Beispielsweise waren die GDF 15 überexprimierenden Mäusen schon vor den Versuchsreihen durch vergrößerte Vorhöfe gekennzeichnet, was eher auf hypertrophe Wirkungen für GDF 15 hindeutet (Xu et al., 2006). Vergleiche mit Kardiomyozyten aus dem Zellkulturmodell nach Piper sind daher kaum möglich, da diese erst in der Kultur stimuliert werden. Ein anschauliches Beispiel für die Verschiedenheit neonataler und adulter Stimulation von Herzmuskelzellen liefern die Experimente von Bowman et al. (1997). Während die herzspezifische Überexpression der Proteinkinase-C β in adulten Tieren zu einer moderaten Hypertrophie mit erschwerter, diastolischer Entspannung führte, bewirkte die Expression bei Neugeborenen starke Anomalien bezüglich der Regulation intrazellulären Kalziums und den plötzlichen Tod der Tiere. Zudem sollte beim Vergleich der Ergebnisse von Xu et al. (2006) und denen in dieser Arbeit vorgestellt bedacht werden, dass sich Herzzellen der Ratte und der Maus in Bezug auf ihre Hypertrophiereaktionen erheblich unterscheiden. So zeigten Herzzellen der Maus eine autonome Hypertrophie im Serum-freien Medium, was bei Zellen der Ratte nicht beobachtet werden konnte (Deng et al., 2000). Ferner reagierten Kardiomyozyten der Maus und der Ratte unterschiedlich auf bestimmte Wachstumsfaktoren. Phenylephrin und Endothelin-1 führten beispielsweise bei Myozyten der Ratte, jedoch nicht bei Myozyten der Maus zu Hypertrophie (Deng et al., 2000).

Eine weiterer entscheidender Diskussionspunkt in der Veröffentlichung von Xu et al. (2006) sind die Ergebnisse, welche eine signifikante Verbesserung einer Kardiomyopathie durch direkte GDF 15 Injektion im Mausmodell zeigten. Hierbei wurden MLP-defiziente Mäuse verwendet, die das morphologische und klinische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz aufwiesen. Durch intravenöse GDF 15 Injektion verbesserte sich die fraktionelle Faserverkürzung dieser Mäuse signifikant. Mithilfe dieser fraktionellen Faserverkürzung kann die linksventrikuläre Leistungsfähigkeit gemessen werden. Sie bezeichnet die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges und wird aus dem Verhältnis zwischen dem größten und dem kleinsten Durchmesser der linken Herzkammer während einer Herzaktion berechnet. Ein ansteigender Wert steht hierbei für eine zunehmende Herzleistung. Daher scheint GDF 15 die kardiale Leistungsfähigkeit positiv zu beeinflussen, was vor allem durch pro-hypertrophe Prozesse zu erklären ist. Zudem zeigte sich in den Mäusen eine Abnahme der ventrikulären Dilatation nach der GDF 15-Injektion. Somit konnte nachgewiesen werden, dass durch GDF 15-Behandlung das klinische Bild einer Herzinsuffizienz im Tiermodell entscheidend gebessert werden konnte. Der Aufbau dieser Versuchsreihe entspricht dabei am ehesten unseren Versuchsbedingungen, da auch adulte, terminal differenzierte Herzmuskelzellen stimuliert wurden.

Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten auf pro-hypertrophe Eigenschaften für GDF 15 hin. Frank et al. (2008) setzten Herzmuskelzellen für 24 h einem biomechanischen Dehnungsreiz aus oder stimulierten diese mit Phenylephrin. Beide Vorgehensweisen induzierten ein entsprechend starkes hypertrophes Wachstum. Jedoch zeigte sich nach Analyse der Zellen bezüglich ihres Genexpressionsmusters, dass nur bei den gestreckten Zellen GDF 15 signifikant hochreguliert war. Diese Ergebnisse bestätigen eine Beteiligung von GDF 15 an pro-hypertrophen Prozessen, die mit einer gestiegenen Wandspannung und somit einem erhöhten biomechanischen Stress verbunden waren. Ein weiteres Indiz für die pro-hypertrophen Eigenschaften von GDF 15 lieferte die Erkenntnis, dass die Stimulation mit Angiotensin II, einem potenten Hypertrophie-Induktor, eine signifikant gesteigerte GDF 15 Expression zur Folge hatte (Frank et al., 2008). Diesen Ergebnissen entsprechend, reduzierte der Angiotensin-Rezeptor-Blocker Irbesartan die Streck-Induzierte GDF 15 Expression. Daraus lässt sich folgern, dass der Angiotensin-

Rezeptor die biomechanische Induktion von GDF 15 herbeiführen könnte. Untersuchungen von Buitrago et al. (2005) beschäftigten sich mit den Auswirkungen des transkriptionellen Repressors Nab1 auf das myokardiale Wachstum. Nab1 reduzierte hierbei myokardiale Hypertrophie durch Inhibition des Transkriptionsfaktors Egr. Experimentelle Überexpression von Nab1 *in vivo* zeigte in der Gen-Analyse eine erhebliche Reduktion der GDF 15 Synthese. Diese Ergebnisse unterstreichen die pro-hypertrophe These für GDF 15.

