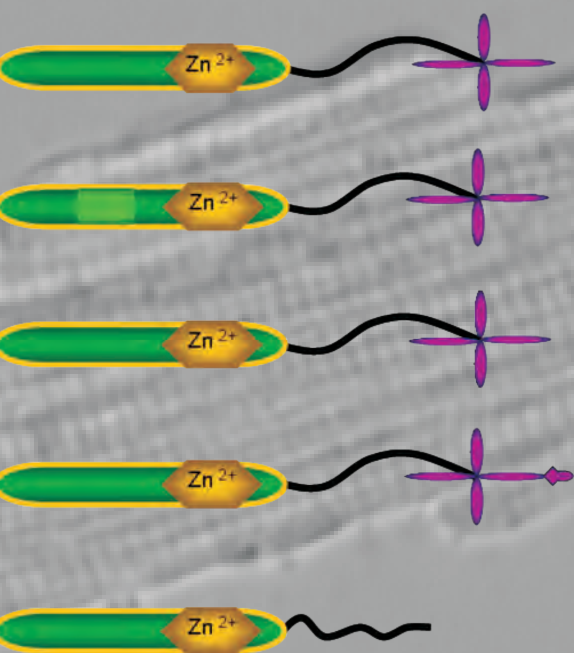


Charakterisierung eines Hypertrophierepressors in ventrikulären Herzmuskelzellen

YVONNE OSYGUS



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2010

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 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Gerhild Euler

Charakterisierung eines Hypertrophierepressors in ventrikulären Herzmuskelzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Yvonne Osygus

Tierärztin aus Herdecke

Gießen 2010

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

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

Gutachter/in: **Prof. Dr. Joachim Roth**
Prof. Dr. Gerhild Euler

Tag der Disputation: **11. Juni 2010**

Meiner Tochter Antonia

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Hypertrophie	1
1.1.1 Exzentrische Hypertrophie	1
1.1.2 Konzentrische Hypertrophie	2
1.1.3 Physiologische Hypertrophie	2
1.1.4 Spätfolgen der Hypertrophie	3
1.2 Auslöser der myokardialen Hypertrophie	4
1.3 Matrix Metalloproteasen	8
1.3.1 Struktur der Matrix Metalloproteasen	8
1.3.2 Klassifizierung	10
1.3.3 Zelluläre Funktionen	11
1.4 Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen	13
1.4.1 Physiologische Inhibitoren	13
1.4.2 Pharmakologische Inhibitoren	14
1.5 Fragestellung	14
<i>2 Material und Methoden</i>	<i>15</i>
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.1.2 Geräte und Laborbedarf	17
2.1.3 Puffer und Lösungen	20
2.2 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten	24
2.2.1 Versuchstiere	24
2.2.2 Präparation der Kardiomyozyten	24
2.2.3 Vorinkubieren der Kulturschalen mit Vorplattiermedium	25
2.2.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten	25
2.2.5 Mediumwechsel der Kardiomyozyten	26
2.3 Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts	26
2.4 Hypertrophieerfassung durch Bestimmung der Proteinbiosyntheserate	26
2.4.1 Photometrische Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford	28
2.5 Western Blot	28
2.5.1 Präparation der cytosolischen Proteine mittels RIPA	28
2.5.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge im Lowry Assay	29
2.5.3 Probenaufbereitung für den Western Blot - Lämmli-Färbung	30
2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (diskontinuierlich)	30
2.5.5 Blotten der Proteine	33
2.5.6 Immundetektion	34
2.5.7 Inkubation der Antikörper	34
2.5.8 Detektion der Proteine	35

2.6	GSK-3β Aktivitätsmessung	35
2.6.1	GSK-3 β Immunopräzipitation	36
2.7	Hoe Assay - Fluorometrische quantitative Bestimmung der Apoptoserate	37
2.8	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Wirkung von Matrix Metalloprotease Inhibitoren auf Kardiomyozyten	39
3.1.1	Steigerung des Zellwachstums in Kardiomyozyten durch TAPI-0	39
3.1.2	Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch TAPI-0	40
3.1.3	Der TNF- α Inhibitor WP9QY erhöht in Kardiomyozyten die Proteinbiosynthese nicht	41
3.1.4	Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch MMP Inhibitor III	42
3.1.5	Steigerung der Zellquerschnittsfläche in Kardiomyozyten durch TIMP-2	43
3.1.6	Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch TIMP-2	44
3.1.7	Reduzierung der TAPI-0-induzierten Zellquerschnittsflächen-vergrößerung durch Transkriptions- und Translations-Inhibitoren	44
3.2	Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Hypertrophie durch Inhibition der PI3-Kinase	46
3.2.1	Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Proteinbiosynthese durch Ly 290042	47
3.2.2	Reduzierung der durch TAPI-0 vergrößerten Zellquerschnitts-fläche durch Ly 290042	48
3.2.3	Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Proteinbiosynthese durch Wortmannin	49
3.3	Erhöhung der phospho-ERK in TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten	50
3.3.1	Verhinderung der durch TAPI-0 induzierten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche durch Inhibition der ERK	51
3.4	Inaktivität der GSK-3β in TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten	52
3.5	Erniedrigung der GSK-3β Aktivität in TAPI-0 stimulierten Zellen	54
3.6	Reduzierung der TGFβ induzierten Apoptose durch TAPI-0	54
4	Diskussion	56
4.1	Matrix Metalloproteasen als Repressoren der Herzhypertrophie	56
4.2	Signalweg der Hypertrophieinduktion unter Matrix Metalloprotease Inhibition	58
4.3	Apoptosewirkung unter MMP-Inhibition	61
4.4	Bedeutung der Befunde	62
4.4.1	Ausblick	64
5	Zusammenfassung	65
6	Summary	67
7	Literaturverzeichnis	69
8	Anhang	78
8.1	Danksagung	78
8.2	Eidesstattliche Erklärung	80

Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AKT / PKB	Proteinkinase B
ADAM	a disintegrin and Metalloprotease
ADAMTS	a disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin motifs
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	Complementary Desoxyribonucleinacid
CCT	Creatin, Carnitin, Taurin
CSA	Cross sectional area (Zellquerschnittsfläche)
Cu ₂ SO ₄	Kupfersulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenamintetraacetat
ERK	Extracellular signal-regulated Kinases
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerretichperoxidase)
GDF15	Growth differentiation factor 15
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3β
JUNKs	C-Jun N-terminal kinases

KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
mA	Milliampere
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix Metalloprotease
MLC	Myosin light chain
MT-MMP	Membrane-Type Matrix Metalloproteinases
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Kochsalz, Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
PI3-Kinase (PI3-K)	Phosphatidylinositide-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAPI-0	TNF- α Protease Inhibitor-0
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris (hydroxymethyl) - aminomethane
UpM	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Das Herz (lat. Cor, gr. Kardia) ist ein zentrales muskulöses Hohlorgan im Körper der Säugetiere. Es hat zwei Kammern und zwei Vorhöfe und liegt in der Brusthöhle. Die Vorhöfe speichern das zum Herz strömende Blut. Die Kammern werfen das Blut durch rhythmische Kontraktion in den Kreislauf aus. Das Herz arbeitet als Saug- und Druckpumpe in einem geschlossenen System und sorgt durch eine pulsatorische, gerichtete Blutströmung für eine Blutverteilung in den Lungen- und Körperkreislauf. Die dadurch entstehende Versorgung des Körpers mit Blut ist Voraussetzung für den Stoffwechsel und die Funktionen der Gewebe (Wörterbuch der Veterinärmedizin, 1991; Physiologie der Haustiere, 2000). Durch Anpassungsmechanismen ist das Herz bis zu einem gewissen Grad in der Lage, bei unterschiedlichen Leistungsanforderungen den Nährstoff- und Sauerstoffbedarf des Körpers zu gewährleisten.

Neben kurz- bis mittelfristigen Anpassungsmechanismen, wie der Steigerung der Kontraktilität unter Sympathikusaktivierung und unter arterieller Vorlast, gibt es auch langfristige Anpassungsmechanismen, wie strukturelle Veränderungen des Herzmuskels durch Hypertrophie.

1.1 Hypertrophie

Eine Hypertrophie ist eine Größenzunahme eines Gewebes oder Organs, bei der sich die Zellen nicht teilen sondern vergrößern. Dies geschieht unter anderem in den Herzmuskelzellen, die enddifferenziert sind und sich deshalb nicht mehr durch Teilung vermehren können (Wörterbuch der Veterinärmedizin, 1991). Dabei wird zwischen verschiedenen Hypertrophieformen unterschieden.

1.1.1 Exzentrische Hypertrophie

Eine Volumenüberbelastung, beispielsweise durch eine Klappeninsuffizienz, resultiert in Ventrikeldilatation ohne bedeutende Zunahme des Ventrikelmyokards. Durch das erhöhte Volumen steigt der diastolische ventrikuläre Füllungsdruck und damit verbunden die Wandspannung. Es kommt zur Dehnung und Ver-

mehrung der Sarkomere überwiegend in Längsrichtung und damit zur Vergrößerung des Ventrikels.

1.1.2 Konzentrische Hypertrophie

Durch einen erhöhten Widerstand, beispielsweise durch eine Klappenstenose oder Hypertonie, entsteht eine Drucküberbelastung und eine dadurch bedingte erhöhte Wandspannung. Es kommt zu einer Vermehrung der Sarkomere in paralleler Anordnung. Dadurch nimmt die Wanddicke zu. Das Ventrikelvolumen bleibt unverändert oder nimmt ab (siehe Abb. 1) (Innere Medizin, 2007).

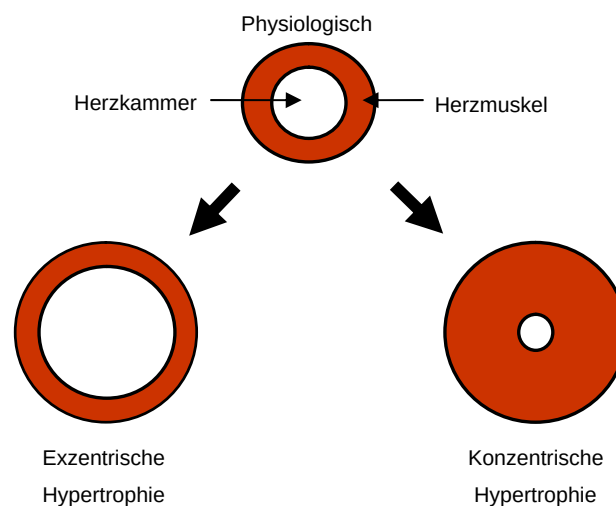


Abbildung 1

Querschnitt eines Herzventrikels: Vergleich des Herzmuskels und des Herzkammer-volumens bei den zwei verschiedenen Hypertrophieformen. Bei der exzentrischen Hypertrophie vergrößert sich das Kammervolumen und der Kammermuskel dilatiert. Bei der konzentrischen Hypertrophie erhöht sich die Wanddicke und das Herzvolumen verkleinert sich.

1.1.3 Physiologische Hypertrophie

Eine physiologische Hypertrophie tritt vermehrt bei Hochleistungssportlern auf (Sportlerherz). Die Hypertrophie leichten Grades ist eine physiologische Antwort auf eine erhöhte Aktivität. Hypertrophie vom exzentrischen Typ tritt vor allem bei Sportarten mit Volumenbelastung (Langstreckenlauf, Schwimmen) auf. Bei Sportarten mit Druckbelastung (Gewichtheben, Ringen, Rudern) treten eher konzentrische Hypertrophien auf (Innere Medizin, 2007).

1.1.4 Spätfolgen der Hypertrophie

Nimmt die Herzmuskelmasse weiter zu, können die Gefäße das Herzgewebe nicht mehr ausreichend versorgen. Es kommt zu irreversiblen Schädigungen durch Ischämie, Fibrosierung und Degeneration des subendokardialen Myokards, bis hin zum Myokardversagen (Innere Medizin, 2007).

Reichen die Kompensationsmaßnahmen des Herzens nicht mehr aus, um den Organismus adäquat mit Blut zu versorgen, spricht man von einer Herzinsuffizienz (siehe Abb. 2) (Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 2008).

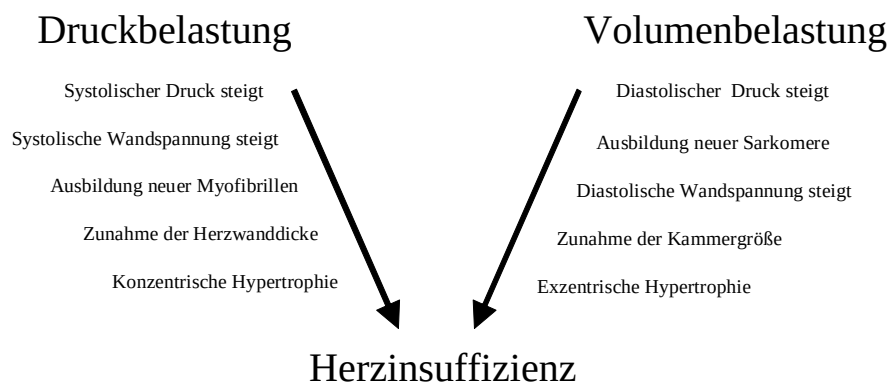


Abbildung 2

Durch dauerhafte Druck- oder Volumenbelastung ist der Organismus nicht mehr in der Lage diese zu kompensieren. Herzinsuffizienz kann die Folge sein.

Die Herzinsuffizienz definiert sich durch eine Einschränkung der normalen Herzfunktion mit herabgesetzter Förderleistung und/oder durch Blutrückstau (Innere Medizin, 2007). Sie ist ein gemeinsames Symptom verschiedener Grunderkrankungen (Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 2008) und wird in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Die New York Heart Association (NYHA) (Innere Medizin, 2004) klassifizierte 1964 die Herzinsuffizienz aufgrund unterschiedlicher Schweregrade anhand anamnestischer und einfacher klinischer Kriterien in vier Klassen (NYHA I-IV):

- I. Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine Beschwerden.
- II. Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Stärkere körperliche Belastungen rufen Beschwerden hervor.

- III. Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung löst Beschwerden aus.
- IV. Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

In Europa ist die Herzinsuffizienz mit mehr als 10 Millionen Betroffenen eine der häufigsten internistischen Erkrankungen. 2008 starben in Deutschland 48.918 Menschen an der Herzinsuffizienz und somit war die Herzinsuffizienz 2008 die dritthäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2008). Die 5-Jahres-Mortalität liegt trotz des Fortschritts in der medikamentösen Therapie weiterhin bei über 50 % (Owan et al., 2006).

Inwiefern die kardiale Hypertrophie ein wichtiger Prädiktor für eine entstehende Herzinsuffizienz sein kann, wird in der Analyse klinischer Studien deutlich. Eine linksventrikuläre Hypertrophie erhöht das Risiko für eine nachfolgende kardiovaskuläre Erkrankung bzw. das Sterblichkeitsrisiko durchschnittlich jeweils um mehr als das Doppelte (Vakili et al., 2001). Wurde bei Patienten mit einer diagnostizierten linksventrikulären Hypertrophie durch medikamentöse Behandlung die Hypertrophie rückläufig, wiesen diese ein geringeres Risiko kardiovaskulärer Mortalität auf (Mathew et al., 2001). Die Myokardhypertrophie gilt demnach als wichtiger Prädiktor für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz und eine erhöhte Morbidität und Mortalität.

1.2 Auslöser der myokardialen Hypertrophie

Induktoren wie mechanischer Stress, Hypoxie, neurohumorale Stimuli, vasoaktive Peptide und Hormone können in den Kardiomyozyten hypertrophes Wachstum auslösen (Peivandi et al., 2009). Sie induzieren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die schließlich zu einer veränderten Genexpression und gesteigerten Proteinbiosynthese führen (siehe Abb.3).

Eine Sympathikusaktivierung führt an den transmuralen Nervenendigungen zu einer Freisetzung von Katecholaminen. Endogene Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin wirken an der Zellmembran über adrenerge Rezeptoren. Die Rezeptoren gehören zu der Familie der membrangebundenen G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren (Brodde et al., 2006). Auf den Kardiomyozyten sind die Rezeptoren: α_{1A} , α_{1B} , β_1 , β_2 identifiziert worden (Schlüter et al., 2007). Grundsätzlich kann die Stimulation der α - und β -Adrenorezeptoren zu Hypertrophiebildung in Kardiomyozyten führen. Die Hypertrophieinduktion durch α -adrenerge Agonisten wie Phenylephrin löst über α_1 - Adrenorezeptoren vermittelt intrazelluläre Signalkaskaden aus (Schlüter et al., 1999).

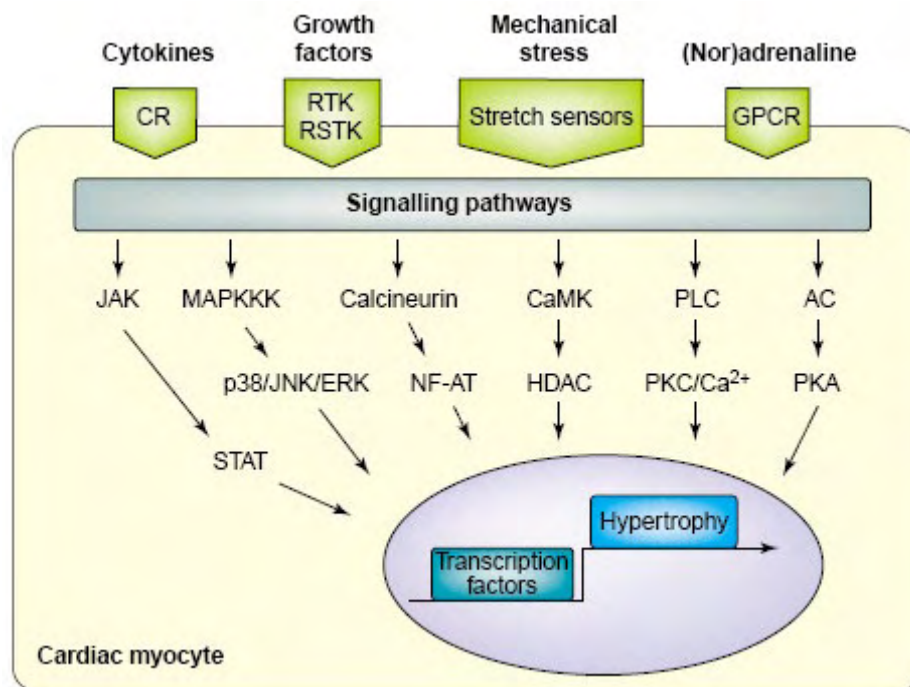


Abbildung 3

Verschiedene Induktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, mechanischer Stress oder neurohumorale Stimuli können intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Sie induzieren veränderte Genexpression und gesteigerte Proteinbiosynthese und führen zu hypertrophem Wachstum (Ritter et al., 2003).

Die Hypertrophie kann in vivo und in vitro induziert werden. In vivo lässt sich nach adrenerger Stimulation in Rattenherzen eine linksventrikuläre Hypertrophie induzieren (Zimmer et al., 1997). Auch in vitro zeigen isolierte Kardiomyozyten nach α -adrenerger Stimulation hypertrophes Wachstum (Schlüter et al., 1992). Die α_1 -Adrenorezeptoren gehören zu einer Rezeptor-Familie membran-gebundener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die sieben transmembran durchspannende Domänen besitzt (Simpson et al., 1983). Nach der Aktivierung der Adrenorezeptoren, die mit den G-Proteinen G_q -Komplexe bilden, aktivieren sie die Phospholipase C, die über Diazylglycerol die membrangebundene

Proteinkinase C aktiviert (Schlüter et al., 2007). Die PI3-Kinase ist eine klassische Kinase, die unter α_1 -Adrenorezeptor Stimulation aktiviert wird. Sie stellt ein Schlüsselenzym in der Wachstumsregulation der adulten Kardiomyozyten dar. Die PI3-Kinase wird über die Proteinkinase C aktiviert. In der Signalkaskade werden nachfolgend die Kinasen AKT/PKB phosphoryliert. Anschließend folgt eine Phosphorylierung der p70^{S6}-Kinase. Dies führt zu einem Anstieg der Aktivität der Translation der Ribosomen, was zu einer gesteigerten Proteinbiosynthese führt (Schlüter et al., 1999).

Die PI3-Kinase kann auch über Angiotensin II und GDF15 aktiviert werden. Die Stimulation über Angiotensin II erfolgt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und folgend einer Aktivierung der Proteinkinase C und der ERK (extracellular-regulated-kinase). Die aktivierte PI3-Kinase führt zu einer veränderten Genexpression und einer gesteigerten Proteinbiosynthese (Ruf et al, 2002). Die Stimulation über GDF15 (Growth differentiation factor 15) führt zu einer gesteigerten Proteinbiosynthese (Heger et al., 2010).

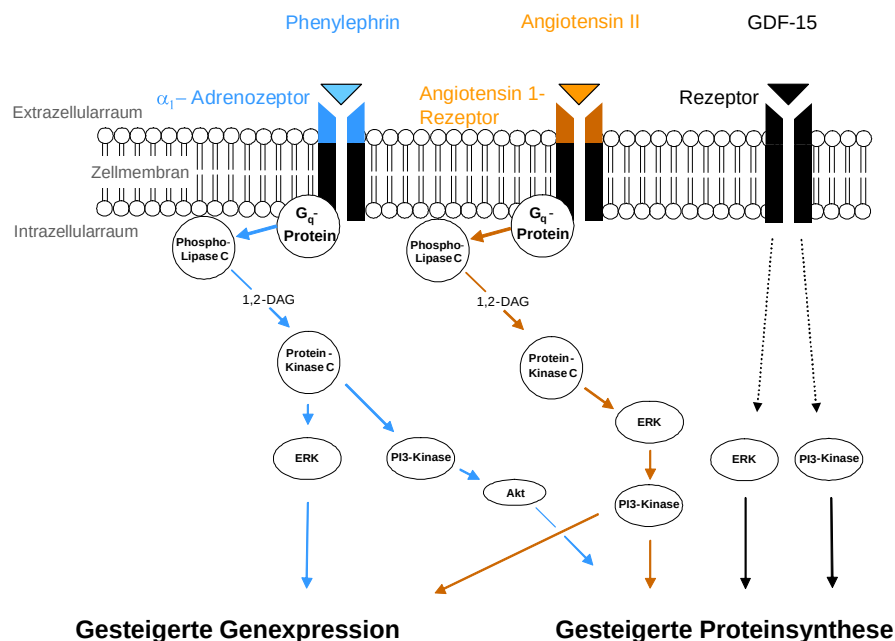


Abbildung 4

Durch extrazelluläre Stimulation verschiedener Rezeptoren kann über intrazelluläre Aktivierung von ERK und PI3-Kinase Hypertrophie induziert werden. Eine veränderte Genexpression dient als Marker, führt aber nicht zu Zellhypertrophie.