5.3 Die Signaltransduktion von GDF 15 bei der kardialen Hypertrophie

Im Herzen können sowohl adaptive als auch maladaptive Formen der Hypertrophie unterschieden werden. Ob die pro-hypertrophen Effekte von GDF 15 positive oder negative Auswirkungen auf die langfristige kardiale Leistungsfähigkeit haben, ist anhand der bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig bestimmbar. Bisher bestand die Hypothese, dass eine chronische Belastung zu einer maladaptiven Hypertrophie und eine intermittierende Belastung wie beispielsweise körperliches Training zu einer adaptiven Hypertrophie führt. Diese Theorie konnte durch Versuche von Perrino et al. (2006) widerlegt werden. Hierbei wurden Mäuse intermittierend einer physiologischen Belastung (Laufrad) bzw. intermittierend einer pathologischen Belastung (Aortenstenose für 2×90 min pro Tag) exponiert. Beide Arten der Belastung induzierten eine vergleichbare Hypertrophie des linken Ventrikels. Jedoch hatte die pathologische Belastung im Unterschied zur physiologischen Belastung eine vermehrte interstitielle Fibrose, verringerte Kapillardichte und Abnahme der Kontraktilität des linken Ventrikels zur Folge, sie führte also zu einer maladaptiven Hypertrophie. Daher kommt es nicht auf die Dauer (intermittierend oder chronisch), sondern auf die Art der Belastung (physiologisch oder pathologisch) an. Deshalb bestimmt nicht die Hypertrophie selbst, sondern die Aktivierung bestimmter Signalwege die Entwicklung eines adaptiven oder maladaptiven Prozesses (Kempf et al., 2007). Diese Signaltransduktionskaskaden regulieren auf Zellebene die Entstehung der Hypertrophie. Es handelt sich dabei um hintereinander geschaltete Kinasen bzw. Phosphatasen, die letztlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern und die An- oder Abschaltung bestimmter Gene zur Folge haben. Dabei lassen sich Signalwege unterscheiden, die ein adaptives oder maladaptives

Genexpressionsmuster im Kardiomyozyten aktivieren. Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss verschiedener Signalwege auf die pro-hypertrophen Eigenschaften von GDF 15 untersucht.

5.3.1 GDF 15 und die Proteinkinase C

Eigene Versuche mit dem Inhibitor Goe6850 zeigten eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) am Hypertrophieprozess von GDF 15. Die Familie der PKC umfasst mehr als 10 Isoformen, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Die PKC wird ubiquitär exprimiert und kann sowohl über Tyrosinkinaserzeptoren als auch über G-Proteingekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Nishizuka, 1992). Gemeinsamer Ausgangspunkt der Signaltransduktion ist die Aktivierung einer Phospholipase C. Durch Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositols (PIP₂) entstehen als Reaktionsprodukte das Diacylglycerol (DAG) und das Inositoltriphosphat (InsP₃). Während das DAG in der Plasmamembran verbleibt, ist der lösliche second messenger InsP₃ für eine transiente Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich. Für die klassischen PKC-Isoformen ist Calcium ein wichtiger Cofaktor, welcher die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran unterstützt und somit die Aktivierung des Enzyms fördert.

Im Herzgewebe war die PKC-Aktivität nach akuter oder chronischer Druckbelastung gesteigert, was zur Induktion von Hypertrophie führte (Gu et Bishop, 1994). Die transgene Überexpression von PKC- β führte in Mäuseherzen zu Hypertrophie und einem plötzlichem Herztod (Bowman et al., 1997). Jedoch zeigte sich bei PKC- β defizitären Tieren nach Phenylephrin-Stimulation oder bei hohem Blutdruck weiterhin eine Hypertrophie (Roman et al., 2001). Nur für die PKC- α konnte bisher eine zweifelsfreie Rolle in der Hypertrophieentwicklung dargestellt werden (Braz et al., 2002). Über welche PKC-Isoform GDF 15 die hypertrophen Prozesse im Herzen aktiviert, wurde nicht weiter untersucht. Die Heterogenität der PKC-Isoformen bei Expression, Regulation und Aktivierung im Herzen macht es zudem schwierig, die Rolle der PKC in adaptiven oder maladaptiven Prozessen im Herzen exakt zu definieren.

5.3.2 GDF 15 und die PI3-Kinase

In unseren Untersuchungen reduzierten die Inhibitoren der PI3-Kinase LY294002 und Wortmannin die pro-hypertrophen Wirkungen von GDF 15. Damit ist eine Beteiligung der PI3-Kinase an den hypertrophen Prozessen von GDF 15 sehr wahrscheinlich. Auch bei Versuchen von Kempf et al. (2006) zeigte sich eine Beteiligung der PI3-Kinase in der Signaltransduktion von GDF 15. Dabei reduzierten sowohl die PI3-Kinase-Inhibitoren LY und Wortmannin als auch die adenovirale Expression einer dominant-negativen Akt1 die kardioprotektiven Eigenschaften von GDF 15. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der Serin/Threoninkinase Akt durch GDF 15 nachgewiesen (Kempf et al., 2006).

Die Mitglieder der PI3-Kinase Familie werden durch verschiedene Tyrosinkinasen, beispielsweise dem IGF-1 Rezeptor, aber auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie die α - oder β -adrenergen Rezeptoren aktiviert (Xiao, 2001). Eines der wichtigsten Zielproteine der PI3-Kinase ist die Serin/Threoninkinase Akt, auch Proteinkinase B genannt, die durch Bindung von PI3-Kinase-phosphorylierten Lipiden aktiviert wird. Im Herzen führte durch Druckbelastung induzierte Hypertrophie zur Aktivierung der PI3-Kinase (Naga Prasad et al., 2000). Die herzspezifische Überexpression von konstitutiv-aktiver bzw. dominant-negativer PI3-Kinase hatte vergrößerte bzw. verkleinerte Kardiomyozyten zur Folge (Shioi et al., 2002). Gleichermäßen induzierte die herzspezifische Überexpression von konstitutiv-aktiver Akt Hypertrophie (Matsui et al., 2002). Zusammenfassend spielt die PI3-Kinase eine wichtige Rolle in der kardialen Hypertrophieentwicklung, die sowohl adaptiv als auch maladaptiv sein kann. Dafür scheint die Dauer der Aktivierung entscheidend zu sein. Eine akute Stimulation führt zu adaptiver Hypertrophie, wohingegen eine chronische Aktivierung eine maladaptive Hypertrophie zur Folge hat (Kempf et al., 2007b). Welchen Mechanismus GDF 15 dabei aktiviert, lässt sich mit den bisherigen Ergebnissen nicht sicher bestimmen. Da für GDF 15 aber durch andere Arbeitsgruppen bisher vor allem kardioprotektive Wirkungen beschrieben wurden, könnte GDF 15 daher vor allem eine adaptive Hypertrophie bewirken.