Die ERK gehört, wie die JNKs und die p38 MAPKs, zu der Familie der MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Frey et al., 2003). Es gibt auch unterschiedliche Wege, in denen die ERK am hypertrophen Signalweg der Kardiomyozyten involviert bzw. aktiviert sein kann. Durch Phenylephrin kann ERK2 über Stimulation von α_1 -Adrenorezeptoren und Aktivierung der Proteinkinase C in adulten Kardiomyozyten aktiviert werden. Es entsteht dadurch eine veränderte Genexpression, jedoch keine gesteigerte Proteinbiosynthese (Schlüter et al., 1999). Des Weiteren kann über Angiotensin-II Stimulation ERK aktiviert werden (Ruf et al., 2002). Auch durch Stimulation mit GDF15 wird eine Aktivierung der ERK induziert (Heger et al., 2010). Über diese beiden Induktoren führt die Aktivierung der ERK zu einer Steigerung der Proteinbiosynthese in adulten Kardiomyozyten und ist dadurch am hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten beteiligt.

Neben den prohypertrophen Signalwegen hat man mittlerweile auch intrazelluläre Repressoren der Hypertrophie identifiziert. Zu ihnen gehört die GSK-3 (Glycogen synthase kinase-3) (Hardt et al., 2002). Die GSK-3 ist eine intrazelluläre Kinase, die ursprünglich im Zusammenhang mit der Regulation des Glykogen Metabolismus charakterisiert wurde. Mittlerweile wurde erkannt, dass sie auch an anderen zellulären Prozessen beteiligt ist (Sugden et al., 2008). GSK-3 ist eine Serin/Thyrosin Kinase, von der es zwei Isoformen gibt, GSK-3 β und GSK-3 α . Im Herzen wurde überwiegend GSK-3 β identifiziert. Die Aktivität der GSK-3 β wird über Phosphorylierung durch Serin9 gehemmt und über Tyrosin216 aktiviert. GSK-3 β ist ein negativer Regulator der Herzhypertrophie und verhindert hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten. Die Inhibition der GSK-3 β führt zu hypertrophem Zellwachstum (Sugden et al., 2008). Über-expression der GSK-3 β führt zu einer erhöhten Aktivität unter hypertropher Stimulation, die hypertrophe Parameter, wie die Proteinbiosynthese und die hypertrophe Genexpression, inhibierten. Durch Stimulation hypertropher Signalwege in Kardiomyozyten, wie über α -Adrenorezeptoren und nachfolgender Aktivierung der PI3-Kinase/AKT, werden GSK-3 β (Serin9) phosphoryliert (Hardt et al., 2002). Die Aktivität der GSK-3 β reduziert sich um 40-60% (Sugden et al., 2008). Der genaue Mechanismus, über welchen Weg GSK-3 β die Herzhypertrophie hemmt, ist allerdings noch ungeklärt.

Neben der Hypertrophie findet man weitere strukturelle Umbauprozesse im Herzen, die zur Insuffizienz führen können. Hierzu gehören Apoptose, Fibrose, der Verlust von Herzmuskelzellen und kontraktile Dysfunktion. Man spricht von ventrikulärem Remodeling (Hein et al., 2003). Eine zentrale Rolle beim ventrikulären Remodeling könnten Matrix Metalloproteinasen spielen, da diese während der Prozesse des Remodelings verstärkt exprimiert werden und vielfältige Ansatzpunkte in diesem Geschehen aufweisen.

1.3 Matrix Metalloproteasen

Die Erforschung der Matrix Metalloproteasen stellt einen noch recht jungen Werdegang dar. 1962 wurde von Jerome Gross und Charles Lapière erstmals ein Enzym beschrieben, welches in Wirbeltieren Kollagenfibrillen lysiert. Sie zeigten dies anhand von Hautzellen einer Kaulquappe, die in ein Kollagen-Gel eingebracht wurde. Gross und Lapière konnten nachweisen, dass diese die Kollagenstruktur (Kollagen-Tripelhelix) degradierten (Gross et al., 1962).

Dieses Enzym wurde als Collagenase 1 definiert und später als MMP-1 klassifiziert. 1986 wurde die Collagenase 1, basierend auf cDNA, erstmals aus humaner Haut sequenziert (Gregory et al., 1986).

Drei Jahre später wurden auf dem Destin Beach Matrix Metalloproteinase Meeting die bis dahin 7 identifizierten Collagenasen der Familie der Matrixine (=Matrix Metalloproteasen =MMP) zugeordnet und nummeriert (Woessner et al., 1994). Die Forschung entwickelte sich seitdem enorm. Mittlerweile wurden über 13.000 Artikel veröffentlicht und jedes Jahr kommen circa 1400 weitere hinzu (Woessner et al., 2002).

1.3.1 Struktur der Matrix Metalloproteasen

Matrix Metalloproteasen wurden als Endopeptidasen mit einem zinkabhängigen katalytischen Zentrum charakterisiert. Die Proteasen der Familie wurden aufgrund ihrer zinkabhängigen katalytischen Aktivität klassifiziert. Später wurde festgestellt, dass die Fähigkeit zu allgemein gehalten war, denn auch weitere Proteasen besitzen eine zinkabhängige katalytische Region. Mittlerweile wird die Klassifizierung aufgrund der DNA Sequenz vorgenommen (Woessner et al., 2002). Proteinase werden in der MEROPS Datenbank verwaltet

(<http://www.merops.sanger.ac.uk/>) (Nagase et al., 2006). Die MMPs werden dort der Familie M10 = Metalloendopeptidasen (mit Zink in ihrem katalytischen Zentrum) zugeordnet und in der Subfamilie M10 A eingeordnet.

Subfamilien :

M10 A: Matixine = Matrix Metalloproteasen

M10 B: Seralysine

M10 C: Fragilysine

Matrix Metalloproteasen weisen folgende Merkmale auf (Creemers et al., 2001):

- Degradieren extrazelluläre Matrixproteine
- Werden in einer inaktiven Prä-Proform sekretiert und benötigen eine Aktivierung
- Zink in ihrem aktiven Zentrum
- Benötigen Kalzium für ihre Stabilität
- Sind aktiv bei neutralem pH-Wert
- Werden inhibiert durch TIMPs

1.3.2 Klassifizierung

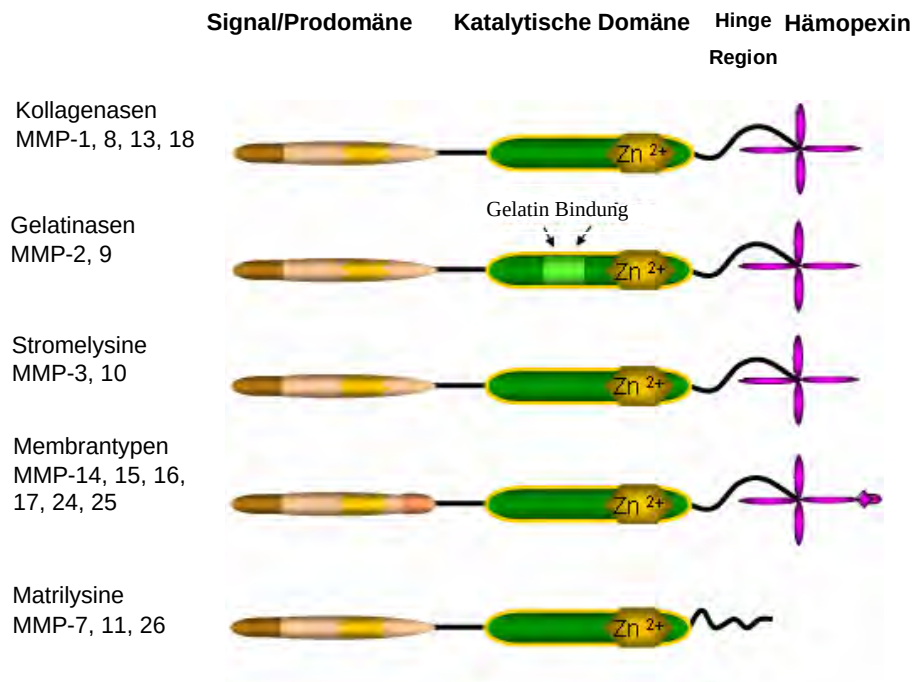
Die Klassifizierung der MMPs erfolgte aufgrund ihrer Substratspezifität. Sie wurden in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Membrantypen und andere eingeteilt (siehe Abb. 5) (Nagase et al., 2006).

Enzyme		Klassifikation	Lokalisation im Myokard
Kollagenasen	Kollagenase-1 (interstitielle)	MMP-1	X
	Kollagenase-2 (neutrophile)	MMP-8	X
	Kollagenase-3	MMP-13	X
	Kollagenase-4	MMP-18	
Gelatinasen	Gelatinase A	MMP-2	X
	Gelatinase B	MMP-9	X
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	X
	Stromelysin-2	MMP-10	
Matrilysine	Matrylisin-1	MMP-7	X
	Matrylisin-2	MMP-26	
	Stromelysin-3	MMP-11	
Membrantypen: Transmenbran	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24	X
GPI-Anker	MT4-MMP MT6-MMP	MMP-17 MMP-25	
Andere	Macrophage elastase	MMP-12	
	-----	MMP-19	
	Enamelysin	MMP-20	
	-----	MMP-21	
	CA-MMP	MMP-23	
	-----	MMP-27	
	Epilysin	MMP-28	

Abbildung 5

Modifizierte Tabelle mit der Klassifikation der MMPs (Nagase et al., 2006) und Identifikation derer, die im Myokard identifiziert worden sind (Spinale et al., 2007).

Mittlerweile ist man dazu übergegangen, MMPs numerisch nach ihrer Klassifikationsnummer aufzulisten und ihnen ihre Substrate und Wirkungsorte zu zuordnen.



Gemeinsame Strukturmerkmale der Matrix Metalloproteasen: Der Aufbau einer typischen Matrix Metalloprotease besteht, beginnend am N-terminalen Ende, aus einem Propeptid und einer katalytischen Metalloprotease Domäne. Die meisten besitzen an dem nun folgenden C-terminalen Ende noch ein Verbindungspeptid, genannt „Hinge Region“ mit variabler Länge und einer Hämopepin Domäne, bestehend aus 200 AS. Die Ausnahmen bilden MMP-7, MMP-23, und MMP-26, die keine Hinge Region und kein Hämopepin besitzen (Sommerville et al., 2003). Abbildung modifiziert (Spinale et al., 2007).

Weitere Domänen wie Hinge-Region, Hämo-pexin Domäne, transmembranöse und cytoplasmatische Domäne, Immunglobulin-Domäne, GPI-Anker, Signal-Anker, „cystein arrays“ oder Typ V Kollagen-ähnliche Einschübe sind nicht mehr Bestandteil aller MMPs. Sie kommen in einzelnen Klassen oder Strukturen vor (Nagase et al., 2006).

1.3.3 Zelluläre Funktionen

Bisher wurden mehr als 20 humane Matrix Metalloproteasen identifiziert, die überwiegend Proteine der extrazellulären Matrix degradieren. Die Degradation der extrazellulären Matrix ist ein gut regulierter physiologischer Prozess, der in

die Entwicklung, Morphogenese, Gewebeneubildung und Remodeling des Organismus involviert ist. Eine Dysregulation spielt bei vielen pathologischen Prozessen wie Arthritis, Nephritis, Krebs, Encephalomyelitis, usw. eine Rolle (Nagase et al., 2006).

Auch in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Herzens ist die Degradation der extrazellulären Matrix involviert. 1975 wurde von Montfort und Perez-Tamayo die Anwesenheit von Collagenase im Myokard nachgewiesen. Im Myokard ist unkontrolliertes Remodeling der extrazellulären Matrix mit beteiligt an der Entstehung von Arteriosklerose, von Stenosen, linksventrikulärer Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Aneurysmen (Nagase et al., 2006). Myokardiale MMPs werden von Fibroblast ähnlichen Zellen, Entzündungszellen und von den Kardiomyozyten exprimiert. Sie wurden bis jetzt vorwiegend in inaktiver Form in der extrazellulären Matrix lokalisiert, wo sie erst nach Aktivierung als Proteasen wirken. Es wurde gezeigt, dass während des Remodelings nach einem Myokardinfarkt verschiedene MMPs (MMP-1, -2, -3 und -9) verstärkt exprimiert werden und vermehrt in ihrer aktiven Form vorliegen (Creemers et al., 2001).

Mittlerweile ist bekannt, dass die MMPs nicht nur in den Extrazellulärraum sezerniert werden und dort proteolytisch aktiv sind, sondern auch intrazelluläre Wirkungen aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition von MMPs in Fibroblasten Zellwachstum ausgelöst werden kann (Corocan et al. 1995).

Neue Studien zeigen, dass MMP-1, MMP-2, und MMP-20 auch intrazelluläre Aktivität aufweisen (Nagase et al., 2006). In Kardiomyozyten wurde MMP-2, welche als membranständige Protease bekannt ist, auch intrazellulär lokalisiert. MMP-2 bindet dort an verschiedene Zellorganellen und kann intrazellulär aktiviert werden. Es wurde eine Beteiligung an der Degradation des Zytosklettes durch MMP-2 nachgewiesen. Sarkomere Proteine wie Troponin I, MLC-1 und α -Aktin sind mit MMP-2 kolokalisiert. Sie können nach Aktivierung von MMP-2 proteolytisch gespalten werden. MMP-2 trägt so zur kontraktile Dysfunktion bei.

Auch im Zellkern wurde MMP-2 lokalisiert. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass MMP-2 das zur DNA Reparatur notwendige Enzym Poly(ADP-ribosyl)Polymerase (PARP) proteolytisch spalten kann. Auch in Mitochondrien

und in den Calveolen wurde MMP-2 im Herzen lokalisiert (Kandasamy et al., 2010). Ob MMPs zusätzlich noch in anderen Zellorganellen vorkommen und welche Funktionen sie in einzelnen Zellkompartimenten übernehmen, ist noch unbekannt.

1.4 Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen

1.4.1 Physiologische Inhibitoren

TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) sind endogene Inhibitoren von Matrix Metalloproteasen, die 1:1 an MMPs binden. In Wirbeltieren wurden bisher 4 Subtypen identifiziert (Woessner et al., 2002). Die vier Subtypen wurden auch im Herzen und in Kardiomyozyten gefunden (Kandasamy et al., 2010). TIMPs wirken im Zusammenspiel mit den MMPs. Im physiologischen Zustand besteht ein Gleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs. Bei pathologischen Veränderungen kann durch Verschiebung des Gleichgewichtes ein pathologischer Um- und Abbau der extrazellulären Matrix entstehen.

TIMPs bestehen aus einer N-terminalen Domäne (ca. 125 AS) und einer C-terminalen Domäne (ca. 65 AS) (Visse et al., 2003), die durch drei Disulfidbindungen zwischen konservierenden Cysteinresten stabilisiert werden. Die N-terminale Domäne ist extra gefaltet. Sie hat die Fähigkeit durch Interaktion mit dem katalytischen Zink-Ion eine Bindung mit den MMPs einzugehen und das aktive, zur Proteolyse notwendige Zentrum zu blockieren (Nagase et al., 2006).

TIMPs inhibieren alle bisher getesteten MMPs (Nagase et al., 2006). Sie haben keine sehr hohe Spezifität zu speziellen MMPs (Kandasamy et al., 2010). Neigungen sind aber mittlerweile zu erkennen. TIMP-1 ist ein schlechter Inhibitor für MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP und MMP-19 (Nagase et al., 2006). Aber TIMP-1 bindet bevorzugt an MMP-9. TIMP-2 hat eine bevorzugte Bindung an MMP-1, 2 und 9. TIMP-3 hat eine besondere Stellung als Inhibitor. Er inhibiert auch MT-MMPs (Kandasamy et al., 2010) und die Proteasen der ADAM und ADAMTS Familie (Visse et al., 2003).

1.4.2 Pharmakologische Inhibitoren

Neben endogenen MMP-Inhibitoren gibt es zahlreiche pharmakologische Inhibitoren wie TAPI-0 (TNF- α Protease Inhibitor-0) oder MMP Inhibitor III. TAPI-0 hemmt die MMP Isoformen der Kollagenasen, Gelatinasen und auch unspezifisch das TNF- α converting enzyme (Mühlberg et al., 1995). Der MMP Inhibitor III inhibiert die Isoformen 1, 2, 3, 7 und 13 der Matrix Metalloproteasen (Covington et al., 2006).

1.5 Fragestellung

Matrix Metalloproteasen sind unter Bedingungen des ventrikulären Remodelings induziert und weisen intrazelluläre Wirkung in Herzmuskelzellen auf. In dieser Arbeit soll der Einfluss der Matrix Metalloproteasen auf Hypertrophie und Apoptose in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte geklärt werden.

Es soll schwerpunktmäßig analysiert werden, inwiefern durch Hemmung von Matrix Metalloproteasen hypertrophes Wachstum in isolierten Kardiomyozyten induziert wird. Dazu soll geklärt werden, ob pharmakologische und physiologische Inhibitoren der MMPs in isolierten Kardiomyozyten Hypertrophie auslösen können.

Im Weiteren sollen intrazelluläre Signalkaskaden unter MMP-Inhibition analysiert werden. Es soll untersucht werden, ob Kinasen bekannter klassischer hypertropher Signalwege involviert sind. Folgend soll untersucht werden, ob die Blockierung der Kinasen die durch MMP-Inhibition ausgelöste Hypertrophie hemmt.

Weiterhin soll geklärt werden, inwiefern Matrix Metalloproteasen Einfluss auf die Apoptose haben. Dazu soll untersucht werden, ob sich in Kardiomyozyten unter MMP-Inhibition die Apoptoserate verändert, wenn die Kardiomyozyten mit einem klassischen Apoptosestimulus inkubiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Qbiogene, Heidelberg
APS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Coomasie Brilliant Blue G 250 (wt/vol)	Sigma, Taufkirchen
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DDT)	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Applichem, Darmstadt
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Stockmeier Chemie, Bielefeld
FCS	PAA, Cölbe
Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz	Sigma, Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Applichem, Darmstadt
β -Glycerolphosphat	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe

HCl	Roth, Karlsruhe
Hoechst Farbstoff 33258 (Hoe 33258)	Sigma, Taufkirchen
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
M199	Biochrom AG, Berlin
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Roth, Karlsruhe
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Na_2CO_3	Roth, Karlsruhe
NaHCO_3	Roth, Karlsruhe
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ortho-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
L-[U- ^{14}C]-Phenylalanin	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Merck, Darmstadt,
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Applichem, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Darmstadt

SuperSignalR West	Pierce Biotechnology, Rockfort
Pico Chemiluminescent Substate	
Szintillationslösung Ultima-Gold	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TRIS	Merck, Darmstadt
Tween R 20	Applichem, Darmstadt
TCA	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

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

2.1.2 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur:

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

Verbrauchsmaterialien:

Falcon 50ml-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Frischhaltefolie	Aldi Süd, Mühlheim
Handschuhe Größe S	Nobaglove-Latex, Wetter
Kulturschalen Typ: Falcon 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg

Mikrotiterplatten Typ: Falcon 3910	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen;	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eurotips 1000; 100; 10 µl	
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter; 0,2 µm Porenweite	GE Healthcare Europe, München
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt a. M.
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

Sonstige Geräte:

Anlage zur Wasserdemineralisierung	Millipore, Schwalbach
Flüssig-Szintillationszähler	PerkinElmer, Waltham USA
Tri-carb 2810TR	
Glasgeräte	Schott, Mainz
Hand-Homogenisator, Pellet Pestle [®]	Kimble Kontes, New Jersey, USA
Heizblock (Dry Block [®] DB 3 D)	Techne AG, Burkhardsdorf
Heizblock (Dry Block [®] DB 2 A)	Techne AG, Burkhardsdorf
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Microplate reader Tecan infinite 200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikrotiterplatten, 96-Well	Dynatech, Denkendorf
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
Minishaker M 52	IKA [®] , Wilmington
Pellet Stößel, (Pellet pestle, disposable)	Sigma, Taufkirchen
Ph 211 Microprocessor pH-Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Photometer	PerkinElmer, Waltham USA
Pi pump	Glasfibr GmbH, Giessen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sample Mixer Dynal [®] Model Mixi	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Schüttler Type Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Allegra [™] 25 R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

Western Blot:

Blotkammer	BIOTECH-Fischer GmbH, Reiskirchen
CHEMI-SMART TH 5100	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hamiltonspritze (50 ml)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefer-Elektrophoresekammer	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Glasplatte	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Kamm	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Plattenklemme	GE Healthcare Europe, München
Hoefer-Spacer	GE Healthcare Europe, München
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Netzgerät, Standard Power Pack P 25	Biometrische Analytik, Göttingen
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman® GmbH, Dassel
Trockenpapiere Universal	BIOTECH-Fischer GmbH, Reiskirchen

Antikörper und Substanzen:

Actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
Adenosine 5'-triphosphate, [gamma-32p]	PerkinElmer, Waltham USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, NEB GmbH, Frankfurt a. M.
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, NEB GmbH, Frankfurt a. M.
ERK 2 (C-14)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
GSK-3β Activity Assay Kit	Sigma, Taufkirchen
Ly 294002	Merck, Darmstadt
MMP Inhibitor III	Merck, Darmstadt
Monoclonal Anti-Actin Clone AC-40	Sigma, Taufkirchen
PageRuler TM Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

p-ERK (E-4):sc-7383	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Phospho-GSK-3 β (Ser9)	Cell Signaling, NEB GmbH, Frankfurt a.M.
PD 98059	Merck, Darmstadt
Spectra TH Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
TAPI-0	Merck, Darmstadt
TIMP-2, Human, Recombinant	Merck, Darmstadt
Wortmannin	Merck, Darmstadt
WP9QY	Merck, Darmstadt

Software:

Adobe Photoshop®	Adobe Systems, San Jose., USA
Microsoft Word 2000®	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Excel 2000®	Microsoft Corp., Redmont, USA
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld
QuantaSmart Tri-Carb TH LSC Software	PerkinElmer, Waltham USA
SPSS	SPSS GmbH Software, München

2.1.3 Puffer und Lösungen

4x Lämmli Puffer:

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

5% BSA:

BSA	5g
1x TBS	100 ml
Tween 20	500 μ l

5% Magermilchpulver:

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

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

10 x TBS:

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
pH 7,4 einstellen	

Acrylamid 30%:

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

Ausplattiermedium / Waschmedium für isolierte Zellen:

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

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brilliant Blue G250	0,1% (wt/vol)
Methanol, 96%ig	5,0% (vol/vol)
ortho-Phosphorsäure, 85%ig	10,0%(vol/vol)
Aqua bidest	Ad 1 l
vor Gebrauch filtrieren	

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

Lämmli - Laufpuffer:

Glycerin	14,4g
Tris	3,03g
SDS	10 ml
Millipore Wasser	Ad 1l

M 199/HEPES-Stammlösung:

M199	9,62 g/l
HEPES	15,1, mM
Aqua bidest	Ad 10 l
pH 7,4 einstellen	

Powell-Medium zur Isolierung von Herzmuskelzellen:

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

Puffer A = Kathodenpuffer:

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

Puffer B = einfacher Anodenpuffer:

Tris; 30 mM	3,63 g
Methanol, 20% ; pH 10,4	Ad 1l

Puffer C = 10 facher Anodenpuffer:

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

Reagenz A:

Natrium-Kalium-Tatrat 3,3% (wt/vol)	200 µl
Cu ₂ SO ₄ 1,25% (wt/vol)	200 µl
Na ₂ CO ₃ 2,5% (wt/vol)	19,6 ml

Ripa Puffer (1ml):

Ripa Stocklösung	945 µl
PMSF (0,1 M)	10 µl
EDTA (0,2M)	5 µl
β-Glycerolphosphat (1M)	40 µl

Ripa Stocklösung:

Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P 40	1% (wt/vol)
Deoxycholal	0,5% (wt/vol)
SDS	0,1% (wt/vol)

Sammelgel:

Acrylamid 30%	1,675 ml
H ₂ O Millipore	6,75 ml
Tris 1 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS 10 % (wt/vol)	100 µl
APS 10 % (wt/vol)	100 µl
TEMED	20 µl

Trenngel 10 %:

Acrylamid 30%	6,6 ml
H ₂ O Millipore	8,4 ml
Tris 1 M, pH 6,8	5 ml
SDS 10 % (wt/vol)	200 µl
APS 10 % (wt/vol)	50 µl
TEMED	40 µl

Vorplattiermedium:

CCT-Medium	x ml
FCS	4 %
Streptomycin/Penicillin	2 %

Waschlösung:

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

2.2 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ventrikuläre Herzzellen aus Rattenherzen isoliert. Die Herzen wurden aus drei bis vier Monate alten Wistar-Ratten präpariert, die ein Lebendgewicht von 250-350 g aufwiesen. Die Ratten stammten aus eigener Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Aufzucht der Tiere erfolgte im institutseigenen Tierstall. Die Nahrungsaufnahme, Futter und Wasser, erfolgte ad libitum (Standardfutter: Altromin®).

2.2.2 Präparation der Kardiomyozyten

Die Präparation der Herzen aus den Ratten und die Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgten nach der Methode von Schlüter et al. (2005). Vor der Herzpräparation wurde Powell-Medium in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Während des Erwärmens wurde das Powell-Medium zur Stabilisierung des pH-Wertes mit Carbogen begast.

Das Langendorff-Perfusionssystem wurde mit autoklaviertem Aqua bidest. und folgend mit Powell-Medium gespült. Anschließend wurde die Anlage mit 80 ml Powell-Medium luftblasenfrei befüllt.

Die Ratten wurden unter dem Abzug in einem Glastopf innerhalb von 1-3 Minuten mit Diethylether betäubt. Nach Narkoseeintritt wurden die Ratten per Genickbruch getötet. Der Thorax wurde eröffnet und mit kalter NaCl-Lösung geflutet. Das Herz wurde mit dem Lungenlappen herausgeschnitten und in eine mit 0,9% NaCl-Lösung gefüllte Petrischale gelegt. Gewebe- und Organreste wurden von dem Herz entfernt. Die Aorta wurde hinter dem Truncus brachiocephalicus abgeschnitten. Das Herz wurde an die Perfusionsanlage angeschlossen, indem die Aorta auf eine Glaskanüle der Anlage gestülpt und mit einem Leinenfaden festgebunden wurde. 40 ml des Perfusions-Mediums wurden über die Anlage durch das Herz perfundiert, dadurch wurde das Blut aus dem Herz gespült.

Anschließend wurde Collagenase in das Reservoir der Anlage gefüllt. Das Herz wurde jetzt 25 Minuten mit ca. 50 ml Perfusionslösung reperfundiert. Nach der Reperfusion wurde das Herz so durchgeschnitten, dass die Aorta und die Atria an der Perfusionsanlage hängen blieben. Die Ventrikel wurden auf ein Uhrglas

gelegt und zweimal zur Mitte hin eingeschnitten. Anschließend wurden sie auf eine Teflonscheibe gelegt und im Gewebehacker (Schnittbreite 0,7 mm) längs und quer zu einem Zellbrei zerkleinert.

Dieser Zellbrei wurde dann in einem Teflongefäß bei 37 °C im Wasserbad mit 30 ml Perfusionslösung und Collagenase, für 10 Minuten mit Carbogen begast. Während der Begasung wurde der Zellbrei jede Minute mit einer 10 ml Pipette vorsichtig auf- und abgesogen.

Der Zellbrei wurde dann durch einen mit Nylongase (Porengröße 200 µm) ausgelegten Trichter gefiltert und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen 3 Minuten bei 400 UpM zentrifugiert. Der Überstand, der Endothelzellen und Kollagenase enthält, wurde abgesaugt.

Zu dem Zellpellet wurden 15 ml auf 37 °C erwärmtes Perfusions-Medium mit 100 µl Calciumchlorid (100 mM) gegeben. Die Myozten wurden für 2 Minuten bei 400 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Zellpellet wurden 15 ml Perfusions-Medium mit 200 µl Calciumchlorid (100 mM) gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 Minuten bei 400 UpM) wurden, nach Verwerfen des Überstandes, 15 ml Perfusions-Medium mit 500 µl Kalziumchlorid (100 mM) zugegeben. Die ansteigende Kalziumkonzentration diente einer langsamen Gewöhnung der Myozyten an das Calcium. Die Zellen wurden für 1 Minute bei 300 UpM zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Nach Beendigung erhielt man eine Zellpopulation mit 40-60 % intakten stäbchenförmigen Zellen, die die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten darstellten.

2.2.3 Vorinkubieren der Kulturschalen mit Vorplattiermedium

Am Tag vor der Präparation wurden die Kulturschalen mit Vorplattiermedium im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dieses Vorplattieren war Voraussetzung dafür, dass Myozyten am Kulturschalenboden anheften können. Kurz vor dem Ausplattieren wurde das Vorplattiermedium abgesaugt.

2.2.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die isolierten Kardiomyozyten aus der Präparation wurden umgehend aus dem Reagenzglas in das auf 37°C vorgewärmte Ausplattiermedium überführt. Durch leichtes Schwenken des Gefäßes wurde ein Absetzen der Myozyten auf dem

Gefäßboden verhindert. Möglichst zügig wurde das Medium je nach Versuch auf 1 ml oder 2 ml Kulturschalen ausplattiert und für 1,5 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit hafteten selektiv die funktionsfähigen Myozyten an dem Kulturschalenboden an.

2.2.5 Mediumwechsel der Kardiomyozyten

Nach zwei Stunden wurde das Medium gegen auf 37°C erwärmtes Waschmedium ausgetauscht. Dieses Waschen konnte bei Bedarf ein zweites Mal wiederholt werden. Dadurch entfernten sich die nicht angehafteten und geschädigten Zellen. Die Kardiomyozyten waren jetzt bereit für die Untersuchung spezifischer Signalwege.

2.3 *Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts*

Eine Veränderung der Zellquerschnittsfläche (cross sectional area) diene als Indikator für hypertrophes Zellwachstum. Zum Nachweis der Hypertrophie wurden die Myozyten in 1 ml Zellkulturschalen stimuliert und 24 h bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines inversen Mikroskopes wurden pro 1 ml Schale 30 Zellen bei einer 20-fachen Vergrößerung fotografiert. Zur Ermittlung der Zellquerschnittsfläche wurden die Zellen mittels Adobe Photoshop 5.5 vermessen und der Querschnitt mit der Formel: $\text{Fläche} = \text{Radius}^2 \times \pi$ errechnet.

2.4 *Hypertrophieerfassung durch Bestimmung der Proteinbiosyntheserate*

In hypertrophen Zellen ist die Proteinbiosynthese erhöht. Eine quantitative Bestimmung der Syntheserate ermöglicht die Erfassung der Hypertrophie. Dazu wurden Zellen mit einer mit ^{14}C radioaktiv markierten Aminosäure, Phenylalanin, inkubiert. Phenylalanin wurde von den Myozyten nicht metabolisiert (Morgen et al., 1971). Demzufolge stand die Aminosäure zur Inkorporation in die Polypeptidketten zu Verfügung, die während der Proteinbiosynthese im Translationsschritt entstehen. Die Syntheserate wurde gemessen und auf die Gesamtproteinmenge bezogen (Schlüter et al., 1998).

Zu Beginn des Versuches wurde den Kardiomyozyten nach entsprechender Stimulation 0.05 μCi ^{14}C -Phenylalanin pro 1 ml Zellsuspension zugegeben. Um den Einbau der Aminosäure zu gewährleisten, inkubierten die Zellen dann für 24 h bei 37°C im Brutschrank.

Die Inkubationszeit wurde durch zweimaliges Waschen der Zellen beendet. Anschließend wurde zur Proteinpräzipitation den Zellen 1 ml 10-prozentige Trichloressigsäure zugegeben. Die Fällung erfolgte während 24 h bei 4 °C. Zur Messung wurden 500 μl des Überstandes und 4 ml Szintillationslösung in Vials gegeben, in denen im Flüssigszintillationszähler die vorhandene Radioaktivität gemessen wurde.

Die Messung dieses Überstandes überprüfte die Aufnahme der markierten Aminosäuren in die Kardiomyozyten und deren intrazelluläre Verfügbarkeit (dpm_{pre}). Der Überstand enthielt radioaktiv markierte t-RNA, die sich zwar intrazellulär befand, aber noch nicht in Proteine eingebaut wurde (Schlüter et al., 1998).

Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Zur Lyse wurde zu den Zellen 1 ml NaOH/0,01% SDS gegeben. Sie inkubierten dann für 1,5 h bei 37 °C. Aus diesen Proben wurden jeweils 500 μl des Überstandes mit 4 ml Szintillationslösung in Vials gegeben und im Flüssigszintillationszähler gemessen (dpm_{ink}).

In diesem Überstand wurde nun die Menge an ^{14}C -Phenylalanin gemessen, die in die Proteine eingebaut wurde. Dies entsprach somit der stattgefundenen Proteinbiosynthese.

Rechnerisch ermittelt wurde die Proteinbiosyntheserate mit der Formel (Schlüter et al., 1998) :

$$\text{Proteinbiosyntheserate} = \frac{\text{dpm}_{\text{ink}}}{\text{dpm}_{\text{pre}} \times 24\text{hrs}}$$

dpm ink	=	Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in TCA-präzipitierbare Fraktion
dpm pre	=	Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in TCA-nicht-präzipitierbare Fraktion

Des Weiteren wurden noch 10 μ l des Zellüberstandes benötigt, um die Gesamtproteinmenge zu bestimmen.

2.4.1 Photometrische Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G 250 eingesetzt. Der Farbstoff absorbiert bei 465 nm. Bildet er mit Proteinen Komplexe, absorbiert er bei 595 nm. Die Farbintensität ist somit von der Proteinkonzentration abhängig.

Zur Quantifizierung der Proteine benötigt man eine Eichlösung. Hierfür wurde mit dem Standardprotein BSA, das in 1 N NaOH/0,01% (wt/vol) SDS gelöst wurde, eine Konzentrationsreihe von 0 bis 1 mg/ml in 0,2 mg/ml Schritten hergestellt. 10 μ l des Zellüberstandes und der BSA Standardreihe wurden jeweils mit 200 μ l des Bradford-Reagenz in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Die so vorbereiteten Proben wurden im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Extinktion von 595 nm gemessen.

Mithilfe der Konzentrationsreihe wurde eine Standardgerade berechnet, anhand derer die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt wurde.

2.5 Western Blot

Proteine können aus Proteingemischen mittels Western Blot detektiert und identifiziert werden. Dazu werden die Kardiomyozyten lysiert. Die cytosolischen Proteine liegen dann solubilisiert vor und können im Western Blot detektiert werden.

2.5.1 Präparation der cytosolischen Proteine mittels RIPA

Für ein cytosolisches Proteinextrakt wurden 2 ml Kulturschalen mit ausplattierten Kardiomyozyten benötigt. Die Zellen wurden nach Stimulation dem Brutschrank entnommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. 200 μ l RIPA-Puffer (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer) wurde auf die Myozyten gegeben. Inhalt des Puffers sind Detergentien, die die Zellmembran permeabilisieren, Proteine löslich machen und die Protein-Aggregation verhindern. Weitere Inhaltsstoffe sind Protease-

und Phosphatase - Inhibitoren, die die Proteindegradierung und die De-Phosphorylierung verhindern.

Mit einem Gummischaber wurden die noch adherenten Zellen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt, in das anschließend 5 µl Benzonase und 2 µl Magnesiumchlorid zugegeben wurde. Das Magnesiumchlorid aktiviert die Benzonase. Die Benzonase ist eine Endonuklease, die DNA und RNA abbaut und so der Herstellung nukleinsäurefreier Proteinextrakte dient.

Mittels eines Hand-Homogenisators wurde für ca. 20 Sekunden dieses Zelllysatz zerschlagen. Anschließend ruhte das Zelllysatz für 30 Minuten auf Eis und wurde dann für 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 UpM zentrifugiert. Vorhandene Zellreste bildeten ein Pellet. Der Überstand mit Proteinen wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß pipettiert und konnte sofort weiterverwendet, oder bei minus 80 °C eingefroren werden.

2.5.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge im Lowry Assay

Zur quantitativen Erfassung der Proteinmenge in den einzelnen Proben wurde diese nach Lowry bestimmt. Bei Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford dürfen die Proteinproben kein SDS enthalten, da dies die Ergebnisse verfälschen würde. Des Weiteren ist der Lowry Assay sensitiver. Es können Proteinkonzentrationen bis zu 0,1- 1 µg Protein pro ml gemessen werden.

Für jede Probe und jede Stufe der Verdünnungsreihe wurde ein Reaktionsgefäß vorbereitet. 500 µl des Reagenz A und 50 µl 1N NaOH wurden in jedes Reaktionsgefäß pipettiert.

In die Reaktionsgefäße der Verdünnungsreihe wurden 50 µl der jeweiligen Verdünnungsreihe und als Volumenausgleich 10 µl Probenpuffer gegeben. In die Reaktionsgefäße für die Proben wurde nun 10 µl der jeweiligen Probe und 50 µl destilliertes Wasser zugegeben. Das Wasser diente auch hier zum Volumenausgleich. Anschließend inkubierten die Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur. In dieser Zeit bildeten die Proteine mit den Kupfer 2^{+} -Ionen Komplexe. Danach wurden 100 µl des Folin-Ciocalteu'scher Phenolreagenz zugegeben. Dabei reduzierte das Kupfer das gelbe Folin-Ciocalteu'scher Phenolreagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Alle Proben inkubierten dann für 30 Minuten bei 37°C. Dies unterstützte die Komplexbildung. Danach wurden alle Proben bei

Raumtemperatur für 30 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Von den Überständen wurden 200 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und im Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm gemessen. Anhand der entstandenen Gerade der Verdünnungsreihe wurden die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben, wie bei der Bradford-Methode, rechnerisch ermittelt.

In jeder geernteten Probe befindet sich grundsätzlich eine andere Proteinmenge. Schon während des Ausplattierens der Myozyten können diese nicht in gleicher Anzahl auf die Schale pipettiert werden und es heften auch nicht alle Myozyten an dem Schalenboden an. Für eine exakte Auswertung sollten alle Proben die gleiche Proteinmenge enthalten. Dazu wurde aus der Probe mit der geringsten Proteinmenge das Proben-Volumen bestimmt. Die Proben mit höherem Proteingehalt hatten bei gleicher Konzentration ein geringeres Volumen und wurden mit RIPA-Puffer aufgefüllt, so dass sich das gleiche Volumen und die gleiche Menge Protein in jeder Probe befanden.

2.5.3 Probenaufbereitung für den Western Blot - Lämmli-Färbung

Bei einer Probenmenge von 45 µl pro Probe wurden 15 µl 4 x Lämmli-Puffer und 1,8 µl DTT zu jeder Probe gegeben. Das SDS, welches sich im Lämmli-Puffer befindet, trennt nichtkovalente Bindungen der Proteine, so dass deren Quartär- und Tertiärstrukturen zerstört werden (Henderson et al., 1979).

Des Weiteren befindet sich Glycin im Lämmli-Puffer, das aufgrund seiner hohen Dichte die Proben in die Geltaschen sinken lässt. Das DTT dient der Reduktion von Disulfidbrücken. Dadurch verbleibt an den Proteinen die Sulfatgruppe und die Proteine erhalten eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. So können die Proteine nach angelegter Spannung durch das Polyacrylamid-Gel zur Anode wandern.

Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, was die Denaturierung unterstützt. Danach wurden sie kurz abzentrifugiert. Die Proben konnten nun direkt im Westen Blot eingesetzt oder bei -20°C eingefroren werden.

2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (diskontinuierlich)

Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Größe. In einer diskontinuierlichen Elektrophorese besteht das Gel aus 2 Teilen. Über einem Trenngel wird ein Sammelgel gegossen. Wichtige Bestandteile beider

Gele sind Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid ist ein Monomer, welches zu langen Polymerketten verknüpft wird. Bisacrylamid verknüpft die langen Ketten quer, so dass ein vielporiges Netz entsteht. Durch Hinzufügen des Radikalstarters APS und dem Katalysator TEMED startet die Reaktion (Westermeier, 1990). Das Sammelgel hat eine geringere Acrylamidkonzentration (4%) und einen geringeren pH-Wert (pH-Wert 6,8) als das Trenngel: Acrylamidkonzentration (12 %) (pH-Wert 8,8).

Das Gel wurde zwischen 2 viereckigen Glasplatten gegossen. Dazu wurden am Rand links und rechts längs einer Glasplatte zwei Abstandshalter (Spacer) und als untere Begrenzung ein Gummischlauch gelegt. Die zweite Glasplatte wurde aufgelegt und mit Klammern links, rechts und unten zusammengehalten. Die zusammengebauten Glasplatten wurden senkrecht aufgestellt. Von oben wurde zwischen die beiden Glasplatten bis zu zwei Drittel hoch das Trenngel gegossen. Darauf wurde Wasser gegossen, welches darauf verblieb bis die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen war und eine Austrocknung des Trenngels verhinderte. Nach Abgießen des Wassers wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das flüssige Sammelgel wurde als Abschluß ein Kamm gesteckt.

War das Sammelgel nach ca. 1 h polymerisiert, wurden die Glasplatten mit dem mittig entstandenen Gel in die Elektrophorese-Kammer eingebaut.

Unten und oben wurde in die Kammer Laufpuffer gefüllt, so dass das Gel mit dem unteren Ende ca. 1,5 cm im Laufpuffer stand und oben über dem Gel abschloss. Die durch Entfernung des Kammes entstehenden Taschen wurden mit Laufpuffer durchgespült. Dadurch wurden defekte Taschen sichtbar und vorhandene Gelreste wurden entfernt.

In die so vorbereiteten Taschen konnten nun die Proteinproben mit einer Hamilton-Spritze eingegeben werden. Nicht benötigte Taschen wurden mit 4x Lämmli-Puffer aufgefüllt. In die Randtaschen wurde ein Protein-Marker eingefüllt. Ein Deckel wurde oben auf der Kammer befestigt, der mit einem Anoden- und Kathoden-Anschluss an ein Netzgerät mit 35 Volt angeschlossen wurde.

Nach Anlegen der elektrischen Spannung beginnen die negativ geladenen Proteine durch das Gel zu dem positivem Pol zu wandern.

Die Proteine durchlaufen zuerst das Sammelgel. Durch die geringere Acrylamidkonzentration entsteht ein großporigeres Gel.

Im Sammelgel trennen sich die Proteine nach dem Prinzip der Isotachophorese auf (Westermeier, 1990). Dazu laufen neben den Proteinen noch Leit-Ionen und Folge-Ionen. Kleine, negativ geladene Phosphat-Ionen (Leit-Ionen) aus dem Gel wandern schneller als die Proteine. Glycin (Folge-Ion), welches sich im Elektrodenpuffer befindet, liegt bei einem pH-Wert von 6,8 vorwiegend als Zwitterion vor und läuft durch eine geringe elektrophoretische Mobilität am langsamsten.

Zwischen den Elektroden bildet sich ein Potentialgradient aus. Im Bereich der Ionen mit niedriger Mobilität (Folge-Ion) ist die Feldstärke höher als im Bereich der schnelleren Leit-Ionen. Dadurch bewegen sich alle Ionen mit gleicher Geschwindigkeit. Die Proteine sammeln sich nun zwischen den Leit- und Folge-Ionen an.