5.3.3 GDF 15 und die ERK

Simultane Stimulation von isolierten Herzzellen der Ratte mit dem hochspezifischen Inhibitor PD98059 der MAP-Kinase Kinase und GDF 15 hatte in eigenen Versuchen eine Reduktion der pro-hypertrophen Wirkung von GDF 15 zur Folge. Darüber hinaus ließ sich durch eine Analyse der ERK-Kinetik mittels Western Blot ein kontinuierlicher Anstieg der ERK-Aktivierung nach GDF 15 Stimulation nachweisen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der ERK an der Signaltransduktion von GDF 15 hin. Auch Xu et al. (2006) und Kempf et al. (2006) zeigten für GDF 15 eine Aktivierung des ERK-Akt-Signalwegs im Herzen.

Die ERK ist neben der JNK und der p38 MAPK ein Mitglied der Familie der MAP-Kinasen. Während die ERK vor allem durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, führen verschiedene Stresstimuli wie inflammatorische Zytokine oder UV-Licht zur Aktivierung der JNK und p38. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt durch eine streng hierarchisch angeordnete dreiteilige Signalkaskade. Diese setzt sich aus der MAPK, dem MAPK Aktivator (MEK oder MAPKK) und dem MEK-Aktivator (MEKK oder MAPKKK) zusammen. *In vivo* führte die transgene Überexpression von MAPKK-1, einer MAP-Kinase, die ERK1/2, nicht aber p38 oder JNK aktiviert, zur Hypertrophiebildung (Bueno et al., 2000). Diese ging mit stark erhöhter systolischer Funktion und Aktivierung des fetalen Genprogramms einher. Des Weiteren zeigten Schlüter et al. (1999), dass auch die Angiotensin II induzierte Hypertrophie ERK-abhängig erfolgte. Dabei wurde die ERK lang andauernd aktiviert. Eine α -adrenerge Stimulation mit Phenylephrin führte dagegen nur zu einer kurzen ERK-Aktivierung von wenigen Minuten, welche jedoch keinen Einfluss auf die Proteinsynthese hatte. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die ERK lang anhaltend durch GDF 15 aktiviert. Somit scheint die ERK-Aktivierung unter GDF 15 der von Ang II zu ähneln. Beim MAP-Kinase-Signalweg können sowohl eine adaptive als auch eine maladaptive Hypertrophie unterschieden werden. Dabei scheint die Aktivierung unterschiedlicher nachgeordneter Kinasen über die Ausbildung einer eher adaptiven (ERK) oder maladaptiven Hypertrophie (p38, JNK) von entscheidender Bedeutung zu sein.

5.3.4 GDF 15 und die SMAD-Proteine

Da SMAD-Proteine entscheidende Komponenten des TGF- β -Signal-Systems bei der Vermittlung pathophysiologischer Effekte in der Herzmuskelzelle sind, wurde in dieser Arbeit ihr Mitwirken in der Hypertrophieentwicklung von GDF 15 untersucht. Die Stimulation von kultivierten Herzmuskelzellen mit GDF 15 steigerte dabei die SMAD-Bindungsaktivität im Retardation Assay. Darüber hinaus senkte die Transformation von kultivierten Herzmuskelzellen mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden, welche die SMAD-Aktivität intrazellulär inhibieren, die durch GDF 15 gesteigerte Proteinsyntheserate signifikant. Somit wurden in dieser Arbeit erstmalig pro-hypertrophe Eigenschaften für SMAD-Proteine im Herzen beschrieben.

SMAD-Proteine wurden unter pathophysiologischen Bedingungen im Herzen vermehrt gefunden (Euler-Taimor et Heger, 2006). Dabei sollen SMAD-Proteine vor allem bei der Fibrosebildung und bei Apoptosevorgängen beteiligt sein (Araujo-Jorge et al., 2002; Hao et al., 2000; Schneiders et al., 2005). Bisher wurden den SMAD-Proteinen anti-hypertrophe Wirkungen zugeschrieben (Wang et al., 2005; Xu et al., 2006). In diesen Studien reduzierte zu einem SMAD2 in neonatalen Kardiomyozyten hypertrophes Wachstum (Xu et al., 2006), zum anderen waren SMAD4 Knockout-Mäuse durch kardiale Hypertrophie gekennzeichnet (Wang et al., 2005). Diese den in der vorliegenden Arbeit gegenteiligen Befunde lassen sich durch die Expression verschiedener SMAD-Isoformen erklären. In unseren Untersuchungen war eine gestiegene SMAD1,5 Expression durch GDF 15 nachweisbar, wogegen eine wie von Xu et al. (2006) beschriebene SMAD2 Aktivierung durch GDF 15 nicht belegbar war. Somit könnten die SMAD1,5 Proteine im Gegensatz zu SMAD2,4 pro-hypertrophe Eigenschaften haben. Da es sich bei SMAD4 um ein notwendiges Co-SMAD für SMAD1,5 handelt, könnte der Verlust dieses Co-Faktors in den SMAD4 Knockout-Mäusen zu einer Inhibition der pro-hypertrophen Wirkungen von SMAD1,5 führen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die komplexen Signaltransduktionswege der SMAD-Proteine, welcher noch weiterer Untersuchungen bedürfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen GDF 15 erstmalig als einen pro-hypertrophen Faktor in adulten Herzmuskelzellen der Ratte dar. Dabei scheinen die PKC, die PI3K, die ERK und SMAD-Proteine an der Signaltransduktion beteiligt zu sein. Versuche

mit Inhibitoren der PI3-Kinase (LY294002), der PKC (BIM) und der ERK (PD98059) verhinderten die Aktivierung der SMAD-Bindungsaktivität unter GDF15. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SMAD-Kinasen der PKC, der PI3K und der ERK in der Signaltransduktion nachgeschaltet sind. Nach dem zeitlichen Ablauf bei anderen hypertrophen Stimuli, scheint die GDF 15 induzierte Hypertrophie über die PKC > PI3-Kinase > ERK > SMAD zu laufen. Jedoch können parallele Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