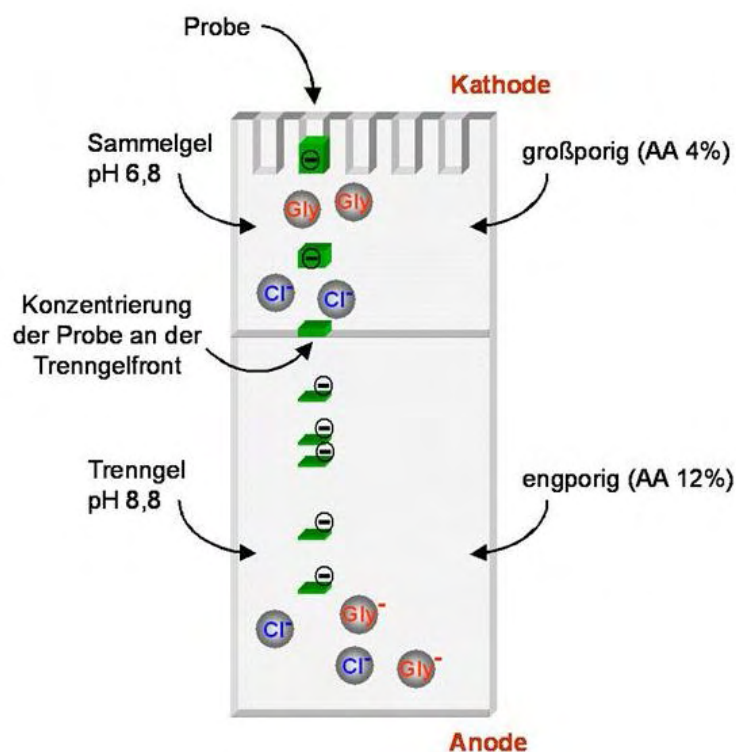


Abbildung 7

Darstellung der elektrophoretischen Proteinauftrennung. Negativ geladene Proteine laufen nach angelegter Spannung zum positiven Pol. Im großporigem Sammelgel stapeln sich die Proteine zwischen den Leit- und Folge-Ionen (staging-Effekt). Im Trenngel werden die Proteine aufgrund des feinmaschigen Porennetz nach ihrer Größe aufgetrennt. (Aus: www.immunbiologie.uni-bonn.de/juergen/MinMap/Uni-Bonn/PAGE.htm)

Proteine, die sich in der Zone mit höherer Mobilität befinden, werden durch die dort herrschende niedrige Feldstärke verlangsamt, bis sie sich in ihrer eigenen Zone einordnen. Befindet sich ein Protein zu weit hinten, wird es aufgrund der höheren Feldstärke nach vorn beschleunigt, bis es eingeordnet ist. In dieser Stapelung (Stacking-Effekt), laufen die Proteine bis zum Ende des Sammelgels. An der Gelgrenze entstehen hohe Reibungskräfte. Die vorderen Proteine laufen langsamer, so dass die Proteinstapel hier noch einmal stark konzentriert werden (siehe Abb. 7). Dadurch entstehen schärfer abgegrenzte Banden, die genauer zu identifizieren sind (Westermeyer, 1990).

Im Trenngel ändern sich der pH-Wert und die Acrylamidkonzentration. Das Porennetz wird feinmaschiger. Glycin liegt nun negativ vor und wandert mit den Phosphat-Ionen schneller als die Proteine durch das Gel. Die Proteine bleiben auf Grund ihrer Größe an unterschiedlichen Stellen im engporigen Gel hängen und können aufgetrennt und nachgewiesen werden.

Wenn die Laufront nach ca. 12 Stunden aus dem Gel ausgewandert war, wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 μm) transferiert.

2.5.5 Blotten der Proteine

Es wurden jeweils 3 Filterpapiere in der Größe des Gels in Schalen mit Kathodenpuffer A, Anodenpuffer B und Anodenpuffer C eingelegt. Zusätzlich wurde die Nitrozellulosemembran in Puffer B eingelegt.

Auf dem Boden der Blotkammer wurden zuerst die 3 Filterpapiere aus Puffer C sorgfältig und ohne Luftblasen ausgebreitet, darauf die 3 Filterpapiere aus dem Puffer B und nachfolgend die Nitrozellulosemembran.

Das Gel wurde aus den Glasplatten genommen. Das Sammelgel wurde abgetrennt. Das Trenngel wurde vorsichtig auf die Nitrozellulosemembran gelegt und darauf abschließend die 3 Filterpapiere aus dem Puffer A.

Der Blotkammerdeckel wurde oben aufgelegt und die Kammer dann für 2 h an das Netzgerät angeschlossen. Die einzustellende Milliampere-Zahl berechnete sich aus der Größe der Nitrozellulosemembran: Pro cm^2 werden hierbei 1,5 Milliampere verwendet.

Nach 2 Stunden wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für einige Minuten in Ponceaurot-S-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde überflüs-

siger Farbstoff mit Wasser abgespült. Da sich der Farbstoff reversibel an unspezifische Proteine anlagert, können so vorhandene, aufgetrennte Proteinbanden dargestellt werden (Der Experimentator, 2006). Mit Kugelschreiber konnten nun die Marker- und Proteinbanden markiert werden. Die Membran kann jetzt getrocknet oder direkt weiter verarbeitet werden.

2.5.6 Immundetektion

In den nächsten Schritten wurde die Membran mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert, die dann mittels Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht wurden. Dazu wurde die Membran in eine Färbeschale gelegt und zweimal für 10 Minuten in Waschlösung geschwenkt. Hierdurch löste sich das Ponceaurot wieder.

Die Membran wurde für eine Stunde in 15 ml 5 prozentigen Magermilchpulver in 1x TBS bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Proteine im Magermilchpulver lagern sich an die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran an, so dass unspezifisches Binden des Antikörpers auf der Membran verhindert wird. Der Hintergrund wird auf der Membran reduziert. Anschließend wurde die Membran noch zweimal für 10 Minuten in Waschlösung geschwenkt und damit überschüssiges Magermilchpulver abgewaschen.

2.5.7 Inkubation der Antikörper

Der erste Antikörper wurde entweder in 10 ml 5 prozentigen BSA oder 5 prozentigen Magermilchpulver meist 1:1000 verdünnt und über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach dieser Inkubation sollten die Antikörper an spezifische Proteine gebunden haben. Die Membran wurde, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, zweimal für 10 Minuten in Waschlösung geschwenkt.

Der Erstantikörper haftete bis jetzt nicht sichtbar an dem Protein. (Antigen/Antikörperbindung). Im folgenden Schritt band ein weiterer, zweiter Antikörper, an den ersten. Dieser ist an HRP (Meerretichperoxidase) gekoppelt. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, welches über Lichtemission detektiert werden kann.

Die Membran wurde dazu für eine Stunde in 10 ml 5 Prozent Magermilchpulver mit 5 µl des zweiten AK (Verdünnung: 1:2000) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran mindestens dreimal für 15 Minuten in der Waschlösung gewaschen.

2.5.8 Detektion der Proteine

Die Membran wurde nun in 1,5 ml ECL-Reagenz, welches das Luminol enthält, für ca. eine Minute schwenkend inkubiert. Die Membran wurde auf eine Glasplatte in das Chemilumineszenz-Aufnahmegerät (CHEMI-SMARTTH 5100) gelegt. In diesem wurde das umgesetzte Luminol über die Chemilumineszenz-Reaktion (als Licht) von einer Kamera aufgenommen und digital erfasst. Die spezifischen Proteine, an die die Antikörper gebunden haben, wurden als Lichtbanden dargestellt. Die Proteine auf der Membran, an die keine Antikörper binden konnten, blieben dunkel. Die Proteinbanden wurden den Markerbanden entsprechend zugeordnet und nach ihrer Kilodalton-Masse identifiziert. Mit dem Computer-Programm Quantity One, wurden die entstandenen einzelnen Bandenintensitäten bestimmt.

2.6 GSK-3β Aktivitätsmessung

Die GSK-3β Aktivität kann mittels einem GSK-3β Aktivitäts Assay Kit nachgewiesen werden. Dazu wurde GSK-3β zunächst immunopräzipitiert. Die immunopräzipitierte GSK-3β wurde mit einem Peptid-Substrat und γ -³²P-ATP inkubiert. Das durch die GSK-3β umgesetzte und inkorporierte ³²P in das Substrat wurde gemessen.

Die Zellen wurden nach entsprechender Stimulation mit Ripa-Puffer geerntet. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Für den Versuch benötigte man 4 verschiedene Ansätze. Ein Ansatz diente der GSK3 β-Aktivität, drei dienten der Kontrolle. Hierbei wurde eine Kontrolle ohne Substrat (Negativkontrolle 1), eine ohne Antikörper (Negativkontrolle 2) und eine mit Inhibitoren (Negativkontrolle 3) eingesetzt.

2.6.1 GSK-3 β Immunopräzipitation

Die Präzipitation erfolgte nach Angabe des Kit-Herstellers: In jedes Reaktionsgefäß wurden 30 μ l EZview Red Protein G Affinity pipettiert. Inhalt dieser Lösung sind kleine Gelperlen, an deren Oberfläche Antikörper mit deren Antigenen binden können. Die Gelperlen wurden zweimal mit 300 μ l eiskaltem 1x-Waschpuffer gewaschen und jeweils anschließend für 30 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert. Zu den so vorbereiteten Gelperlen wurden, außer bei der Negativkontrolle 2, jeweils 2 μ l des anti-GSK-3 β Antikörpers pipettiert.

In allen 4 Reaktionsgefäßen wurde das vorbereitete Zelllysate mit einheitlich definierter Menge an Proteinen zugegeben. Dabei benötigt man mindestens 200 μ g Protein in 300-500 μ l pro Probe. Die Proben inkubierten für drei Stunden bei 2-8°C. Sie sollten in einem Probenmischer (Sample Mixer Dynal®) durch Rotation kontinuierlich leicht bewegt werden. Dadurch wurde die Antikörper-Antigen Bindung an die Gelperlen unterstützt. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert, auf Eis gestellt und mit 500 μ l eiskaltem 1x-Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden sie kurz gevortext und für eine Minute bei 2-8°C geschwenkt. Anschließend wurden die Proben wieder für 30 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaut. Die Gelperlen mit den gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen befand sich im Pellet. Die Gelperlen wurden noch zweimal nach dem eben beschriebenen Verfahren gewaschen.

10 μ l der GSK-3 Inhibitor-Lösung wurde in die Negativkontrolle 3 gegeben, alle anderen Gefäße erhielten 10 μ l 10 % DMSO. Die Proben wurden für einige Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

5 μ l der GSK-3 β Substrat-Lösung wurden, außer in Negativkontrolle 1, in jede Probe pipettiert. In die Negativkontrolle 1 wurde stattdessen 5 μ l destilliertes Wasser pipettiert. Anschließend erfolgten die Substratphosphorylierung und die Detektion. Für den Radioaktiv-Reaktions-Mix wurde folgendes kombiniert:

- 125 μ l Assay Puffer
- 75 μ l 1x-Waschpuffer
- 2,5 μ l γ -P32-ATP

Dieses Volumen reichte für 8-10 Proben. Zu jeder Probe wurden 20 µl des Reaktions-Mixes gegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Proben alle 5 Minuten durch vorsichtiges Klopfen auf dem Boden durchmischt wurden. Die Proben wurden für einige Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert. Nun wurde für jedes Reaktionsgefäß ein vorgestanztes P 81 Cellulose-Phosphat Rechteck vorbereitet und beschriftet. Aus jeder Probe wurden 25 µl des Überstands auf ein Cellulose-Rechteck aufgetragen. Die feuchten Cellulosen wurden für circa eine Minute luftgetrocknet, in eine flache Schale gelegt und mit 0,5% Phosphorsäure durchtränkt. 4-mal wurden die Cellulosen nun mit 0,5% Phosphorsäure für 5-6 Minuten unter vorsichtigem Schwenken gewaschen. Anschließend wurden sie für eine Minute in Ethanol und danach für eine Minute in Aceton gewaschen. Die Cellulosen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Vials gegeben, um im Flüssigszintillationszähler die inkorporierte Radioaktivität zu messen.

2.7 Hoe Assay - Fluorometrische quantitative Bestimmung der Apoptoserate

Zur Differenzierung von intakten, apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten wurden diese mit den Fluoreszenzfarbstoffen, Hoechst 33258 und Propidiumiodid inkubiert. Hoechst 33258 färbt als zellmembrangängiger DNA-Farbstoff das Chromatin der Zellkerne. Anregungswellen für Hoechst 33258 liegen bei 340-360 nm. Die typisch veränderte Chromatinkondensation apoptotischer Zellen wurde durch intensive blaue Fluoreszenz des abgerundeten Kerns sichtbar. In ungeschädigten Zellen ist der Zellkern dagegen länglich und weniger intensiv gefärbt. Propidiumiodid ist kein membrangängiger DNA-Farbstoff und kann nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen. Zellkerne nekrotischer Zellen zeigten durch die Propidiumiodid-Färbung bei Anregungen bei 510-550 nm eine Rot-Fluoreszenz.

Für den Versuch wurden 1 ml Schalen mit ausplattierten Kardiomyozyten wie folgt stimuliert:

1. unstimulierte Kontrolle
2. TAPI-0 (50 μ M)
3. TAPI-0 (50 μ M) 120 Minuten später TGF β (1ng/ml)
4. 120 Minuten später TGF β (1ng/ml)

Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden zu jeder Schale 5 μ l HOE 33258 und 5 μ l Propidiumiodid zugegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. In einem Fluoreszenzmikroskop wurden bei Durchlicht mit 200facher Vergrößerung in zufällig gewählten Gesichtsfeldern alle Myozyten gezählt. Anschließend wurden bei entsprechender Wellenlänge die Anteile apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen bestimmt. Es wurden mehrere Gesichtsfelder gewählt, so dass in jeder Schale 200 Myozyten im Durchlicht gezählt wurden. Der prozentuale Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen wurde auf die Gesamtzellzahl bezogen.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes aus n verschiedene Zellpräparationen dargestellt (n>3). Die Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgendem Tukey-Test analysiert. In Experimenten, bei denen zwei Gruppen verglichen wurden, wurde ein Student's T-Test für gepaarte Proben angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Signifikant verschiedene Gruppen wurden in A, B, C unterteilt. In den Zeitverläufen wurden die verschiedenen Zeiten immer auf die Kontrolle (=100 %) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Matrix Metalloprotease Inhibitoren auf Kardiomyozyten

Matrix Metalloproteasen können das Wachstum verschiedener Zelltypen beeinflussen. Über ihre Wirkung auf das Größenwachstum von Herzmuskelzellen war bisher nichts bekannt. Deshalb sollte die Wirkung von MMP-Inhibitoren auf das hypertrophe Wachstum isolierter ventrikulärer Herzmuskelzellen der adulten Ratte untersucht werden. Es wurden pharmakologische und physiologische Inhibitoren eingesetzt.

3.1.1 Steigerung des Zellwachstums in Kardiomyozyten durch TAPI-0

TAPI-0 ist ein pharmakologischer Inhibitor und wurde gewählt, da er ein breites Spektrum an MMPs hemmt. TAPI-0 inhibiert die MMP-Isoformen, 1, 2, 8, 9, 13, 18. Zusätzlich zu diesen MMPs kann TAPI-0 auch unspezifisch die TNF α -Convertase hemmen.

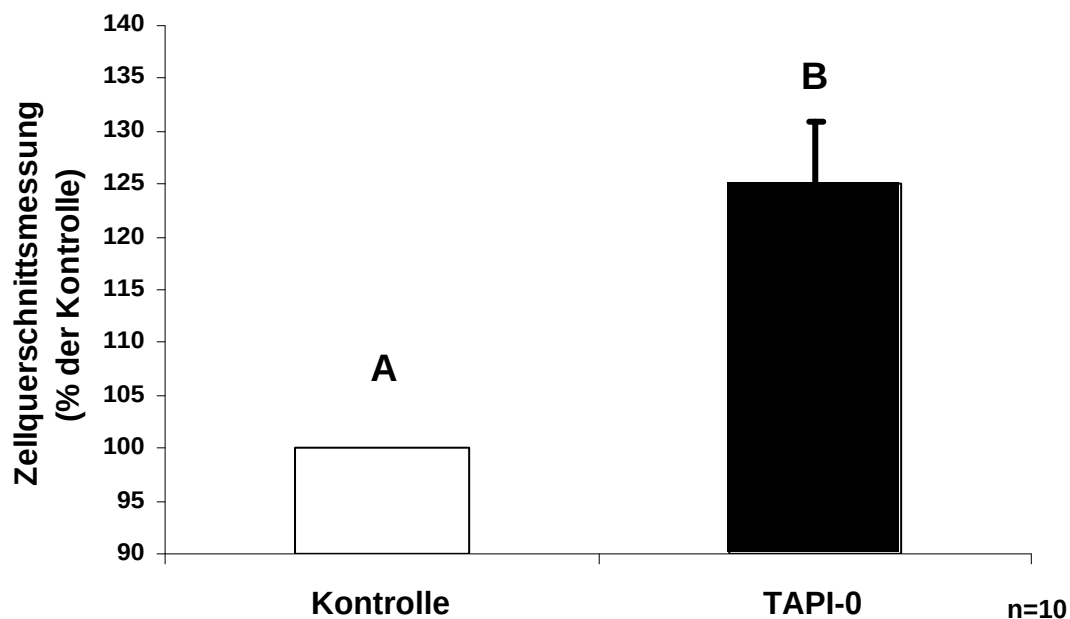


Abbildung 8

Die Kardiomyozyten wurden mit TAPI-0 (50 μ M) stimuliert, die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Zellquerschnittsfläche

gemessen. In TAPI-0 stimulierten Zellen vergrößerte sich der Zellquerschnitt signifikant auf $125 \pm 6 \%$ ($n=10$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

Die Kardiomyozyten wurden mit $50 \mu\text{M}$ TAPI-0 bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zellquerschnittsfläche mikroskopisch bestimmt und ausgewertet. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen wiesen die mit TAPI-0 stimulierten Myozyten eine signifikante Zellquerschnittsvergrößerung von $125 \pm 6 \%$ ($n=10$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) auf.

3.1.2 Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch TAPI-0

Als weiteren Parameter für hypertrophes Wachstum wurde die Proteinbiosyntheserate bestimmt. Dazu wurden die Kardiomyozyten mit $50 \mu\text{M}$ TAPI-0 stimuliert und über 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde durch den Einbau des radioaktiv markierten ^{14}C -Phenylalanins über 24 h bestimmt. Die Proteinbiosynthese in den mit TAPI-0 stimulierten Zellen erhöhte sich signifikant auf $128 \pm 7 \%$ ($n=17$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

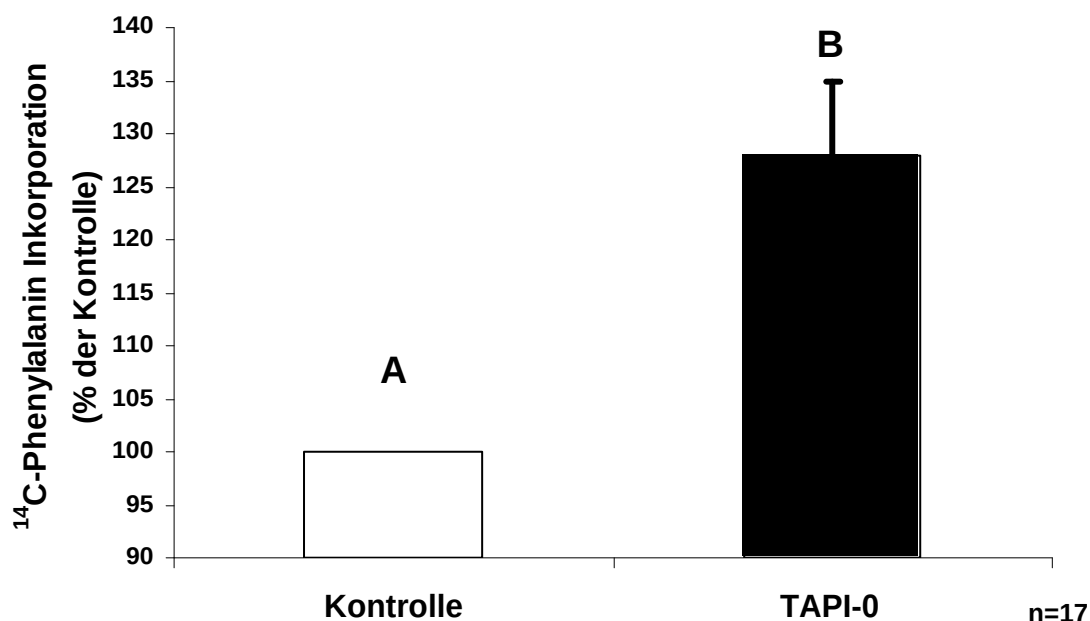


Abbildung 9

Die Kardiomyozyten wurden mit TAPI-0 ($50 \mu\text{M}$) stimuliert, die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Proteinbiosynthese gemessen. In TAPI-0 stimulierten Zellen steigerte sich die Proteinbiosynthese signifikant auf $128 \pm 7 \%$ ($n=17$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.3 Der TNF- α Inhibitor WP9QY erhöht in Kardiomyozyten die Proteinbiosynthese nicht

Da der Inhibitor TAPI-0 neben MMPs auch TNF- α inhibiert, sollte geklärt werden, ob ein TNF- α Inhibitor alleine auch das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten steigern kann. Dies sollte zur Klärung beitragen, inwiefern der hypertrophe Effekt von TAPI-0 nicht durch MMP-Inhibition sondern durch TNF- α Inhibition verursacht sein könnte.

Dazu wurden die Kardiomyozyten mit dem TNF- α Inhibitor WP9QY (25 μ M) stimuliert. Die Zellen inkubierten bei 37°C für 24 h. Die Proteinbiosynthese wurde über den Einbau des radioaktiv markierten 14 C-Phenylalanins bestimmt. In den mit WP9QY stimulierten Zellen ergab sich mit 103 ± 3 % keine erhöhte Proteinbiosynthese ($n=6$, $p>0,05$ vs. Kontrolle). TNF- α Inhibition erhöht demnach nicht das hypertrophe Wachstum in Kardiomyozyten.