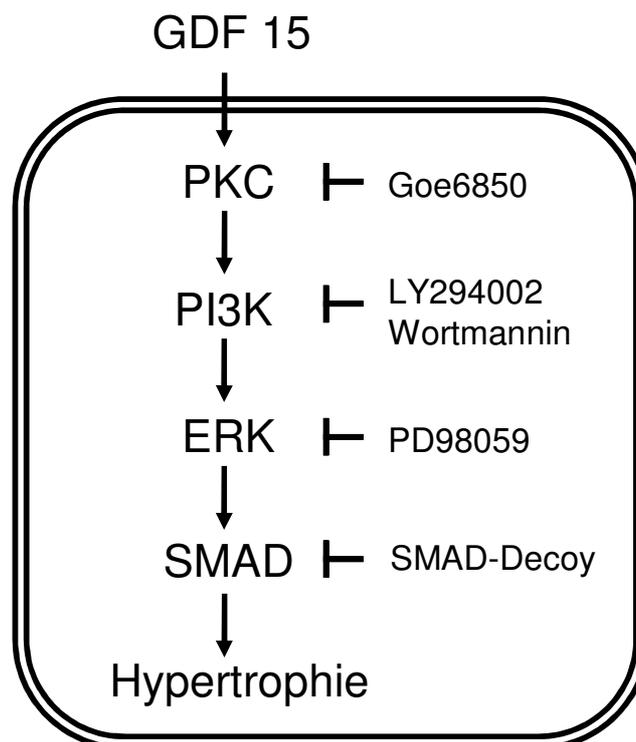


Abb. 5.1: Die Signaltransduktion von GDF 15 bei der Hypertrophie

5.4 Ausblick

Insgesamt stehen wir erst am Anfang, wenn es darum geht, die vielfältigen Wirkungen von GDF 15 im kardiovaskulären System zu verstehen. GDF 15 ist im kurzfristigen und langfristigen Heilungsprozess des Herzens nach Ischämie beteiligt und scheint dabei kardioprotektiv zu wirken. Jedoch hat sich gezeigt, dass hohe GDF 15 Konzentrationen mit einer schlechten klinischen Prognose verbunden sind (Kempf et al., 2007a). Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass GDF 15 doch für maladaptive Prozesse im Herzen verantwortlich ist. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass GDF 15 adaptive Prozesse einleitet, diese jedoch durch die zugrunde liegende Krankheit übertroffen werden. Darüber hinaus könnte sich eine Art GDF 15 Resistenz bei Patienten mit fortgeschrittenen kardialen Erkrankungen ausbilden.

Einen wichtigen Erkenntnisfortschritt könnte hierbei die Bestimmung des GDF 15 Rezeptors liefern. Zudem könnte die Erforschung der Zelltyp spezifischen Wirkungen Antworten auf den GDF 15 Charakter geben. Beispielweise besitzen die kardialen Fibroblasten eine entscheidende Rolle in der Physiologie und Pathogenese des Herzens. Sie sind unter anderem an der kardialen Fibrose und Wundheilung beteiligt (Brown et al., 2005). Auch GDF 15 könnte hier wie andere TGF- β Familienmitglieder in der Fibrogenese mitwirken. Ferner sind Entzündungszellen durch Regulation des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der Lage, den Krankheitsverlauf einer Herzinsuffizienz zu verhindern oder zu beschleunigen (Gullestad et al., 2005). Für GDF 15 wurde gezeigt, dass es die Makrophagen Aktivität inhibiert und die TNF α Produktion reduziert (Bootcov et al., 1997; Schlittenhardt et al., 2004). Diese inhibitorische Wirkung auf das inflammatorische Wirken der Makrophagen, die durch Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine und Radikale erheblich zur Expansion des Gewebeschadens beitragen, könnte somit eine weitere kardioprotektive Funktion von GDF 15 im Myokard bedeuten. Erhöhte TNF α Konzentrationen wurden im Serum und Myokard bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz gefunden (Gullestad et al., 2005). Diese gesteigerte Immunantwort scheint dabei für maladaptives Remodeling mitverantwortlich zu sein (Aukrust et al., 2005). Somit könnte GDF 15 die Immunantwort sowohl im Myokard als auch im systemischen Kreislauf regulieren und reduzieren. Des Weiteren wird

GDF 15 in vielen Organen wie der Lunge und der Niere bei zellulärem Stress und Schaden vermehrt exprimiert (Zimmers et al., 2005). Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes Krankheitsbild, dessen Auswirkungen eine Vielzahl von Organen betreffen. Daher scheint es möglich, dass GDF 15 durch regulatorische Funktion auf andere Organe die kardiale Leistungsfähigkeit und die Prognose von Patienten mit Herzinsuffizienz verbessert. Somit würde auch eine weitere Erforschung der GDF 15 Wirkungen auf andere Zellen und Organe zu einem besseren Verständnis der Pathologie der Herzinsuffizienz beitragen.

In klinischen Studien wurde GDF 15 als potenter prognostischer Biomarker bei Patienten mit ACS und chronischer Herzinsuffizienz beschrieben (Kempf et al., 2007a). Allerdings ist GDF 15, anders als klinisch etablierte Faktoren wie Troponin und BNP kein kardiospezifischer Marker. Neben Kardiomyozyten exprimieren auch andere Zellen GDF 15 als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren. Somit handelt es sich bei GDF 15 nicht um einen neuen Biomarker für die Diagnostik beim ACS oder bei Herzinsuffizienz, vielmehr liegt die Stärke von GDF 15 wohl im Rahmen einer Multimarkerstrategie. Die Kombination von GDF 15 mit kardiospezifischen, klinisch etablierten Markern könnte in Zukunft ein wertvolles Instrument bei der Risikostratifizierung in der Klinik werden. So könnten eventuell Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und einem hohen GDF 15 Spiegel von einer aggressiveren Therapie profitieren. Um eine für den Patienten sichere und zuverlässige Anwendung von GDF 15 im klinischen Alltag zu gewährleisten, bedarf es aber noch weiterer Studien.