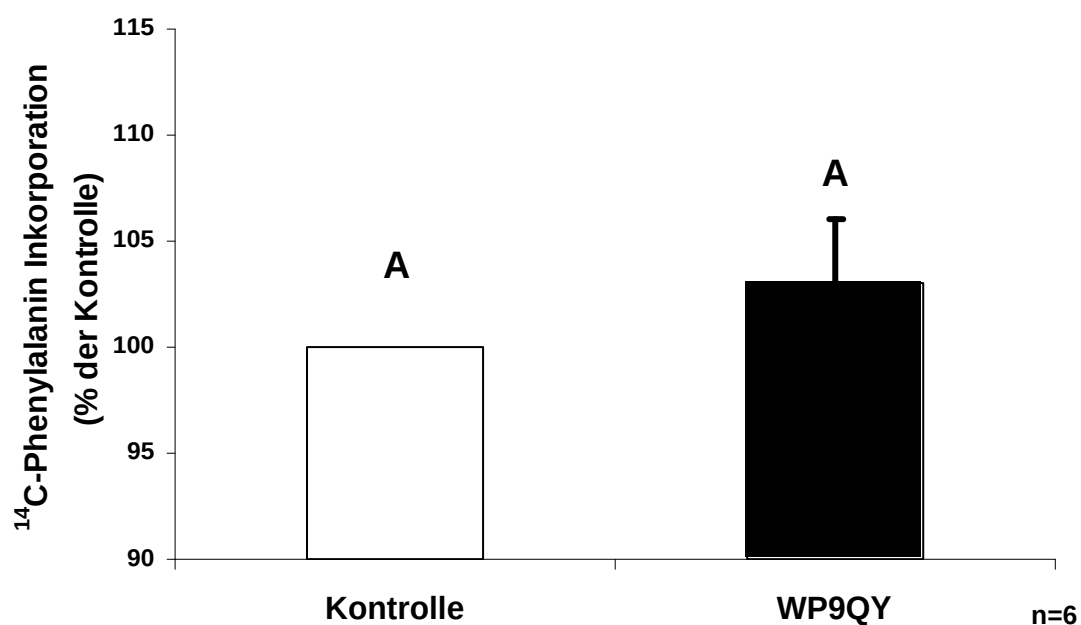


Abbildung 10

Die Kardiomyozyten wurden mit WP9QY (25 μ M) einem TNF- α Inhibitor stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Proteinbiosynthese gemessen. In WP9QY (25 μ M) stimulierten Zellen steigerte sich mit 103 ± 3 % ($n=6$, $p>0,05$ vs. Kontrolle) die Proteinbiosyntheserate nicht signifikant. Der TNF- α Inhibitor induzierte kein hypertrophes Wachstum in Kardiomyozyten.

3.1.4 Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch MMP Inhibitor III

Zusätzlich zu TAPI-0 wurde MMP Inhibitor III als weiterer pharmakologischer MMP-Inhibitor eingesetzt. MMP Inhibitor III inhibiert spezifisch die Matrix Metalloproteasen 1, 2, 3, 7 und 13.

Die Zellen wurden mit 50 μM MMP Inhibitor III stimuliert und bei 37°C für 24 h inkubiert. Die Bestimmung der Proteinbiosynthese erfolgte über den Einbau des radioaktiv markierten ^{14}C -Phenylalanins. In mit MMP Inhibitor III stimulierten Zellen ließ sich eine erhöhte Proteinbiosynthese von $107 \pm 2 \%$ nachweisen ($n=4$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

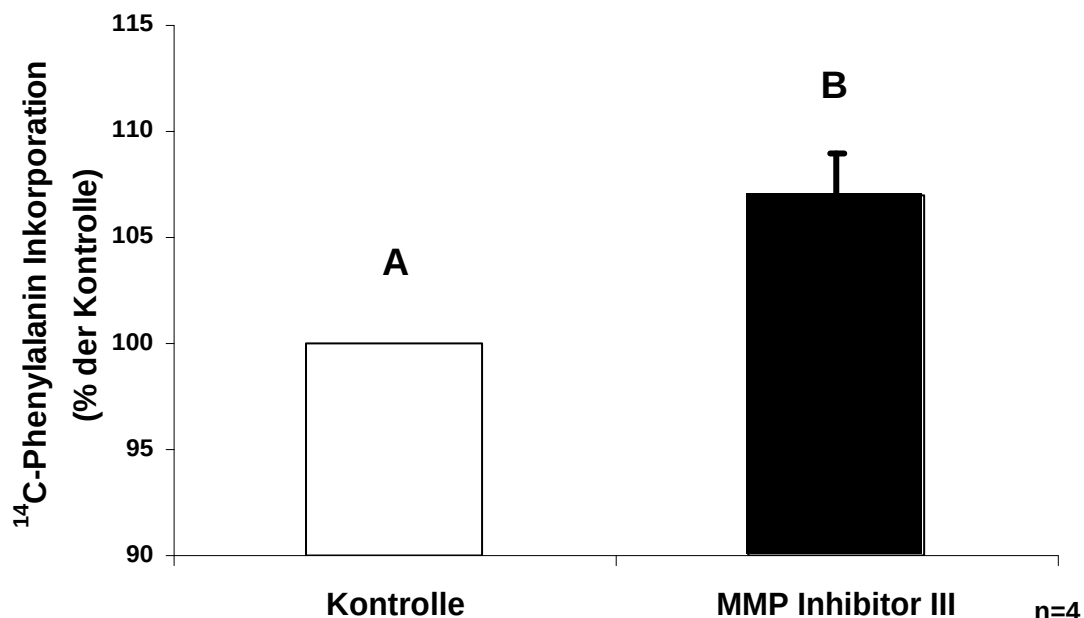


Abbildung 11

Die Kardiomyozyten wurden mit MMP Inhibitor III (50 μM) stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Proteinbiosynthese gemessen. In MMP Inhibitor III stimulierten Zellen steigerte sich die Proteinbiosynthese signifikant auf $107 \pm 2 \%$ ($n=4$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.5 Steigerung der Zellquerschnittsfläche in Kardiomyozyten durch TIMP-2

In einem weiteren Schritt wurden die Myozyten mit einem physiologischen Inhibitor, TIMP-2, inkubiert. TIMP-2 ist ein gewebespezifischer MMP-Inhibitor, der die meisten aktiven MMPs hemmt.

Die Zellen wurden mit rekombinantem TIMP-2 (24 mM) über 24 h bei 37°C inkubiert und mikroskopisch aufgenommen. In der Auswertung ergab sich eine Zellquerschnittsflächenerhöhung auf $117 \pm 3 \%$ ($n=7$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).



Abbildung 12

Aufnahme von ventrikulären Kardiomyozyten nach 24 h Inkubation, links ein unstimulierter Kardiomyozyt und rechts eine mit TIMP-2 (24 mM) stimulierte Zelle.

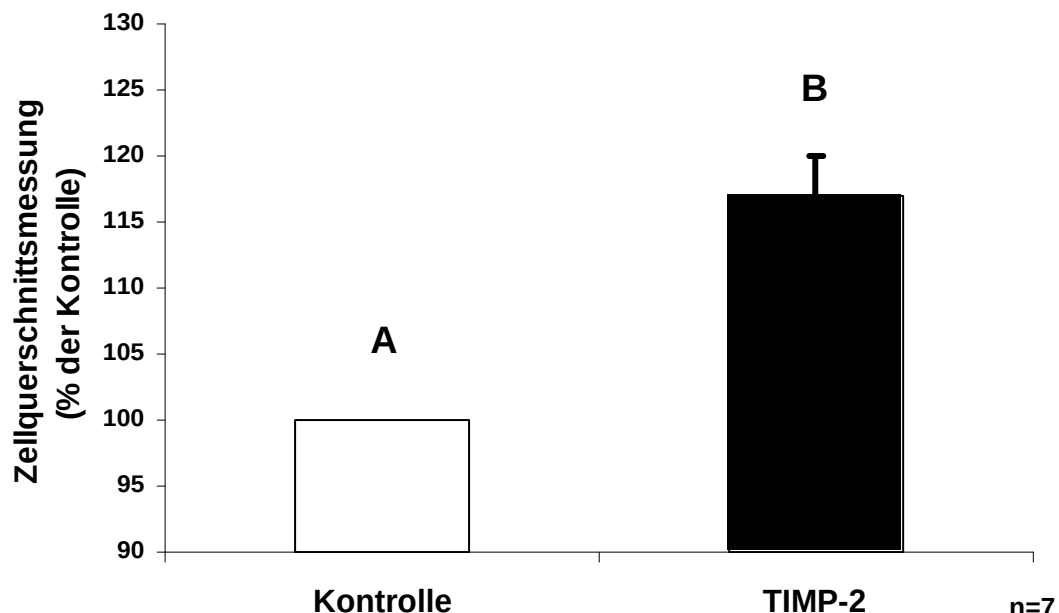


Abbildung 13

Die Kardiomyozyten wurden mit TIMP-2 (24 mM) stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Zellquerschnittsfläche gemessen. In TIMP-2 stimulierten Zellen vergrößerte sich der Zellquerschnitt signifikant auf $117 \pm 3 \%$ ($n=7$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.6 Steigerung der Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten durch TIMP-2

Die Kardiomyozyten wurden mit TIMP-2 (24 mM) über 24 h bei 37°C inkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde über die Einbaurate von ^{14}C -Phenylalanin über 24 h gemessen.

In TIMP-2 stimulierten Kardiomyozyten erhöhte sich die Proteinbiosynthese auf $124 \pm 8 \%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

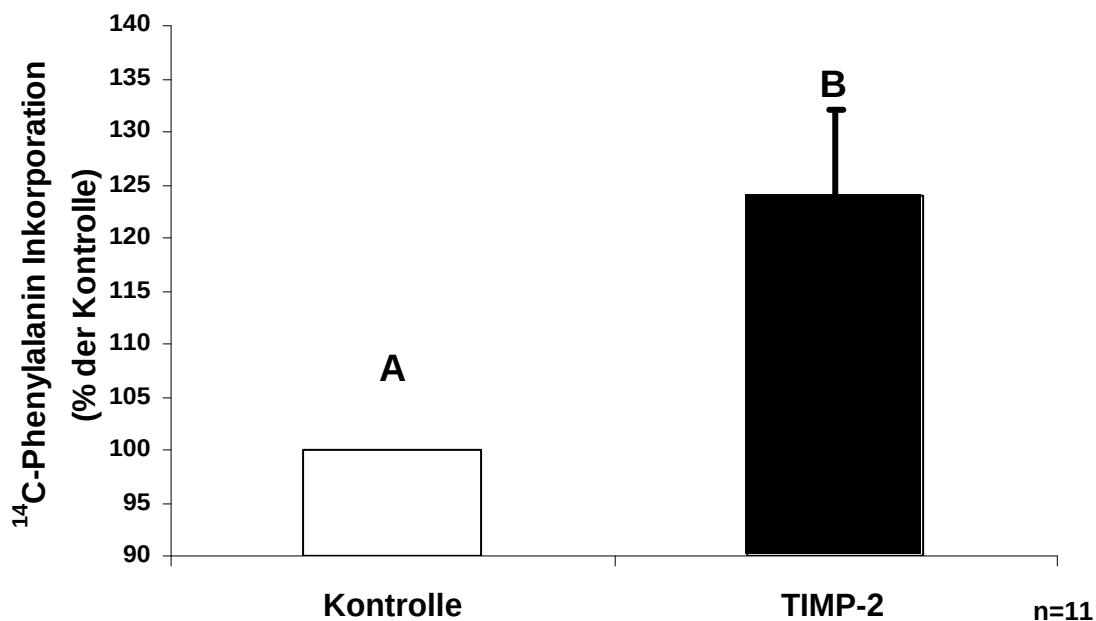


Abbildung 14

Die Kardiomyozyten wurden mit TIMP-2 (24 mM) stimuliert, die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Proteinbiosynthese gemessen. In TIMP-2 stimulierten Zellen steigerte sich die Proteinbiosynthese signifikant auf $124 \pm 8 \%$ ($n=11$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.7 Reduzierung der TAPI-0-induzierten Zellquerschnittsflächenvergrößerung durch Transkriptions- und Translations-Inhibitoren

Die gesteigerte Proteinbiosynthese in TAPI-0 stimulierten Myozyten sollte auf Ebene der Transkription und Translation differenziert werden. Als Translationsinhibitor wurde Cycloheximid eingesetzt, der an die 60S-Ribosomen-Untereinheit bindet und die Translokase hemmt. Actinomycin D, als Transkriptionsinhibitor, hemmt die RNA-Polymerase.

Vier Kardiomyozyten-Schalen wurden wie folgt stimuliert:

- | | | |
|----------------------------|--------------------|----------------|
| 1. unstimulierte Kontrolle | | |
| 2. Cycloheximid (20 µg/ml) | | |
| 3. Cycloheximid (20 µg/ml) | 240 Minuten später | TAPI-0 (50 µM) |
| 4. | 240 Minuten später | TAPI-0 (50 µM) |
-
- | | | |
|----------------------------|--------------------|----------------|
| 1. unstimulierte Kontrolle | | |
| 2. Actinomycin D (5 µg/ml) | | |
| 3. Actinomycin D (5 µg/ml) | 240 Minuten später | TAPI-0 (50 µM) |
| 4. | 240 Minuten später | TAPI-0 (50 µM) |

Die Zellen inkubierten 24 h bei 37°C und wurden dann mikroskopisch aufgenommen, vermessen und ausgewertet. Beide Inhibitoren reduzierten die Zellquerschnittsvergrößerung in TAPI-0 stimulierten Zellen. Die Zellquerschnittsfläche in TAPI-0 stimulierten Zellen betrug $122 \pm 4 \%$ ($n=8$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). In Zellen, die nur mit Cycloheximid stimuliert worden waren, ergab sich mit $107 \pm 4 \%$ ($n=8$, n.s. vs. Kontrolle) keine Zellquerschnittsvergrößerung. In mit Cycloheximid und TAPI-0 stimulierten Zellen reduzierte sich die Zellquerschnittsvergrößerung auf $109 \pm 4 \%$ ($n=8$, n.s. vs. Kontrolle).

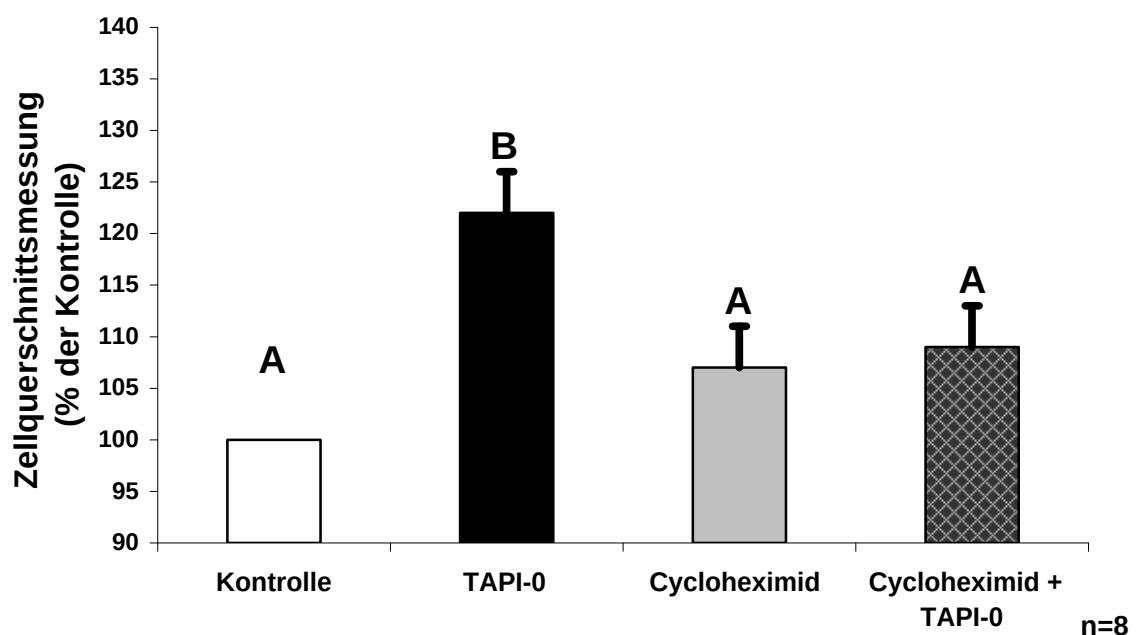


Abbildung 15

In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 µM), nur mit Cycloheximid (20 µg/ml), mit Cycloheximid (20 µg/ml) und nach 4 Stunden

mit TAPI-0 (50 μ M), die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellquerschnittsfläche gemessen. Cycloheximid hemmte signifikant die TAPI-0 induzierte Zellquerschnittsflächenvergrößerung.

Auch Actinomycin D hemmt das hypertrophe Wachstum unter TAPI-0. In TAPI-0 stimulierten Zellen erhöhte sich der Zellquerschnitt auf 124 ± 4 % (n=13, p<0,05 vs. Kontrolle). In Actinomycin D stimulierten Zellen erhöhte sich der Zellquerschnitt mit 108 ± 4 % (n=13, n.s. vs. Kontrolle) nicht. Unter Actinomycin D reduzierte sich der Zellquerschnitt in TAPI-0 stimulierten Zellen auf 110 ± 5 % (n=13, n.s. vs. Kontrolle).

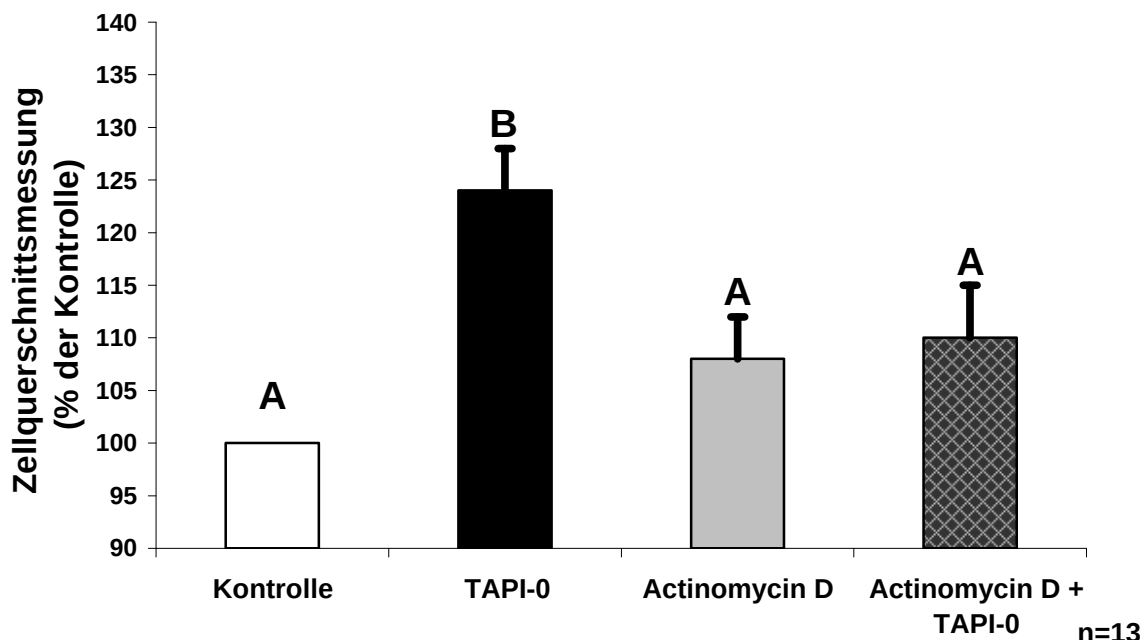


Abbildung 16

In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 μ M), nur mit Actinomycin D (5 μ g/ml), mit Actinomycin D (5 μ g/ml), und nach 4 Stunden mit TAPI-0 (50 μ M). Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellquerschnittsfläche gemessen. Actinomycin D hemmte signifikant die TAPI-0 induzierte Zellquerschnittsflächenvergrößerung.

3.2 Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Hypertrophie durch Inhibition der PI3-Kinase

Ly 294002 und Wortmannin, zwei Inhibitoren der Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3-Kinase), wurden eingesetzt, um eine Beteiligung der PI3-Kinase in dem durch MMPs Inhibition stimulierten hypertrophen Signalweg zu untersuchen.

3.2.1 Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Proteinbiosynthese durch Ly 290042

Vier Kardiomyozyten-Schalen wurden wie folgt stimuliert:

1. unstimulierte Kontrolle
2. Ly 290042 (10 μ M)
3. Ly 290042 (10 μ M) 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)
4. 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)

Die Myozyten inkubierten für 24 h bei 37°C. Die Einbaurate des inkorporierten 14 C-Phenylalanins über 24 h wurde gemessen und ausgewertet. In TAPI-0 stimulierten Zellen steigerte sich die Proteinbiosynthese auf 192 ± 39 % ($n=7$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). Ly 290042 alleine steigerte mit 108 ± 15 % ($n=7$, n.s. vs. Kontrolle) keine Proteinbiosynthese. In Anwesenheit von Ly 290042 konnte TAPI-0 die Proteinbiosynthese mit 91 ± 17 % ($n=7$, n.s. vs. Kontrolle) nicht mehr steigern. Ly 290042 reduzierte die durch TAPI-0 induzierte Proteinbiosynthese.

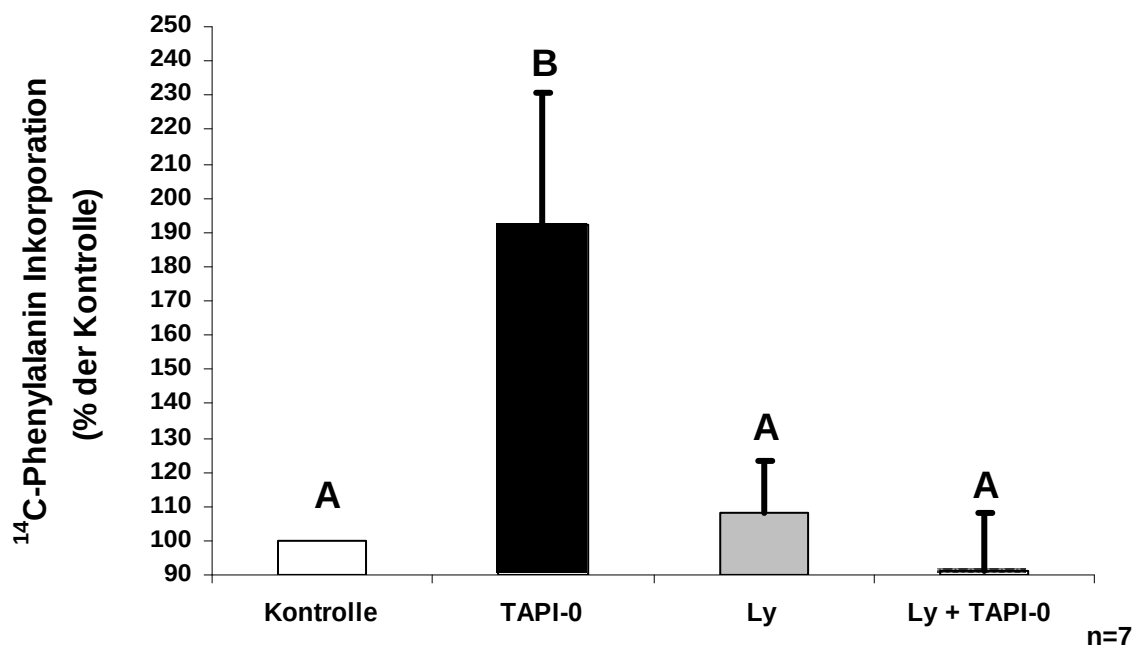


Abbildung 17

In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 μ M), nur mit Ly 294002 (10 μ M), mit Ly 294002 (10 μ M) und nach 4 Stunden mit TAPI-0 (50 μ M). Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinbiosynthese gemessen. Ly 294002 hemmte signifikant die TAPI-0 induzierte gesteigerte Proteinbiosynthese.

3.2.2 Reduzierung der durch TAPI-0 vergrößerten Zellquerschnittsfläche durch Ly 290042

Vier Kardiomyozyten-Schalen wurden wie folgt stimuliert:

1. unstimulierte Kontrolle
2. Ly 290042 (10 μ M)
3. Ly 290042 (10 μ M) 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)
4. 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)

Die Myozyten wurden 24 h bei 37 °C inkubiert, mikroskopisch aufgenommen und ausgewertet. In den TAPI-0 stimulierten Zellen erhöhte sich der Zellquerschnitt auf 130 ± 5 % ($n=10$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). In Zellen, die nur mit Ly 290042 stimuliert worden waren, ergab sich mit 102 ± 2 % ($n=10$, n.s. vs. Kontrolle) keine Vergrößerung des Zellquerschnitts. Die Zellen, die mit TAPI-0 und Ly 290042 stimuliert worden waren, zeigten mit 114 ± 5 % ($n=10$, n.s. vs. Kontrolle) keinen vergrößerten Zellquerschnitt. Ly 290042 reduzierte den durch TAPI induzierten vergrößerten Zellquerschnitt.

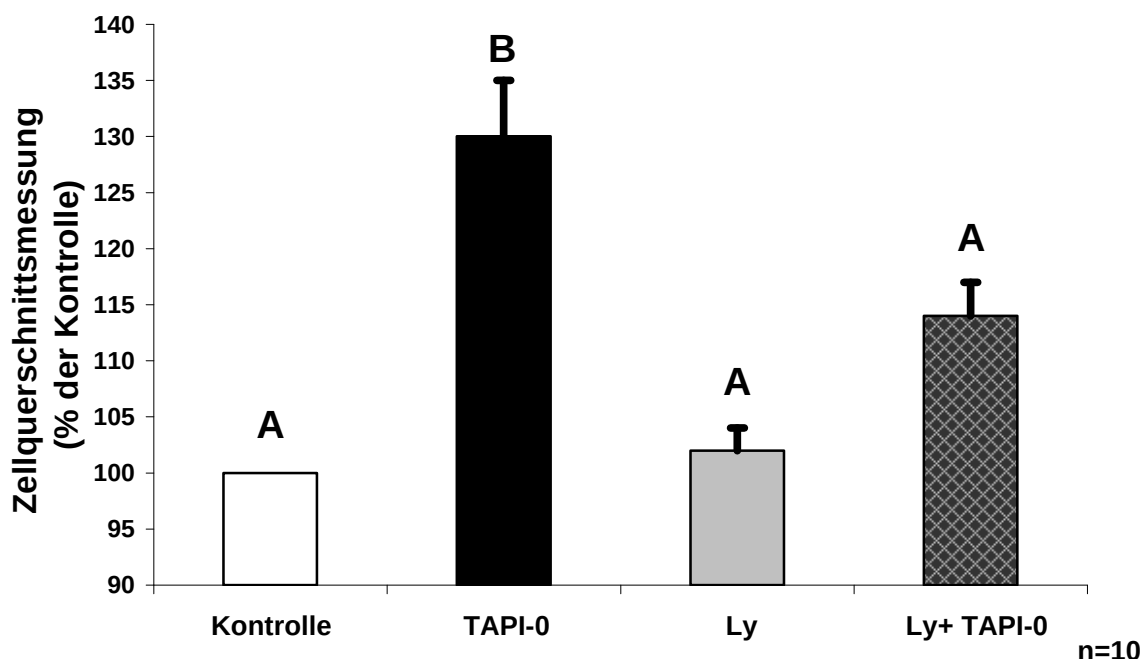


Abbildung 18

In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 μ M), nur mit Ly 294002 (10 μ M), mit Ly 294002 (10 μ M) und nach 4 Stunden mit TAPI-0 (50 μ M), die Kontrollzellen waren unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellquerschnittsfläche gemessen. Ly 294002 hemmt signifikant die TAPI-0 induzierte Zellquerschnittsflächenvergrößerung.

3.2.3 Reduzierung der durch TAPI-0 induzierten Proteinbiosynthese durch Wortmannin

Vier Kardiomyozyten-Schalen wurden wie folgt stimuliert:

1. unstimulierte Kontrolle
2. Wortmannin (10 nM)
3. Wortmannin (10 nM) 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)
4. 240 Minuten später TAPI-0 (50 μ M)

Die Myozyten inkubierten für 24 h bei 37°C. Die Einbaurate des inkorporierten 14 C-Phenylalanins über 24 h wurde gemessen und ausgewertet. In mit TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten steigerte sich die Proteinbiosynthese auf 145 ± 11 % ($n=8$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). In Kardiomyozyten, die nur mit Wortmannin stimuliert worden waren, steigerte sich mit 92 ± 20 % ($n=5$, n.s. vs. Kontrolle) keine Proteinbiosynthese. In Anwesenheit von Wortmannin konnte TAPI-0 die Proteinbiosynthese mit 93 ± 14 % ($n=4$, n.s. vs. Kontrolle) in Kardiomyozyten nicht mehr steigern. Wortmannin reduzierte somit die durch TAPI-0 induzierte Proteinbiosynthese.

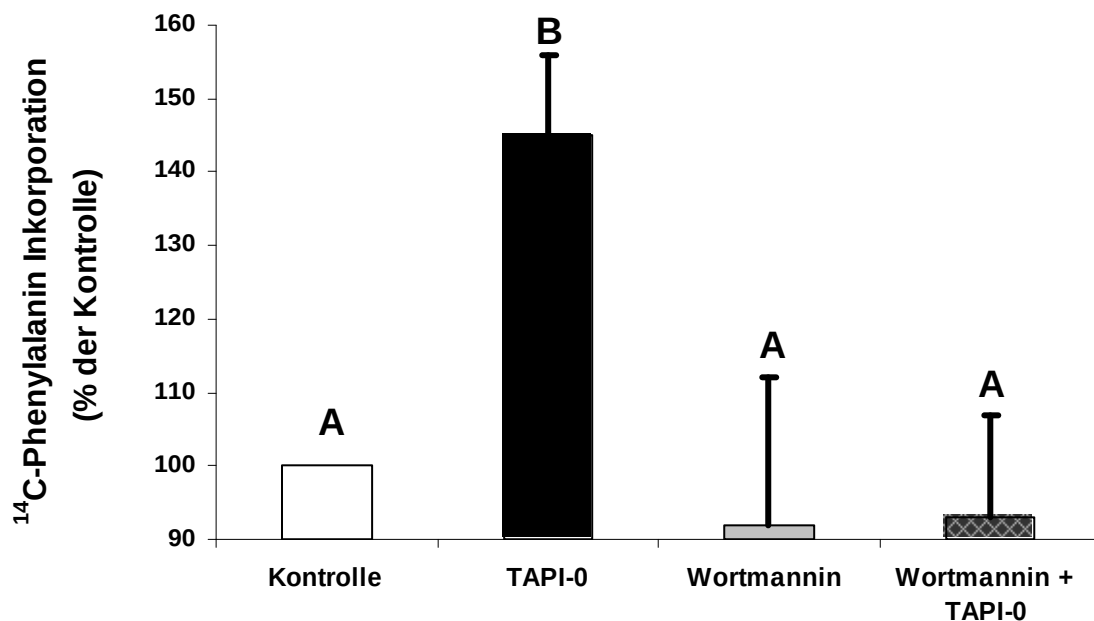


Abbildung 19

In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 μ M), nur mit Wortmannin (10 nM), mit Wortmannin (10 nM) und nach 4 Stunden mit TAPI-0 (50 μ M), die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24

Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinbiosynthese gemessen. Wortmannin hemmte signifikant die TAPI-0 induzierte gesteigerte Proteinbiosynthese.

3.3 Erhöhung der phospho-ERK in TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten

Es ist bekannt, dass der MAPK Signalweg an der Hypertrophieentwicklung in Kardiomyozyten beteiligt sein kann. Es sollte geklärt werden, inwiefern der MAPK Signalweg in TAPI-0 stimulierten Zellen involviert ist. Als Maß für die ERK Aktivierung wurde die Phosphorylierung der ERK im Western Blot bestimmt.

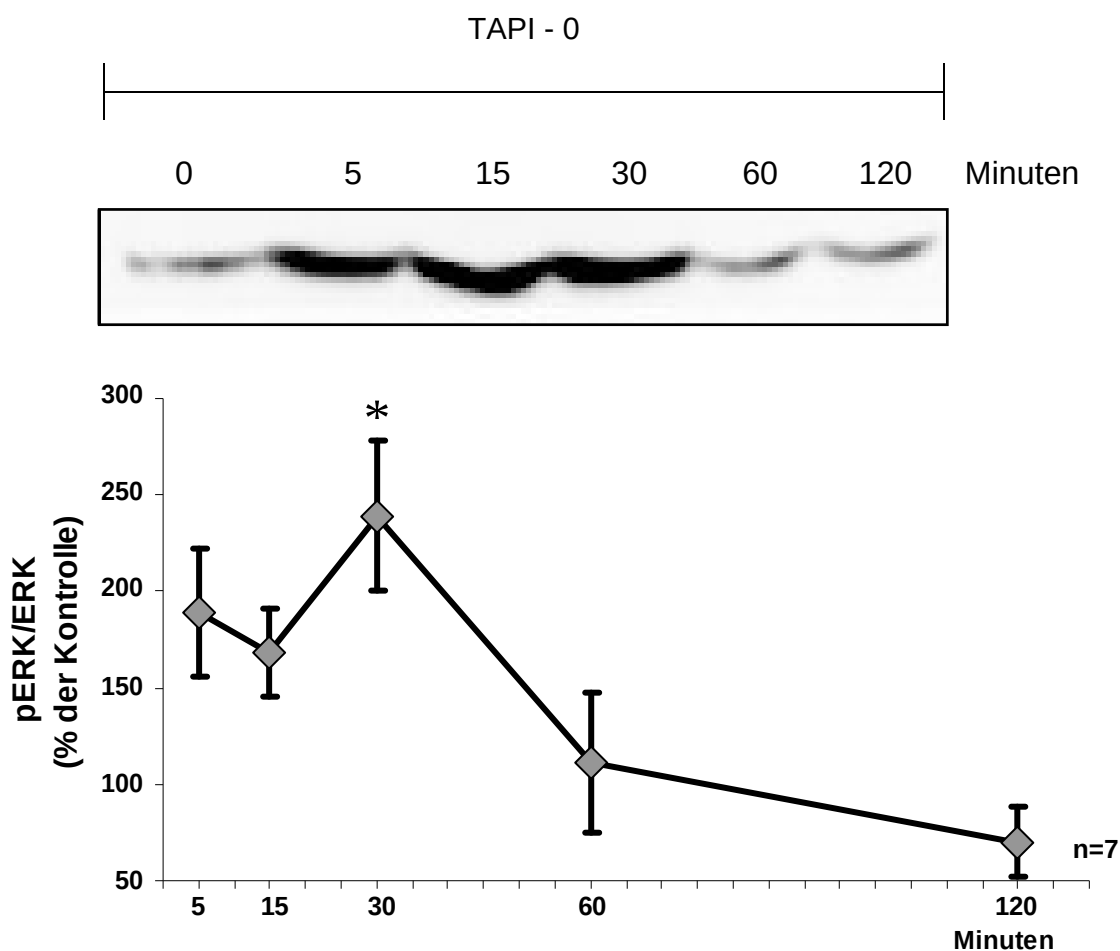


Abbildung 20

Die Kardiomyozyten wurden mit TAPI-0 (50 μ M) stimuliert und zu verschiedenen Zeiten geerntet: Die unstimulierte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 Minuten, die mit TAPI-0 stimulierten Zellen zu den Zeitpunkten 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten. pERK und ERK wurde im Western Blot detektiert. Nach 30 Minuten ist ein signifikanter Anstieg von pERK auf 238 ± 38 % (n=7, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) zu erkennen.

Die Zellen wurden mit TAPI-0 (50 μ M) stimuliert und aufgearbeitet. Es wurden Myozyten nach 6 verschiedenen Zeiten mit Ripa-Puffer geerntet. Die Kontrollprobe wurde zum Zeitpunkt Null geerntet, die TAPI-0 stimulierten Proben wurden nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten geerntet. Um eine ausreichende Menge, mind. 30 μ g pro Probe, zu erhalten, wurden pro Bedingung zwei 2 ml Kulturschalen mit Kardiomyozyten stimuliert und geerntet. Die Proben wurden im Western Blot mit phospho-ERK- und ERK-Antikörpern detektiert. Zur Auswertung wurden die Banden der p-ERK und der ERK jeweils auf die Kontrolle (=100%) bezogen. Die Ergebnisse der p-ERK Banden wurden auf die der ERK Banden bezogen. Bereits nach 5 Minuten ist ein Anstieg von phospho-ERK zu erkennen. Ein signifikanter Anstieg ist nach 30 Minuten auf $238 \pm 38 \%$ ($n=7$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) deutlich sichtbar. Nach 120 Minuten ist die ERK-Aktivierung auf Kontrollniveau zurückgefallen.

3.3.1 Verhinderung der durch TAPI-0 induzierten Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche durch Inhibition der ERK

Die Aktivierung der ERK unter TAPI-0 lässt ihre Beteiligung an dem MMP hypertrophen Signalweg vermuten. PD 98059 ist ein Inhibitor der ERK Kinase. Es soll überprüft werden, inwiefern PD 98059 einen Einfluss auf die durch TAPI-0 ausgelöste Zellquerschnittsflächenvergrößerung hat.

Es wurden Kardiomyozyten in Schalen nach folgendem Schema stimuliert:

- | | | |
|----------------------------|-------------------|---------------------|
| 1. unstimulierte Kontrolle | | |
| 2. PD 98059 (10 μ M) | | |
| 3. PD 98059 (10 μ M) | 60 Minuten später | TAPI-0 (50 μ M) |
| 4. | 60 Minuten später | TAPI-0 (50 μ M) |

Die Schalen inkubierten 24 Stunden bei 37°C und wurden dann mikroskopisch fotografiert und ausgewertet. Die Zellquerschnittsfläche vergrößerte sich in TAPI-0 (50 µM) stimulierten Kardiomyozyten auf 124 ± 4 % ($n=6$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). Unter PD 98059 (10 µM) erhöhte sich der Zellquerschnitt mit 103 ± 3 % nicht ($n=6$ n.s. vs. Kontrolle). In Kardiomyozyten, die mit PD 98059 (10 µM) und 60 Minuten später mit TAPI-0 (50 µM) stimuliert worden waren, reduzierte sich die Zellquerschnittsfläche auf 101 ± 4 % ($n=6$, n.s. vs. Kontrolle).

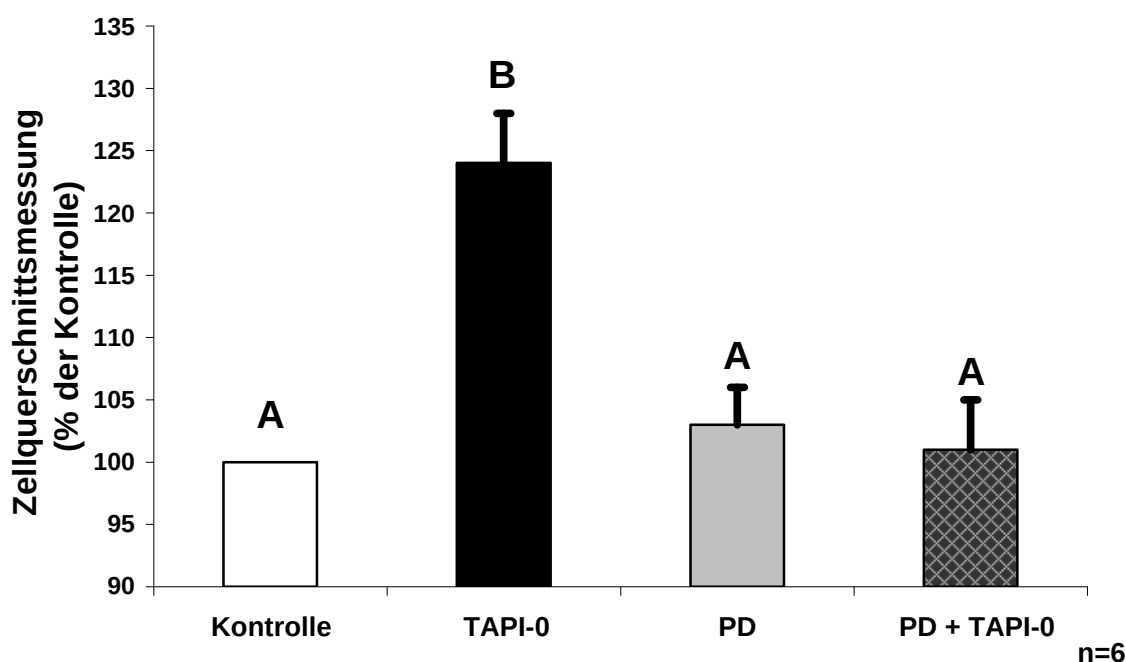


Abbildung 21

In 4 Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 µM), nur mit PD 98059 (10 µM), mit PD 98059 (10 µM) und nach einer Stunde mit TAPI-0 (50 µM), die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellquerschnittsfläche gemessen. PD 98059 hemmt signifikant die TAPI-0 induzierte Zellquerschnittsflächenvergrößerung.

3.4 Inaktivität der GSK-3β in TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten

Die bisherigen Daten deuten auf eine anti-hypertrophe Wirkung von MMPs in Kardiomyozyten hin. Deshalb soll die Aktivität von GSK-3β, als klassischer Hypertrophie-repressor, in TAPI-0 stimulierten Myozyten untersucht werden. Die Aktivität der GSK-3β sollte anhand ihrer Ser-9-Phosphorylierung gemessen werden. Unter Serin-9-Phosphorylierung wird die GSK-3β gehemmt. Die Serin-9-Phosphorylierung wurde im Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden die Myozyten mit TAPI-0 (50 µM) stimuliert. Die Myozyten wurden nach einer

Zeit-Kinetik von 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten mit RIPA-Puffer geerntet. Eine Kontrollprobe wurde nach 0 Minuten geerntet.

Die phospho-GSK-3 β (Ser9) wurde im Western Blot nachgewiesen. In der Zeit-Kinetik ist ein Anstieg der Phosphorylierung an Serin9 und somit eine Hemmung der GSK-3 β unter MMP-Inhibition zu erkennen (Bezogen auf die Kontrolle= 100 %). In Kardiomyozyten, die eine Stunde mit TAPI-0 inkubiert wurden, wird ein signifikanter Anstieg der phospho-GSK-3 β (Ser9) auf 236 ± 33 % sichtbar ($n=9$ $p<0,05$ vs. Kontrolle).

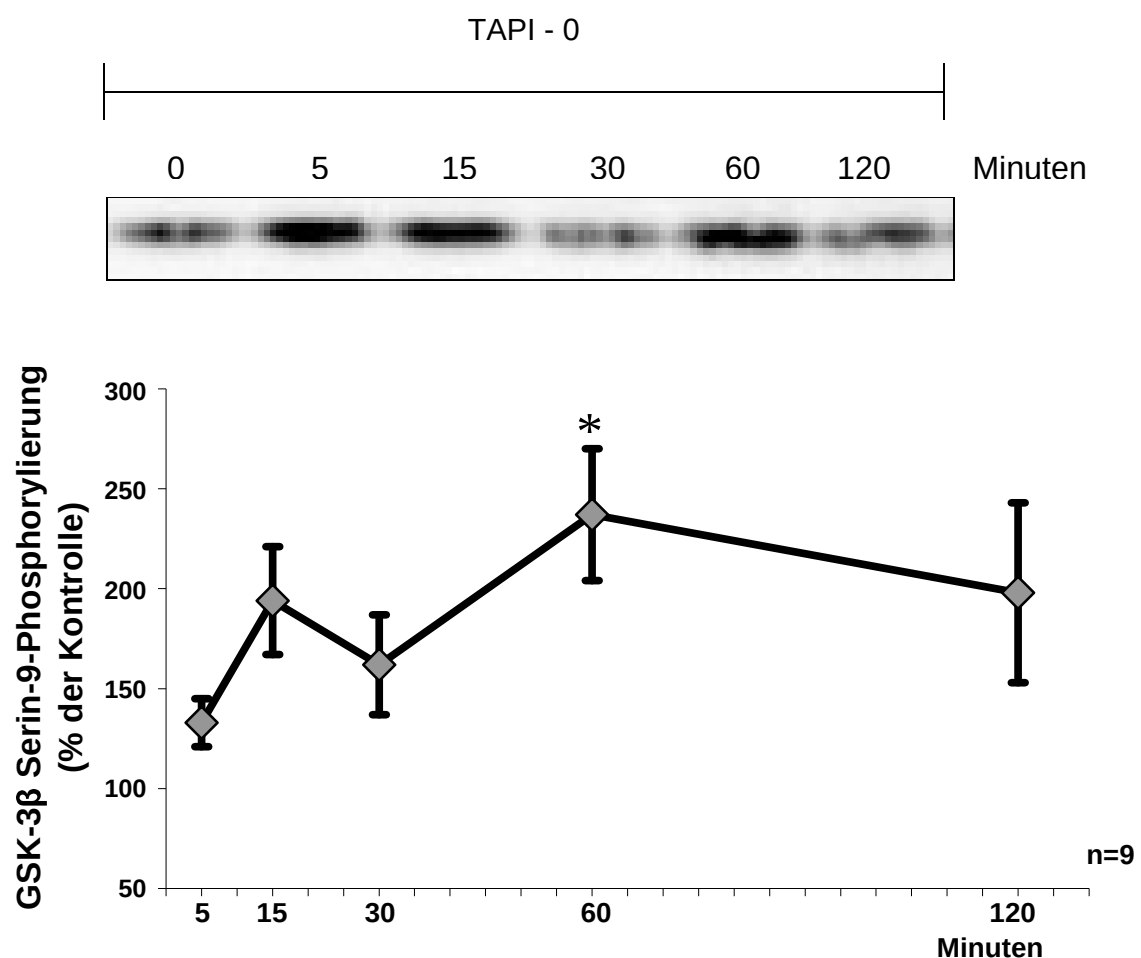


Abbildung 22

Die Kardiomyozyten wurden mit TAPI-0 (50 μ M) stimuliert und zu verschiedenen Zeiten geerntet: Die unstimulierte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 Minuten, die mit TAPI-0 stimulierten Zellen zu den Zeitpunkten 5, 15, 30, 60, 120 Minuten. Phospho-GSK-3 β (Ser9) wurde im Western Blot detektiert. Nach 60 Minuten ist ein signifikanter Anstieg von Phospho-GSK-3 β (Ser9) auf 236 ± 33 % ($n=9$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) zu erkennen.