6 Zusammenfassung

GDF 15 ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie, das nach ischämischen Bedingungen im Myokard hochreguliert und als potenter prognostischer Marker bei kardialen Erkrankungen beschrieben wird. Im Gegensatz zu anderen TGF- β Familienmitgliedern konnten für GDF 15 in dieser Arbeit anti-apoptische Eigenschaften in adulten Kardiomyozyten der Ratte beschrieben werden. GDF 15 verringerte hierbei die apoptotischen Effekte von TGF- β , SNAP und Angiotensin II.

Weiterhin zeigten sich erstmalig pro-hypertrophe Eigenschaften für GDF 15. Inkubation adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte mit GDF 15 über 24 h vergrößerte die Proteinsyntheserate und die Querschnittsfläche signifikant. Die Stärke der Hypertrophie entsprach dabei der unter alpha-adrenerger Stimulation mit Phenylephrin. Stimulation der adulten Kardiomyozyten mit dem Inhibitor der Proteinkinase C, Goe6850, verringerte den pro-hypertrophen Effekt von GDF 15. Auch Inhibitoren des PI3-Kinase Weges, LY294002 oder Wortmannin, verhinderten die Steigerung der Proteinsyntheserate unter GDF 15. Dies steht im Einklang mit dem durch Phenylephrin stimulierten, alpha-adrenergen hypertrophen Signalweg. Im Gegensatz zu Phenylephrin konnte die GDF 15 stimulierte Hypertrophie auch mit dem MAPK-Inhibitor PD9805 blockiert werden. Dazu ergab die Bestimmung der ERK-Kinetik mittels Western Blot einen kontinuierlichen Anstieg der ERK-Aktivierung durch GDF 15.

Da der Transkriptionsfaktor SMAD ein klassisches Signalmolekül der TGF- β Familie ist, wurde seine Rolle in der Signaltransduktion von GDF 15 untersucht. Stimulation mit GDF 15 erhöhte die SMAD-Bindungsaktivität im Retardation Assay deutlich, während sich unter Phenylephrin keine Steigerung der Bindungsaktivität zeigte. Die Aktivierung der SMAD-Bindungsaktivität unter GDF 15 blieb aus, wenn die Zellen mit einem Inhibitor der PI3-Kinase, der ERK oder der PKC behandelt wurden. Zudem wurde zum ersten Mal eine Beteiligung von SMAD1,5 in der Signaltransduktion von GDF 15 in Western Blots aufgezeigt. Durch Transformation der Herzmuskelzellen mit SMAD-decoy-Oligonukleotiden, die die SMAD-Aktivität intrazellulär abfangen, wurde

die durch GDF 15 gesteigerte Proteinsyntheserate entscheidend gesenkt. Somit wurden erstmalig pro-hypertrophe Eigenschaften für SMAD-Proteine nachgewiesen.

Diese Ergebnisse stellen den Wachstumsfaktor GDF15 als anti-apoptischen und pro-hypertrophen Faktor in isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen der adulten Ratte dar. Der Signalweg der Hypertrophieinduktion verläuft dabei über klassische Signalwege wie die PI3-Kinase und die PKC, wird aber zusätzlich durch die MAP-Kinase ERK und den Transkriptionsfaktor SMAD vermittelt. Letzterer scheint den klassischen Signalmolekülen nachgeschaltet zu sein. Somit handelt es sich bei GDF 15 um einen bedeutsamen Faktor in der Pathologie der Herzinsuffizienz, der in Zukunft als Angriffspunkt für die Diagnose und Therapie kardiovaskulärer Krankheiten dienen könnte.

7 Summary

Growth differentiation factor 15 (GDF 15) is a member of the TGF- β superfamily that is up-regulated in the heart after ischemic conditions and which is described as a potent prognostic biomarker in patients with cardiac disease. In contrast to other TGF- β family members anti-apoptotic effects were found for GDF 15 in cardiomyocytes of adult rats: GDF 15 reduced the apoptotic effects of TGF- β , SNAP and Angiotensin II.

Furthermore, it could be shown for the first time that GDF 15 acts as an inducer of hypertrophic growth in cardiomyocytes of adult rats. Incubation of these cells with GDF 15 over 24 h enhanced the rate of protein synthesis and the cross sectional area significantly. The extent of hypertrophy was similar to the one under stimulation by alpha-adrenoceptor agonist phenylephrine. The hypertrophic growth response to GDF15 was abolished by the inhibitor of PKC, Goe6850. Inhibitors of the PI3-kinase, LY294002 or Wortmannin, blocked the increase of the protein synthesis rate as well. This correlates with the enhancement of cardiomyocyte growth under classical α -adrenergic stimulation by PE. In contrast to PE, GDF 15 stimulated hypertrophy could be blocked with MAPK-inhibitor PD9805. Activation of ERK was determined in western blots and revealed a sustained induction under GDF15 over at least 4 hours.

Since transcription factors of the SMAD family are the classical signal molecules of the TGF- β super family, we analyzed the role of SMADs in the development of hypertrophy. GDF 15 enhanced SMAD binding activity in cardiomyocytes, whereas under phenylephrine SMAD binding activity did not increase. Enhanced activation of SMAD1 and 5 but not SMAD2 was found under GDF15. Since SMAD signaling under GDF15 was prevented by inhibition of PKC, PI3K and ERK, all these signals are upstream of SMAD activation. Transformation of cardiomyocytes with SMAD decoy oligonucleotides, which intracellularly scavenge SMAD proteins, decreased GDF15 induced protein synthesis. Thus, this is the first report describing pro-hypertrophic effects of SMADs.

In conclusion, GDF 15 has anti-apoptotic and pro-hypertrophic effects in ventricular cardiomyocytes of rats. Like the classical alpha-adrenergic signalling this pathway of hypertrophy induction is mediated via PI3-kinase and PKC. In contrast to the alpha-adrenergic pathway, MAP-kinase ERK and the transcription factor SMAD take part in the hypertrophy induction stimulated by GDF 15, whereas the latter seems to lie downstream of the classical signal molecules. Therefore, GDF 15 is an important factor in the development of chronic heart failure that might be useful in the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases in the future.