3.5 Erniedrigung der GSK-3 β Aktivität in TAPI-0 stimulierten Zellen

Zusätzlich wurde die Aktivität der GSK-3 β direkt in einem Aktivitäts Assay gemessen. Dabei wurde der Einbau von radioaktiv markiertem γ -P³²-ATP in ein Substratpeptid der GSK-3 β gemessen. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C mit TAPI-0 (50 μ M) inkubiert und dann geerntet. Die Aktivität wurde mit einem GSK-3 β Aktivitäts Assay nachgewiesen, in dem nach Immunopräzipitation der GSK-3 β die Inkorporation von γ -P³²-ATP in ein Substratpeptid im Flüssigszintillationszähler nachgewiesen wurde. Die GSK-3 β Aktivität erniedrigte sich auf 62 ± 4 % ($n=3$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). Die GSK-3 β Aktivität betrug in den Kontrollmyozyten mit GSK-3 β Inhibitor 4 ± 2 % ($n=3$, $p<0,05$ vs. Kontrolle) und in Kontrollmyozyten ohne Antikörper 10 ± 4 % ($n=3$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

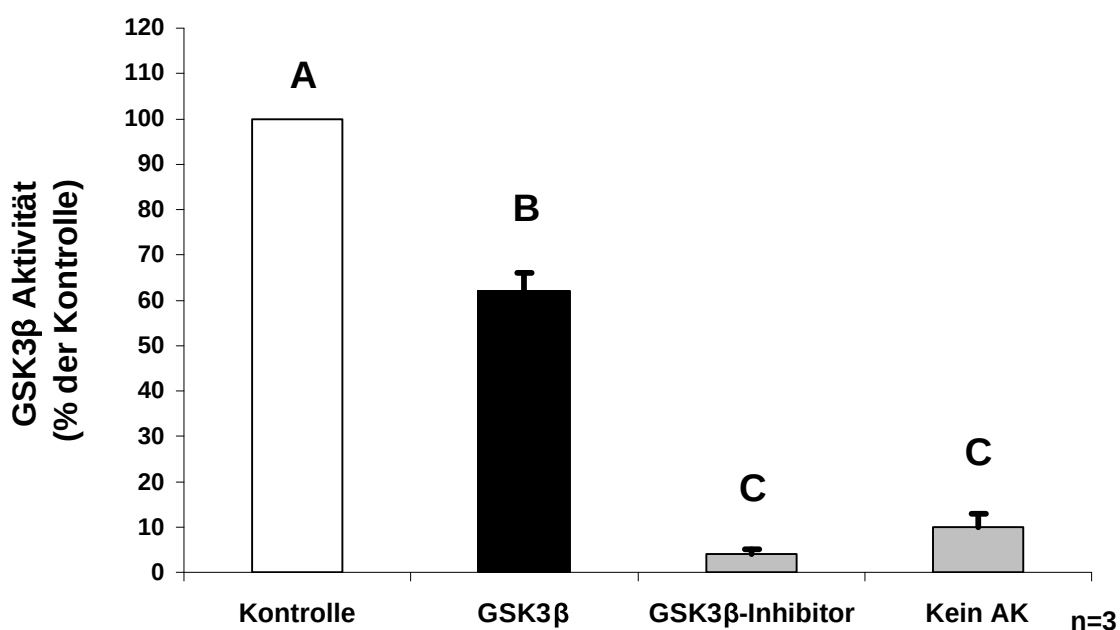


Abbildung 23

Zur Aktivitätsmessung der GSK-3 β wurden die Zellen mit TAPI-0 (50 μ M) stimuliert und nach einer Stunde geerntet. Die GSK-3 β Aktivität erniedrigte sich in TAPI-0 stimulierten Kardiomyozyten auf 62 ± 4 % ($n=3$, $p<0,05$ vs. Kontrolle).

3.6 Reduzierung der TGF β induzierten Apoptose durch TAPI-0

Es sollte überprüft werden, ob Inhibition von MMPs auch Auswirkungen auf Apoptose hat. Es sollte zum einen geklärt werden, ob MMP-Inhibitor selbst Apoptose induziert oder ob es vor Apoptose, ausgelöst durch TGF β , schützen

kann. Dazu wurden die Myozyten zuerst mit TAPI-0 und dann zusätzlich mit TGF β inkubiert.

Es wurden Kardiomyozyten in Schalen nach folgendem Schema stimuliert:

1. unstimulierte Kontrolle
2. TAPI-0 (50 μ M)
3. TAPI-0 (50 μ M) 120 Minuten später TGF β (1 ng/ml)
4. 120 Minuten später TGF β (1 ng/ml)

Die Zellen wurden nach Stimulation und Inkubation mittels Hoe Assay ausgewertet. Die Apoptoserate in Kardiomyozyten, die nur mit TAPI-0 inkubiert worden waren, belief sich auf 97 ± 7 % (n=4, n.s. vs. Kontrolle). In den Kardiomyozyten, die nur mit TGF β inkubiert worden waren, induzierte TGF β eine Apoptoserate von 159 ± 16 % (n=4, p<0,05 vs. Kontrolle). In mit TAPI-0 und TGF β inkubierten Kardiomyozyten, reduzierte sich die Apoptoserate auf 98 ± 16 % (n=4, n.s. vs. Kontrolle). TAPI-0 reduziert somit die TGF β induzierte Apoptoserate.

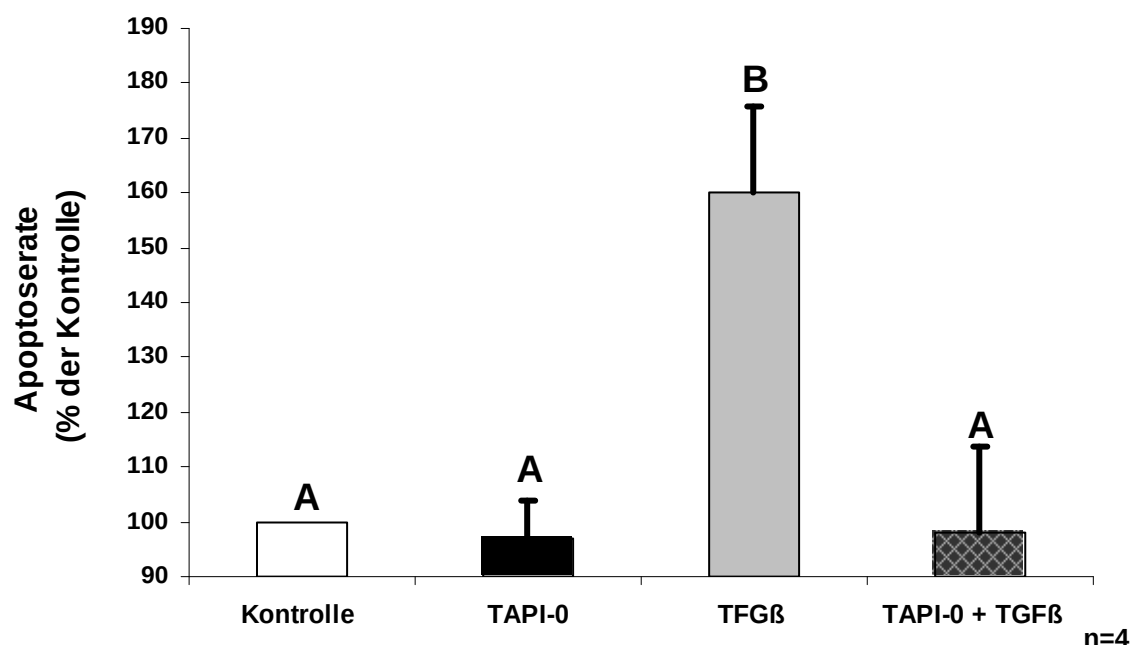


Abbildung 24

Bestimmung der Apoptoserate mittels Hoe Assay. In vier Schalen wurden die Kardiomyozyten unterschiedlich stimuliert. Nur mit TAPI-0 (50 μ M), nur mit TGF β (1 ng/ml), mit TAPI-0 (50 μ M) und nach zwei Stunden mit TGF β (1 ng/ml), die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden sie mikroskopisch ausgewertet. TAPI-0 hemmt die TGF β induzierte Apoptose.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Matrix Metalloproteasen einen anti-hypertrophen Einfluss auf isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten haben. Die Inhibition der Matrix Metalloproteasen, sowohl durch physiologische wie auch durch pharmakologische Inhibitoren, hebt die hemmende Wirkung der Matrix Metalloproteasen auf und induziert hypertrophes Wachstum. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die intrazellulären Kinasen, PI3-Kinase und ERK, unter MMP Hemmung aktiviert sind und zur Hypertrophieentwicklung beitragen. Ferner kommt es unter MMP Hemmung zu einer Inaktivierung des Hypertrophierepressors GSK-3 β . Neben diesen Befunden zur Wirkung von MMPs im Rahmen der Hypertrophie konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von MMPs vor TGF β induzierter Apoptose schützt. Die in dieser Arbeit gezeigte Wirkung von MMPs im Hypertrophiegeschehen erweitert die Kenntnisse zum intrazellulären Wirkungsspektrum der MMPs im Herzen.

4.1 Matrix Metalloproteasen als Repressoren der Herzhypertrophie

Ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte wurden mit verschiedenen Matrix Metalloproteaseinhibitoren inkubiert. Diese Hemmung von MMPs erzeugte hypertrophes Wachstum. Kardiomyozyten, die mit TAPI-0 inkubiert worden waren, wiesen eine signifikant erhöhte Querschnittsfläche und eine erhöhte Proteinbiosynthese auf. Dies deutet darauf hin, dass durch Inhibition von MMPs hypertrophes Wachstum ausgelöst wird. TAPI-0 hemmt neben den MMP-Isoformen der Kollagenasen (MMP-1, 8, 13, 18) und Gelatinasen (MMP-2, 9) auch unspezifisch die TNF α -Convertase. Es wäre deshalb auch denkbar, dass durch unspezifische Hemmung der TNF α -Convertase hypertrophes Wachstum ausgelöst wurde. Um dies auszuschließen, wurde ein TNF- α -Inhibitor ausgewählt, mit dem die Kardiomyozyten inkubiert wurden. Nach Messung ergab sich kein Anstieg der Proteinbiosynthese. Daraus ist zu schließen, dass der TNF- α -Inhibitor WP9QY kein hypertrophes Wachstum induziert. Somit ist

eine Wirkung von TAPI-0 als TNF- α -Inhibitor auszuschließen. Eine Hemmung von Matrix Metalloproteasen durch TAPI-0 und damit induziertes hypertrophes Wachstum ist somit gegeben.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob diese Ergebnisse durch einen weiteren pharmakologischen Inhibitor induzierbar sind. Dazu wurden die Kardiomyozyten mit dem Inhibitor, MMP Inhibitor III, inkubiert. Dieser Inhibitor hemmt die MMP-Isoformen 1, 2, 3, 7 und 13. Die Inkubation der Kardiomyozyten mit MMP Inhibitor III induzierte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Proteinbiosyntheserate.

In einem weiteren Schritt wurde ein physiologischer Inhibitor gewählt, mit dem die Kardiomyozyten inkubiert wurden. Alle vier physiologischen Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP 1-4), hemmen unspezifisch die meisten Isoformen der MMPs. Corcoran et al. (1995) hat durch Inkubation mit TIMP-2 in Hautfibroblasten und im Fibrosarkom Zellwachstum induziert. So lag es nahe, mit diesem Inhibitor Kardiomyozyten zu inkubieren und diese auf ihr Wachstumsverhalten hin zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Inkubation der Zellen mit TIMP-2 hypertrophes Wachstum induziert wird. Aufgrund des ähnlichen Wirkungsspektrums ist anzunehmen, dass auch durch Inkubation der Kardiomyozyten mit TIMP-1, 3 oder 4 gleiche Effekte erzielt würden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass alle eingesetzten MMP-Inhibitoren in Kardiomyozyten hypertrophes Wachstum induzieren. Daraus ist zu schließen, dass sich in Kardiomyozyten aktive Matrix Metalloproteasen befinden, die als Hypertrophierepressoren fungieren und so vor Zellhypertrophie schützen.

Isoformen der Matrix Metalloproteasen, die als Hypertrophierepressoren wirken, sind noch nicht bekannt. Interessant ist aber, dass die Inhibitoren TAPI-0, MMP Inhibitor III und TIMP-2 in der Überschneidung MMP-1, MMP-2 und MMP-13 hemmen. Alle drei Isoformen wurden auch schon im Herzen identifiziert (siehe Abb. 4). Es wäre möglich, dass von diesen drei Isoformen, eine oder mehrere MMPs protektiv als Hypertrophierepressor wirken. Dies ist aber noch nicht untersucht worden.

Mittlerweile gibt es MMP-Isoformen, bei denen intrazelluläre Funktionen in Kardiomyozyten nachgewiesen worden sind. So ist von Kandasamy et al. (2010) MMP-2 in Kardiomyozyten mit intrazellulärer proteolytischer Aktivität lokalisiert

worden. MMP-2 wurde in Mitochondrien, in den Calveolen und auch in dem Zellkern identifiziert und mit Proteinen der Sarkomere kolokalisiert. Interessanterweise wurde für den Inhibitor TIMP-2 mittlerweile festgestellt, dass dieser zwar alle bis jetzt getesteten MMPs inhibiert, aber bevorzugt an MMP-2 bindet. Es wäre somit denkbar, dass unter anderem MMP-2 als Hypertrophierepressor in Kardiomyozyten wirkt. Es ist sicherlich sinnvoll, in weiterführenden Arbeiten insbesondere diese Isoform auf intrazelluläre Aktivität in Bezug auf antihypertrophes Wachstum hin zu untersuchen.

Allerdings sind andere Isoformen als Hypertrophierepressoren nicht auszuschließen. Die Identifikation von MMP-Isoformen, die im Herzen potentiell protektiv als Hypertrophierepressor fungieren könnten, bleibt in weiteren Studien zu analysieren.

4.2 Signalweg der Hypertrophieinduktion unter Matrix Metalloprotease Inhibition

In einem weiteren Schritt wurden die Kardiomyozyten jeweils mit einem Translations- und Transkriptionsinhibitor und anschließend mit TAPI-0 inkubiert. Ziel war es, herauszufinden, ob durch Hemmung der Transkription oder der Translation trotzdem hypertrophes Wachstum induziert werden kann. Als Translationsinhibitor wurde Cycloheximid eingesetzt, das an die 60S-Ribosomen-Untereinheit bindet und die Translokase hemmt. Actinomycin D wurde als Transkriptionshemmer eingesetzt und hemmt die RNA-Polymerase. In den Ergebnissen wurde deutlich, dass beide Inhibitoren in den Kardiomyozyten kein durch TAPI-0 induziertes hypertrophes Wachstum zulassen. Nach Inhibition der Matrix Metalloproteasen benötigen diese die Translation und Transkription, um hypertrophes Wachstum in Kardiomyozyten zu induzieren.

Die intrazellulären Signalwege der hypertrophen Zelle durch α -adrenerge, Angiotensin II und GDF15 Stimulation sind bekannt und zum Teil gut erforscht (siehe Abb.4). Die intrazellulären Signalwege der durch Matrix Metalloproteasen ausgelösten Hypertrophie sind hingegen noch unbekannt. Zur Erforschung dieser, wurden Kinasen ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie in Signalwegen der hypertrophen Kardiomyozyten involviert sind. Sie sollten unter MMP-Inhibition auf Aktivität hin untersucht werden. Als erstes wurde die PI3-

Kinase ausgewählt, da diese unter α -adrenerger Stimulation aktiviert ist (Schlüter et al., 1998). Des Weiteren wird die PI3-Kinase auch über GDF15 (Heger et al., 2010) und Angiotensin II (Ruf et al., 2002) aktiviert. Die Aktivierung der PI3-Kinase über diese Stimuli führt zu einer gesteigerten Proteinbiosynthese. Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass solch eine Kinase an weiteren hypertrophen Signalwegen beteiligt ist. Zur Analyse wurden zwei Inhibitoren der PI3-Kinase, Ly 294002 und Wortmannin, ausgesucht, mit denen die Kardiomyozyten jeweils inkubiert wurden. Im Ergebnis ist zu sehen, dass die durch TAPI-0 induzierte Hypertrophie in Gegenwart der Inhibitoren Ly 294002 und Wortmannin gehemmt wird. Die PI3-Kinase ist durch die Inhibitoren inaktiviert und es kann keine durch TAPI-0 induzierte Hypertrophie entstehen. Somit ist die PI3-Kinase auch in dem durch MMP inhibierten Signalweg involviert. Zur weiteren Untermauerung der Ergebnisse könnte man die PI3-Kinase in TAPI-0 stimulierten Zellen im Western Blot detektieren. Zu erwarten wäre eine Aktivierung der Kinase.

Als weitere, in dem hypertrophen Signalweg involvierte Kinase, wurde die ERK ausgewählt. ERK kann über α -adrenerge Stimulation (Ruf et al., 2002), GDF15 (Heger et al., 2010) und über Angiotensin II (Ruf et al., 2002) aktiviert werden (siehe Abb.4), wobei die Signalwege, in denen die ERK involviert ist, noch differenzierter betrachtet werden sollten. Die Aktivierung über α -adrenerge Stimulation führt über die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer kurzen, transienten (etwa 15 minütigen) Aktivierung der ERK (Ruf et al., 2002). Diese Aktivierung führt allerdings nur zu einer veränderten Genexpression in den Kardiomyozyten und hat keinen Einfluss auf die Hypertrophieentwicklung. Die Stimulation über Angiotensin II führt auch über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer längerfristigen, mindestens 90 Minuten dauernden Aktivierung der ERK. Diese Aktivierung führt zu einer veränderten Genexpression und gesteigerter Proteinbiosynthese (Ruf et al., 2002). Der Signalweg, über den GDF15 die ERK aktiviert, ist noch unklar. Sicher ist jedoch, dass ERK auch hier längerfristig (mindestens 4 Stunden) nach GDF15 Stimulation aktiviert ist und hypertrophes Wachstum induziert (Heger et al., 2010).

Zur Charakterisierung der ERK im Signalweg unter MMP-Inhibition wurde ein bekannter Inhibitor der ERK, PD 98059, eingesetzt. Im Ergebnis wurde deutlich,

dass PD 98059 die TAPI-0 induzierte Hypertrophie signifikant reduziert. Folglich ist ERK an der Hypertrophieinduktion durch TAPI-0 Stimulation beteiligt. Wie bereits diskutiert, lässt die Beteiligung von ERK an der TAPI-0 induzierten Proteinbiosynthesesteigerung eine längerfristige ERK-Aktivierung vermuten. Zur Überprüfung dieser Aussage wurde aus TAPI-0 stimulierten Zellen im Western Blot phospho-ERK detektiert. Nach 30 Minuten Inkubation mit TAPI-0 wurde eine signifikante Erhöhung der ERK nachgewiesen. Folglich wird die ERK über MMP-Inhibition aktiviert und ist in diesem Signalweg involviert. Da diese Aktivierung der ERK erst nach 30 Minuten erhöht ist, gehört sie eher zu den späten Aktivierungen, wie sie unter Angiotensin II und GDF15 Stimulation zu finden ist. Ob die ERK der PI3-Kinase vorgeschaltet ist, wie unter Angiotensin II-Stimulation (Ruf et al., 2002) lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht schließen, kann aber angenommen werden.

Nachdem Kinasen untersucht wurden, die unter Matrix Metalloproteasen Inhibition aktiv sind, soll im nächsten Schritt GSK-3 β untersucht werden. Diese ist als Hypertrophierepressor bereits bekannt. Des Weiteren ist bekannt, dass über die PI3-Kinase die GSK-3 β inaktiviert wird (Hard et al., 2002). Demnach könnte diese Kinase in Herzmuskelzellen, als Repressor im Signalweg der MMP eine Rolle spielen. Nun sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die GSK-3 β in dem Signalweg unter MMP-Inhibition involviert ist. GSK-3 β wird über Serin-9-Phosphorylierung inaktiv. Nach Inhibition durch TAPI-0 ist die hemmende Wirkung der Matrix Metalloproteasen aufgehoben. Falls die GSK-3 β involviert wäre, müsste diese in TAPI-0 stimulierten Zellen, da nun die Repressorfunktion gehemmt ist, ebenfalls inaktiv sein.

In den Ergebnissen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der GSK-3 β Ser9 in den Kardiomyozyten, die nach einer Stunde Inkubation mit TAPI-0 im Western Blot detektiert wurde. Zusätzlich zeigte sich im GSK-3 β Aktivitätsassay eine Abnahme der Aktivität unter TAPI-0. Die GSK-3 β Aktivität ist also in Kardiomyozyten unter TAPI-0 Stimulation reduziert. Somit hat GSK-3 β unter physiologischen Bedingungen in Kardiomyozyten eine Grundaktivität, die das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten unterdrückt. Diese kann durch Matrix Metalloprotease Inhibitoren reduziert werden.

Darüberhinaus wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob die ERK und die GSK-3 β in verschiedenen Signalkaskaden interagieren oder in einer

Signalkaskade hintereinander geschaltet sind. Die Aktivierung der ERK bereits 30 Minuten nach TAPI-0 Gabe und die Inaktivierung der GSK-3 β erst nach 60 Minuten deutet darauf hin, dass aufeinander folgend die ERK und später die GSK-3 β im gleichen Signalweg aktiviert bzw. inaktiviert werden. Es ist jedoch anhand der hier vorgestellten Ergebnisse nicht auszuschließen, dass beide Kinasen unabhängig voneinander über verschiedene Signalwege reguliert werden.