8 Literaturverzeichnis

- Abdellatif MM, Neubauer CF, Lederer WJ, Rogers TB (1991). Angiotensin-induced desensitization of the phosphoinositide pathway in cardiac cells occurs at the level of the receptor. *Circ Res.* 69: 800–809.
- Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Mde L, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ (2002). Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardioathy. *J Infect Dis.* 186: 1823-8.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 136: 593-608.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281: 1305-1308.
- Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damas JK, Yndestad A (2005). Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med.* 37: 74-85.
- Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE (2001). Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol.* 59: 901-908.
- Bauer G (2000). Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Research.* 20: 4115-4139.
- Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, Rasiah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst GJ, Johnen H, Russell PJ, Barret W, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN (2005). The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res.* 65: 2330-2336.
- Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, Breit SN (2006). Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res.* 66: 4983-4986.
- Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289: 8-16.
- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH (1993). Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 317: 271-275.
- Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition

- from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ. Res.* 75: 23-32.
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 11514–11519.
- Border WA, Noble NA (1998). Interactions of transforming growth factor- β and angiotensinII in renal fibrosis. *Hypertension.* 31: 181-188.
- Böttner M, Laaff M, Schechinger B, Rappold G, Unsicker K, Suter-Crazzolara C (1999). Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene.* 237: 105-11.
- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000). The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 75: 2227-2240.
- Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM (1997). Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest.* 100: 2189-95.
- Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD (2002). PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol.* 156: 905-19.
- Brown DA, Breit SN, Buring J, Fairlie WD, Bauskin AR, Liu T, Ridker PM (2002). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet.* 359: 2159-2163.
- Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, Bauskin AR, Kinzler KW, Vogelstein B, Breit SN (2003). MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 2642-50.
- Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 657-87.
- Brown DA, Stephan C, Ward RL, Law M, Hunter M, Bauskin AR, Amin J, Jung K, Diamandis EP, Hampton GM, Russell PJ, Giles GG, Breit SN (2006). Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clin Cancer Res.* 12: 89-96.

- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkenstein JD (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19: 6341-50.
- Buitrago M, Lorenz K, Maass AH, Oberdorf-Maass S, Keller U, Schmitteckert EM, Ivashchenko Y, Lohse MJ, Engelhardt S (2005). The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 11: 837-844.
- Bujak M et Frangogiannis NG (2007). The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 74: 184-95.
- Cai Z, Semenza GL (2004). Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 109: 2050-2053.
- Clark WA, Rudnick SJ, Simpson DG, LaPres JJ, Decker RS (1993). Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthesis capacity of intact adult hearts. *Am J Physiol.* 264: 573-582.
- Cohen JJ (1993). Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed).* 28: 35-43.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91: 231-41.
- Deng XF, Rokosh DG, Simpson PC (2000). Autonomous and Growth Factor-Induced Hypertrophy in Cultured Neonatal Mouse Cardiac Myocytes: Comparison With Rat. *Circ Res.* 87: 781-788.
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol.* 71: 731-40.
- Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG (2001). Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 33: 1191-207.
- Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Bader M, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R; German Heart Failure Network (2006). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation.* 113: 1203-1212.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 275: 661-665.

- Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartowaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, Sariola H, Pachnis V (1996). GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*. 381: 789-793.
- Elliott RL et Blobe GC (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*. 23: 2078-93.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata A (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391: 43-50.
- Euler-Taimor G et Heger J (2006). The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 69: 15-25.
- Fearnhead HO, Rodriguez J, Govek EE, Guo W, Kobayashi R, Hannon G, Lazebnik YA (1998). Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 13664-13669.
- Flemming W (1885). Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Archiv der Anatomischen Entwicklungsgeschichte*. 221-244.
- Fliss H et Gattinger D (1996). Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*. 79: 949-956.
- Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Lüdde M, Katus H, Frey, N (2008). Gene Expression Pattern in Biomechanically Stretched Cardiomyocytes Evidence for a Stretch-Specific Gene Program. *Hypertension*. 51: 309-318.
- Frey N et Olson EN (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 65: 45-79.
- Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*. 101: 660-667.
- Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL (2002). Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*. 105: 1497-1502.
- Graichen R, Liu D, Sun Y, Lee KO, Lobie PE (2002). Autocrine human growth hormone inhibits placental transforming growth factor-beta gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*. 277: 26662-26672.
- Gu X et Bishop SP (1994). Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res*. 75: 926-931.

- Gullestad L et Aukrust P (2005). Review of trials in chronic heart failure showing broadspectrum anti-inflammatory approaches. *Am J Cardiol.* 95: 17-23.
- Haldeman GA, Croft JB, Giles WH, Rashidee A (1999). Hospitalization of patients with heart failure: national hospital discharge survey, 1985 to 1995. *Am Heart J.* 137: 352-60.
- Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, Scammell-La Fleur T, Dixon IM (1999). Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol.* 31: 667-78.
- Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM (2000). Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279: 3020-3030.
- Hausenloy DJ et Yellon DM (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 61: 448-460.
- Heineke J et Molkenin JD (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 589-600.
- Herpin A, Lelong C, Favrel P (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol.* 28: 461-85.
- Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ (2000). Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol.* 20: 3742-3751.
- Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Oshima Y, Nakaoka Y, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K, Hirota H (2001). Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem.* 276: 31133-31141.
- Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 74: 86-107.
- Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P (1997). Angiotensin II Induces Apoptosis of Adult Ventricular Myocytes In Vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 29: 859-870.
- Kasten FH (1972). Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties. *In vitro.* 8: 128-150.

- Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke J, Kotlarz D, Xu J, Molkentin JD, Niessen HW, Drexler H, Wollert KC (2006). Transforming growth factor- β superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/ reperfusion injury. *Circ Res.* 98: 351-360.
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, Ponikowski P, Filippatos GS, Rozentryt P, Drexler H, Anker SD, Wollert KC (2007a). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 50: 1054-1060.
- Kempf T, Drexler H, Wollert KC (2007b). Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. *Internist.* 48: 899-908.
- Kerr J, Wyllie A, Currie A (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wild-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 18: 44-51.
- Kyhse-Anderson J (1984). Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 10: 203-209.
- Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee YA, Lindpaintner K (1993). Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy. *Eur Heart J.* 14: 42-48.
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990). Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322: 1561-1566.
- Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ (2000). Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem.* 275: 20127-20135.
- Li H, Dakour J, Guilbert LJ, Winkler-Lowen B, Lyall F, Morrish DW (2005). PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed in preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 3045-53.
- Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankhurst S, Russell PJ, Breit SN, Pankhurst S (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63: 5034-40.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL (2000). Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics*. 2: 93-100.
- Masaki M, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Kuroda T, Kimura R, Sugiyama S, Terai K, Kitakaze M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirota H (2005). SMAD1 protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 111: 2752-2759.
- Massague J (1990). The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Biochem*. 6: 597-641.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67: 753-791.
- Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S (2001). Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin- converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation*. 104: 1615-1621.
- Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem*. 277: 22896-22901.
- McDermott PJ et Morgan HE (1989). Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res*. 64: 542-553.
- Molkentin JD (2003). A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest*. 111: 1275-1277.
- Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier ML, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN (2000). The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 85: 4781-4788.
- Morgan HE, Baker KM (1991). Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation*. 83: 13-25.
- Morgan H, Jefferson L, Wolpert E, Rannels D (1971). Regulation of Proteinsynthesis in heart muscle. *J Biol Chem*. 246: 2163-2170.
- Murphy E (2004). Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res*. 94: 7-16.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74: 1124-1136.

- Naga Prasad SV, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA (2000). Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem.* 275: 4693-4698.
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J.* 16: 5353-5362.
- Narula J, Haider N, Virmani R (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 335: 1182-1189.
- Nishizuka Y (1986). Studies and perspectives of proteinkinase C. *Science.* 233: 305-312.
- Nishizuka Y (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258: 607-614.
- Nissen F (1886). Über das Verhalten der Kerne in den Milchdrüsenzellen bei der Absonderung. *Archiv der Mikroskopischen Anatomie.* 26: 337-342
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM (2006). Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 355: 251-259.
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ (2003). A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest.* 112: 999-1007.
- Perrino C, Naga Prasad SV, Mao L, Noma T, Yan Z, Kim HS, Smithies O, Rockman HA (2006). Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest* 116: 1547-1560.
- Pinson A, Schlüter KD, Zhou XJ, Schwartz P, Kessler-Icekson G, Piper HM (1993). Alpha- und beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 25: 477-490.
- Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982). Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 14: 397-412.
- Pönicke K, Schlüter KD, Heinroth-Hoffmann I, Seyfarth T, Goldber M, Osten B, Piper HM, Brodde OE (2001). Noradrenalin induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: Involvement of only alpha 1 Adrenoreceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 364: 444-453.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 342: 836-43.

- Roman BB, Geenen DL, Leitges M, Buttrick PM (2001). PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: 2264-2270.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circ.* 95: 320-323.
- Sasaki H, Galang N, Maulik N (1999). Redox regulation of NF-kappaB and AP-1 in ischemic reperfused heart. *Antioxid Redox Signal.* 1: 317-324.
- Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, Metz J, Kinscherf R (2004). Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell Tissue Res.* 318: 325-333.
- Schlüter KD, Zhou XJ, Piper HM (1995). Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 269: 1311-1316.
- Schlüter KD (1998). Untersuchungen zur Regulation der Proteinsynthese adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch hormonelle und neurohumorale Faktoren. *Aachen: Shaker, ISBN 3-8265-3535-9.*
- Schlüter KD, Simm A, Schäfer M, Taimor G, Piper HM (1999). Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy. *Am J Physiol.* 276: 1655-1663.
- Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G (2005). SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 67: 87-96.
- Schober A, Bottner M, Strelau J, Kinscherf R, Bonaterra GA, Barth M, Schilling L, Fairlie WD, Breit SN, Unsicker K (2001). Expression of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain. *J Comp Neurol.* 439: 32-45.
- Schröder D, Heger J, Piper HM, Euler G (2006). Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. *J Mol Med.* 84: 975-983.
- Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T (2002). TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest.* 109: 787-796.
- Schwarzfeld TA, Jacobson SL (1981). Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J Mol Cell Cardiol.* 13: 563-575.
- Shi Y et Massague J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113: 685-700.

- Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 22: 2799-809.
- Simm A, Schlüter KD, Diez C, Piper HM, Hoppe J (1998). Activation of p70s6 kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 30: 2059-2076.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 4044-4049.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 1067-1074.
- Sugden PH (2001). Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Ann Med.* 33: 611-622.
- Sun Y, Zhou J, Liao X, Lu Y, Deng C, Huang P, Chen Q, Yang X (2005). Disruption of SMAD5 gene induces mitochondria-dependent apoptosis in cardiomyocytes. *Exp Cell Res.* 306: 85-93.
- Swynghedauw B (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 79: 215-262.
- Taimor G, Lorenz H, Hofstaetter B, Schlüter KD, Piper HM (1999). Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rats. *Cardiovasc Res.* 41: 147-156.
- Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM (2000). Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia. *Cardiovasc Res.* 45: 588-594.
- Takahashi T, Schunkert H, Isoyama S, Wie JY, Nadall-Ginard B, Grossman W, Izumo S (1992). Age-related differences in the expression of proto-oncogenes and contractile protein genes in response to pressure overload in rat myocardium. *J Clin Invest.* 89: 939-946.
- Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 109-114.
- Tanaka M, Hioshi I, Susumu A, Hajime A, Toshio N, Takeshi K, Fumiaki M, Michiaki H (1994). Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger mRNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 75: 426-433.

- Tong S, Marjono B, Brown DA, Mulvey S, Breit SN, Manuelpillai U, Wallace EM (2004). Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet*. 363: 129-130.
- Unsicker K (2001). Molekulare Liberos. *Forschungsmagazin Ruperto Carola*. 3/2001
- Vakili BA, Okin PM, Devereux RB (2001). Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 141: 334-341.
- Vaux DL et Korsmeyer SJ (1999). Cell death in development. *Cell*. 96: 245-254.
- Villarreal FJ et Dillmann WH (1992). Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol*. 262: 1861-1866.
- Wang J, Xu N, Feng X, Hou N, Zhang J, Cheng X, Chen Y, Zhang Y, Yang X (2005). Targeted disruption of SMAD4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 97: 821-828.
- Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, Ward RL, Hawkins NJ, Quinn DI, Russell PJ, Sutherland RL, Breit SN, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM (2003). Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 3410-3415.
- Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 111: 1497-1504.
- Wollert KC (2007a). Growth-differentiation factor-15 in cardiovascular disease. From bench to bedside, and back. *Basic Res Cardiol*. 102: 412-415.
- Wollert KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, Johnston N, Lindahl B, Horn-Wichmann R, Brabant G, Simoons ML, Armstrong PW, Califf RM, Drexler H, Wallentin L (2007b). Prognostic Value of Growth-Differentiation Factor-15 in Patients With Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome. *Circulation*. 115: 962-971.
- Wyllie AH (1980). Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555-556.
- Wyllie A (1997). Apoptosis and cancerogenesis. *Eur J Cell Biol*. 73: 189-197.
- Xiao RP (2001). Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE*. 104: 15.
- Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkenstein JD (2006). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res*. 98: 342-350.

- Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, Lodish HF (2000). Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 275: 36295-36302.
- Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM (2000). Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med.* 6: 1355-1361.
- Yndestad A, Ueland T, Øie E, Florholmen G, Halvorsen B, Attramadal H, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L, Christensen G, Damås JK, Aukrust P (2004). Elevated levels of activin A in heart failure: potential role in myocardial remodeling. *Circulation.* 109: 1379-1385.
- Yue TL, Ma XL, Wang X, Romanic AM, Liu GL, Loudon C, Gu JL, Kumar S, Poste G, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ (1998). Possible involvement of stressactivated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res.* 82: 166-174.
- Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, Virion JM (1999). Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL study. Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. *J Am Coll Cardiol.* 33: 734-42.
- Zhivotovsky B, Wade D, Nicotera P, Orrenius S (1994). Role of nucleases in apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 105: 333-338.
- Zhou XJ, Schlüter KD, Piper HM (1996). Hypertrophic responsiveness to beta2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 163/164: 211-216.
- Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG (2005). Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock.* 23: 543-548.

9 Eigene Veröffentlichungen

Publikationen

Heger J, **Schiegnitz E**, von Waldthausen D, Anwar MM, Piper HM, Euler G (2010).
Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes.

J Cell Physiol. 224: 120-126.

Kongressbeiträge

Euler G, **Schiegnitz E**, Heger J, Piper HM (2007).

GDF 15 als pro-hypertropher Faktor in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Clin Res Cardiol. 96: Suppl 1.

Euler G, **Schiegnitz E**, Heger J, Gandesiri M, Asif AR, Piper HM (2007).

Matrixmetalloproteinasen wirken als Hypertrophierepressor in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Clin Res Cardiol. 96: Suppl 1.

Heger J, **Schiegnitz E**, Piper HM, Euler G (2007).

GDF15 a pro-hypertrophic factor in adult ventricular cardiomyocytes of rat.

The 86th Annual Meeting of The German Physiological Society, Hannover.

Acta Physiologica. 189: Suppl 653.

Euler G, **Schiegnitz E**, Heger J, Piper HM (2008).

Signalwege der durch GDF 15 stimulierten Hypertrophie in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Clin Res Cardiol. 97: Suppl 1.

Osygus Y, Heger J, **Schiegnitz E**, Piper HM, Euler G (2009).

Matrix metalloproteinases as repressors of hypertrophy in ventricular cardiomyocytes of rats.

The 88th Annual Meeting of The German Physiological Society, Gießen.

Acta Physiologica. 195: Suppl 669.

Heger J, **Schiegnitz E**, Euler G (2009).

Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes.

Scientific Sessions 2009 American Heart Association, Orlando.

Circulation. 120: 760

Euler G, Osygus Y, **Schiegnitz E**, Heger J (2010).

Charakterisierung von Matrixmetalloproteinasen als Hypertrophiepressoren in ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte.

76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Clin Res Cardiol. 99: Suppl 1: P1052

Osygus Y, Heger J, **Schiegnitz E**, Euler G (2010).

Matrix metalloproteinases as repressors of hypertrophy in ventricular cardiomyocytes of rats.

Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Kopenhagen.

Acta Physiologica. 198: Suppl 677.

10 Erklärung

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

Gießen, 01.05.2010

Eik Schiegnitz

11 Danksagung

Frau Prof. Dr. Gerhild Euler möchte ich ganz besonders für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die sehr interessante Themenstellung, die herausragende wissenschaftliche Betreuung und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Arbeit danken.

Mein Dank gilt dem Direktor des Physiologischen Instituts, Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter, und seinem Vorgänger, Prof. Dr. Dr. H. M. Piper für die exzellenten Rahmenbedingungen und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten, die ich zur Bearbeitung der Aufgabenstellung vorfand.

Ein herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter und Kollegen des Physiologischen Instituts für das fröhliche und angenehme Arbeitsklima sowie ihre geistige und praktische Unterstützung. Frau Daniela Schreiber, Frau Birgit Störr, Frau Yvonne Horn und Herrn Sergej Kechter bin ich für die hervorragende technische Assistenz und die zahlreichen Hilfen und Verbesserungsvorschläge zu Dank verpflichtet.

Meiner Freundin Steffi danke ich für die wunderschöne Zeit an so vielen Orten dieser Welt.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Sonnhild und Geert Schiegnitz, sowie meinen Geschwistern Svenja, Liv und Jan. Sie haben auf ganz besondere Weise zum Gelingen dieser Arbeit und meines Studiums beigetragen. Ihr Vertrauen und ihre Unterstützung haben mich stets gefördert und gestützt.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5726-8



9 783835 195726 8