4.3 Apoptosewirkung unter MMP-Inhibition

In dieser Arbeit wurde im Schwerpunkt die durch MMP-Inhibition induzierte Hypertrophie untersucht. Die Beteiligung von MMPs an weiteren intrazellulären Prozessen ist noch weitgehend ungeklärt. Es stellt sich die Frage, inwiefern MMP an der Apoptoseinduktion beteiligt sind. Dementsprechend wurde der Einfluss der MMP-Inhibition auf die Apoptoserate unter basalen Bedingungen und nach Apoptosestimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF β untersucht. In den Zellen, die nur mit TAPI-0 stimuliert worden waren, konnte keine vermehrte Apoptose induziert werden. Die TGF β stimulierten Zellen zeigten deutlich eine vermehrte Apoptoserate. Die Kardiomyozyten, die mit TAPI-0 und TGF β stimuliert worden waren, zeigten eine deutliche Reduktion der Apoptoserate. Der Mechanismus, der zu der verminderten Apoptose führt, ist noch ungeklärt. Es gibt jedoch verschiedene Erklärungsansätze für die Apoptosinhibition unter TAPI-0.

TGF β könnte pro-apoptotische MMPs induzieren, die durch TAPI-0 blockiert werden. Des Weiteren könnten die Wachstumsprozesse, die unter MMP-Inhibition angeschaltet werden, einen negativen Einfluss auf die Apoptoseinduktion haben. So ist die PI3-Kinase, die unter MMP-Inhibition aktiviert wird, als anti-apoptotisches Molekül in Herzmuskelzellen bekannt (Song et al., 2010, Uchiyama et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde als MMP-Inhibitor nur TAPI-0 eingesetzt, der die Isoformen der Gelatinasen und der Kollagenasen hemmt. Es ist deshalb noch nicht geklärt, über welche MMP-Isoformen der Schutz vor Apoptose vermittelt wird. Es ist durchaus möglich, dass an der Apoptosereduktion andere MMP-Isoformen beteiligt sind als an den anti-hypertrophen Effekten. In der Literatur

ist bereits eine Beteiligung von Matrix Metalloproteasen an apoptotischen Vorgängen in Kardiomyozyten beschrieben. Die Inhibition von MMP-2 verhindert eine β -adrenerg induzierte Apoptose in isolierten Kardiomyozyten der adulten Ratte (Menon et al., 2005). MMP-2 wird auch durch TAPI-0 inhibiert. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob sich in weiteren Studien eine Rolle von MMP-2 oder anderen MMP-Isoformen für die Protektion vor TGF β induzierter Apoptose ergibt.

4.4 Bedeutung der Befunde

Bisherige Veröffentlichungen über Matrix Metalloproteasen beschreiben deren Funktion überwiegend als Proteasen, die am Um- und Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Auch am Herzen wirken MMPs als Proteasen, die unter anderem durch Kollagenabbau nach einem Herzinfarkt für strukturell ungünstige Veränderungen sorgen (Spinale et al., 2007). Allerdings lassen sich auch immer mehr intrazelluläre Wirkungen von MMPs in Herzmuskelzellen identifizieren. In einer aktuellen Studie wurde von Kandasamy et al. (2010) gezeigt, dass MMP-2 intrazellulär an sarkomere Proteine in Herzmuskelzellen bindet und hier für den Abbau von Troponin I sorgt (Wang et al., 2002). Dies wirkt sich negativ auf die kontraktile Funktion der Herzzellen aus. Im Weiteren wurde von Menon et al., (2005), gezeigt, dass durch Inhibition von MMP-2 die β -adrenerg induzierte Apoptose in isolierten Herzmuskelzellen der adulten Ratte verhindert wird. Eine Aktivierung der GSK-3 β durch MMPs scheint hier eine protektive Rolle zu spielen.

All diese Befunde belegen negative Effekte von MMPs auf die Herzfunktion. In einer aktuellen klinischen Studie an Herzinfarktpatienten konnte trotzdem nicht die Hoffnung erfüllt werden, durch einen breit wirkenden MMP-Inhibitor (PG-116800) das Remodeling und den Fortschritt einer Herzinsuffizienz zu verhindern (Hudson et al., 2006). Gründe hierfür könnten darin liegen, dass MMPs nicht ausschließlich eine ungünstige Wirkung auf das Remodeling haben.

So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass MMPs Herzmuskelzellen vor Hypertrophie schützen. Unter Einsatz von MMP-Inhibitoren kommt es zum Größenwachstum ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Als Mechanismus konnte eine Reduktion der GSK-3 β Aktivität unter MMP-Inhibition

nachgewiesen werden. GSK-3 β ist bereits als Repressor von hypertrophem Wachstum bekannt (Hard et al., 2002), das heißt in gesunden Herzmuskelzellen sorgt die basale MMP-Aktivität für eine Induktion von GSK-3 β , die das hypertrophe Wachstum der Herzmuskelzelle unterdrückt. Die MMP-Expression stellt somit einen Schutz der Herzmuskelzelle vor zu starkem Wachstum dar.

Neben meinen Befunden, die zeigen, dass der Einsatz breit wirkender MMP-Inhibitoren hypertrophes Wachstum in Herzmuskelzellen induzierten, zeigten Wang und Mitarbeiter 2009, dass die Reduktion der spezifischen MMP-Isoform 7 das hypertrophe Wachstum unter Angiotensin-Gabe unterdrückt. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte MMP-Isoformen pro- und andere anti-hypertroph wirken können. Eventuell ist hierbei auch entscheidend, ob es sich, wie in dieser Arbeit beschrieben, um basal in der Herzmuskelzelle vorkommende MMPs handelt oder ob sie, wie MMP-7 unter Angiotensin-Gabe, zusätzlich induziert werden.

Auch die Wirkung von intrazellulären MMP-Inhibitoren, den so genannten TIMPs, auf das zelluläre Wachstum ist nicht eindeutig. In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass TIMP-1-4 die Proliferation und somit das Wachstum von Zellen, wie z.B. Fibroblasten, positiv beeinflussen (Hayakawa et al., 1992, Corcoran et al., 1995). In Endothelzellen wurde jedoch auch eine negative Wirkung von TIMP-2 auf die Proliferation nachgewiesen (Murphy et al., 1993). Die Wirkung von TIMPs auf das Wachstum von adulten Herzmuskelzellen wurde bislang nicht untersucht. Allerdings konnte in dieser Arbeit nun nachgewiesen werden, dass TIMP-2 hypertrophes Wachstum in Herzmuskelzellen induziert. Da TIMP-2 alle bisher getesteten MMP-Isoformen blockiert, deuten auch diese Befunde darauf hin, dass die breite Inhibition von MMPs ein pro-hypertrophes Signal für das Herz bedeutet. Heutzutage sind mehr als 20 MMP-Isoformen und weitere 4 natürliche Inhibitoren der MMPs, sog. TIMPs, bekannt. Es ist anzunehmen, dass sich eine Differenzierung der Wirkung von MMP-Isoformen nicht nur im Bereich der Hypertrophie, sondern auch in anderen Funktionsbereichen wie der Apoptose oder der Kontraktilität finden wird.

4.4.1 Ausblick

Weiterführende Arbeiten könnten die Isoform-spezifischen Effekte von MMPs auf die kardiale Hypertrophie in adulten Herzmuskelzellen der Ratte genauer charakterisieren. Darüberhinaus sollte auch auf ihre Beteiligung an anderen Vorgängen des kardialen Remodelings wie der Apoptose oder der Kontraktilität eingegangen werden. Des Weiteren könnten die an isolierten Herzzellen identifizierten Mechanismen in einer in vivo Situation überprüft werden.

Breit gestreute Forschung führte zu vielen Therapieansätzen und der Identifizierung mehrerer Signalwege der Hypertrophie. Trotz dieses vielfältigen Wissens ist die Hypertrophie auch heute noch ein Symptom, das sich in einer oft tödlich endenden Krankheit manifestiert. Neue, effektive Therapieansätze sind nur durch ein besseres Verständnis der Pathophysiologie zu erwarten. Die in dieser Arbeit dargestellte, neue, intrazelluläre Funktion von MMPs als Hypertrophie-repressor kann einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Hypertrophieentwicklung leisten.

5 Zusammenfassung

Neben den vielfältigen extrazellulären Funktionen der Matrix Metalloproteasen wird seit Neuerem auch immer mehr über deren intrazellulären Funktionen berichtet. Auch in Herzmuskelzellen wurden MMPs mit intrazellulärer Aktivität identifiziert. Allerdings ist über die Wirkung von MMPs auf kardiale Hypertrophie bisher nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MMPs als Hypertrophierepressoren in Kardiomyozyten wirken. Des Weiteren wurde dargelegt, dass sie eine in den Kardiomyozyten induzierte Apoptose verhindern.

Zur Analyse der Funktionen von MMPs wurden ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte mit Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen inkubiert. Es wurden zwei pharmakologische Inhibitoren, TAPI-0 und MMP Inhibitor III, und ein physiologischer Inhibitor, TIMP-2, eingesetzt.

All diese MMP-Inhibitoren erhöhen signifikant das hypertrophe Wachstum der Herzmuskelzellen. Dies zeigt, dass MMPs unter basalen Bedingungen als Repressoren der Hypertrophie in Herzmuskelzellen wirken. Unter MMP-Inhibition wird die hemmende Wirkung der MMPs aufgehoben und somit auch deren schützende anti-hypertrophe Funktion als Hypertrophierepressor.

Zur näheren Charakterisierung des Signalweges, der unter MMP-Inhibition angeschaltet wird, wurden verschiedene Inhibitoren der Translation und Transkription und auch verschiedene Kinasen eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass für das durch MMP-Inhibition ausgelöste Zellwachstum Transkriptions- und Translationsfaktoren nötig sind. Des Weiteren wurden mehrere Kinasen identifiziert, die in dem hypertrophen Signalweg involviert sind. So wurde die Beteiligung der ERK und PI3-Kinase, an dem hypertrophen Signalweg unter MMP-Inhibition nachgewiesen. Des Weiteren wurde eine Reduktion der GSK-3 β -Aktivität, die als Hypertrophierepressor bereits bekannt ist, unter MMP-Inhibition identifiziert. Die GSK-3 β liegt folglich aktiv in unstimulierten Zellen mit Zellhypertrophie hemmender Funktion vor. Diese wird durch MMP-Inhibition inaktiviert und gibt folglich ein positives Wachstumssignal. Neben diesen

Befunden zur Hypertrophie konnte gezeigt werden, dass MMPs die durch TGF_{β} induzierte Apoptoserate reduzieren.

In dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass Matrix Metalloproteasen an Mechanismen der Hypertrophie und Apoptose der Kardiomyozyten beteiligt sind. Erstmalig konnten MMPs als Hypertrophierepressoren in Herzmuskelzellen charakterisiert werden. Dadurch eröffnet diese Arbeit neue Erkenntnisse bezüglich des intrazellulären Wirkspektrums der Matrix Metalloproteasen in Kardiomyozyten.

6 Summary

For many years matrix metalloproteases are known to be involved in degradation of extracellular matrix proteins. But recently it became evident, that MMPs have intracellular functions, also in cardiomyocytes. However the role of MMPs in hypertrophy signaling in the heart was not known. Therefore, it was the aim of this study to characterize the function of MMPs in hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes.

To analyze hypertrophy we incubated the ventricular cardiomyocytes with matrix metalloproteases inhibitors. We chose two pharmacological inhibitors, TAPI-0 and MMP inhibitor III and one physiological inhibitor, TIMP-2. All three inhibitors increased hypertrophic growth in cardiomyocytes. This shows that MMPs appear under basal culture conditions as a repressor of hypertrophy in cardiomyocytes. If MMPs were inhibited, the repressor function was blocked and hypertrophy was induced.

To characterize the signaling induced by MMP-inhibition, we have chosen inhibitors of translation and transcription and of different kinases. The results show, that for the growth effect transcription and translation factors are needed. In addition I identified several kinases that are involved in this signaling cascade: ERK and PI3-Kinase that are involved in the classical signaling of hypertrophy, also contribute to hypertrophic growth under MMP-inhibition. Furthermore, GSK-3 β which is known as a classical repressor of hypertrophy was shown to be involved in this signaling. Inhibition of MMPs resulted in inactivation of GSK-3 β . That implies that GSK-3 β were acting in unstimulated cells as a repressor of hypertrophy. Thus inhibition of MMPs deactivates this repressor activity and results in hypertrophic growth. We could also see that an inhibition of MMP reduced apoptosis induced by TGF β .

In this study we have shown that matrix metalloproteases are involved in the signaling of hypertrophy and in the apoptosis in cardiomyocytes. For the first time MMPs are now characterized as repressors of hypertrophy in

cardiomyocytes. Therefore, this study adds new aspects to the intracellular functions of matrix metalloproteases in the heart.

7 Literaturverzeichnis

Brodde O.E., Bruck H., Leinweber K.

Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological
Relevance

J. Pharmacol. Sci. 2006; 100: 323-337

Bühling K.J., Lepenies J., Witt K.

Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie

Elsevier Urban und Fischer München und Jena, 2008

Classen M., Diehl V., Kochsiek K.

Innere Medizin, 5. Auflage

Urban und Fischer Verlag München und Jena, 2004

Corcoran Marta L., Stetler-Stevenson William G.

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Stimulates Fibroblast
Proliferation via a cAMP-dependent Mechanism

J. Biol. Chem. 1995; 270: 13453-13459

Creemers Esther E.J.M., Cleutjens Jack P. M., Smits Jos F.M, Daemen Mat
J.A.P.

Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction

Circ. Res. 2001; 89: 201-210

Del Monte F., Butler K., Boecker W., Gwathmey J.K., Hajjar R.J.

Novel Technique of aortic banding followed by gene transfer during
hypertrophy and heart failure

Physiol. Genomics 2002; 9: 49-56

Engelhart W.v., Breves G.

Physiologie der Haustiere

Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 2000

Frey N., Olson E.N.

Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly

Annu. Rev. Physiol. 2003; 65: 45-79

Goldberg G.I., Wilhelm S.M., Kronberger A., Bauer E. A

Grant Gregory A., and Eisen Arthur Z

Human Fibroblast Collagenase

J. Biol. Chem. 1986; 261: 6600-6605

Gross J., Lapière C.M.

Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1962; 48: 1014-1022

Hardt S. E., Sadoshima J.

Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Novel Regulator of Cardiac

Hypertrophy and Development

Circ. Res. 2002; 90: 1055-1063

Hayakawa T., Yamashita K., Tanzawa K., Uchijima E., Iwata K.

Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum

FEBS Lett. 1992; 298(1): 29-32

Heger J., Schiegnitz E., von Waldthausen D., Anwar M.M., Piper H.M., Euler G.

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

J. Cell. Physiol. 2010; Mar 15

- Hein S., Arnon E., Kostin S., Schonburg M., Elsasser A., Polyakova V.,
Bauer E.P., Klovekorn W.P., Schaper J.
Progression from compensated hypertrophy to failure in the
pressure-overloaded human heart: structural deterioration and
compensatory mechanisms
Circulation 2003; 107: 984-91
- Henderson L. E., Oroszlan S., Konigsberg W.
A Micromethod for Complete Removal of Dodecyl Sulfate from
Proteins by Ion-Pair Extraction.
Analytical Biochemistry 1979; 93: 153-157
- Hudson M.P., Armstrong P.W., Ruzyllo W., Brum J., Cusmano L., Krzeski P.,
Lyon R., Quinones M., Theroux P., Sydlowski D., Kim H.E.,
Garcia M.J., Jaber W.A., Weaver W.D.
Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to
prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of
the PREMIER
(Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial.
Am. Coll. Cardiol. 2006; 4;48(1): 15-20
- Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A., Schulz R.
Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury:
beyond the matrix.
Cardiovasc. Res. 2010; 1;85(3): 413-23
- Mathew J., Sleight .P, Lonn E., Johnstone D., Pogue J., Yi Q., Bosch J., Sussex
B., Probstfield J., Yusuf S.; Heart Outcomes Prevention Evaluation
(HOPE).
Reduction of cardiovascular risk by regression of
electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the
angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril Investigators
Circulation 2001; 104(14): 1615-21

Menon B., Singh M., Singh K.

Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes

Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2005; 289(1): C168-76

Morgan H.E., Jefferson L.S., Wolpert E.B., Rannels D.E.

Regulation of protein synthesis in heart muscle. II. Effect of amino acid levels and insulin on ribosomal aggregation

J. Biol. Chem. 1971; 246(7): 2163-70

Mühlberg J., Durie F.H., Otten-Evans C., Alderson M.R., Rose-John S.,

Cosman D., Blaxk R.A., Mohler K.M.

A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor

J. Immunol. 1995; 155(11): 5198-205.

Nagase H., Visse R., Murphy G.

Strukture and function of matrix metalloproteinases and TIMPs

Cardiovasc. Res. 2006; 69(3): 562-73

Owan T.E., Hodge D.O., Herges R.M., Jacobsen S.J., Roger V.L., Redfield M.M.

Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction

N. Engl. J. Med. 2006; 355(3): 251-9

Peivandi A. A., Löffelholz K., Vahl C. F.

Die Signaltransduktion der konzentrischen Myokardhypertrophie

Z. Herz- Thorax- Gefäßchir. 2009; 23: 9-16

Pieper, W.

Innere Medizin

Springer Verlag Heidelberg, 2007

- Pinson A., Schlüter K.D., Zhou X.J., Schwartz P., Kessler-Icekson G.,
Piper H.M.
Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in
cultured adult ventricular cardiomyocytes
J. Mol. Cell. Cardiol. 1993; 25(4): 477-90
- Rehm, H.
Der Experimentator: Proteinbiochemie
Akademischer Verlag, 2006
- Ritter O., Neyses L.
The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure
Trends Mol. Med. 2003; 9: 313-21
- Ruf S., Piper H.M., Schlüter K.D.
Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in
angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in
vitro
Pflügers Arch. 2002; 443(3): 483-90
- Schlüter K.D., Piper H.M.
Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult
ventricular cardiomyocytes
Am. J. Physiol. 1992; 263: H1739-H1746
- Schlüter, K.D.
Untersuchungen zur Regulation der Proteinbiosynthese adulter
ventrikulärer Kardiomyozten durch hormonelle und neurohumorale
Faktoren
Shaker Verlag Aachen, 1998
- Schlüter K.D., Piper H.M.
Regulation of growth in the adult cardiomyocytes
FASEB J. 13 (Suppl.) 1999; 13: S17-S22

Schlüter K.D., Simm A., Schäfer M., Taimor G., Piper H. M.

Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy

Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 1999; 276: 1655-1663

Schlüter K.D., Schreiber D.

Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture

Methods Mol. Biol. 2005; 290: 305-14

Schlüter K.D., Piper H.M., Wenzel S.

The Role of Adrenoreceptors in Mechanotransduction

Cardiac Mechanotransduction

Springer Science+Business Media, LLC, 2007

Simpson P.

Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells in an α_1 adrenergic response

J. Clin. Invest. 1983; 72: 732-738

Sommerville R. P.T., Oblander S.A., Apte S. S.

Matrix metalloproteinases: old dog with new tricks

Genome Biology 2003; 4: 216

Song H.P., Zhang L., Dang Y.M., Yan H., Chu Z.G., Huang Y.S.

The phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway protects cardiomyocytes from ischaemic and hypoxic apoptosis via mitochondrial function

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2010; Jan 17

Spinale F.G.

Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function

Physiol. Rev. 2007; 87(4): 1285-342

Statistisches Bundesamt, Todesursachen gesamt, 2008

Sugden P.H., Fuller S.J., Weiss S.C., Clerk A.

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis

Br. J. Pharmacol. 2008; 153: S137-S153

Uchiyama T., Engelman R. M., Maulik N., Das D.K.

Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning.

Circulation 2004; 109: 3042-3049

Vakili B.A., Okin P.M., Devereux R.B.

Prognostic implications of left ventricular hypertrophy

Am. Heart J. 2001; 141(3): 334-41

Visse R., Nagase H.

Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry

Circ. Res. 2003; 92: 827-839

Wang W., Schulze C.J., Suarez-Pinzon W.L., Dyck J.R., Sawicki G., Schulz R.

Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury

Circulation 2002; 106(12): 1543-9

Wang X., Chow F.L., Oka T., Hao L., Lopez-Campistrous A., Kelly S., Cooper S., Odenbach J., Finegan B.A., Schulz R., Kassiri Z., Lopaschuk G.D., Fernandez-Patron C.

Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist-induced hypertension and cardiac hypertrophy

Circulation 2009; 119(18): 2480-9.

Westermeier, R.

Elektrophorese-Praktikum

VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990

Wiesner E., Ribbeck R.

Wörterbuch der Veterinärmedizin

Gustav Fischer Verlag, 1991

Woessner J.F. Jr.

The family of matrix metalloproteinases

Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994; 732: 11-21

Woessner JF Jr.

MMPs and TIMPs-an historical perspective

Mol. Biotechnol. 2002; 22(1): 33-49

Zimmer H.G.

Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of
protooncogene expression

J. Mol. Med. 1997; 75: 849-859

8 Anhang

8.1 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für seine studentenfreundliche Art.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth für die freundliche Annahme dieser Arbeit und deren Vertretung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität und für die zügige Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Frau Prof. Dr. Gerhild Euler vom Fachbereich Medizin, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität, für die Bereitstellung des Themas, die guten Arbeitsbedingungen, für eine unvergleichbar gute Betreuung und stete Unterstützung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bedanken, da Sie mir die Erfüllung meines Wunsches ermöglichte, eine Doktorarbeit anzufertigen, die sich gleichzeitig mit der Rolle als Mutter vereinbaren ließ.

Frau Dr. Jacqueline Heger für ihre unerschöpflichen Ideen, ihre Geduld, ihre nicht endende Bereitschaft, ihr Wissen weiterzugeben, und für ein unvergleichbar schönes Arbeitsklima.

Mona Priess und Claudia Harjung und allen anderen Doktoranden für eine unvergessliche Doktorandinnenzeit. Es war toll, dass wir so gut harmonierten.

Allen Technischen Angestellten, insbesondere Yvonne Horn, Sergej Kechter, Birgit Störr, Daniela Schreiber und Gudrun Pfeiffer.

Stefan Koberstein möchte ich für die seelische Unterstützung danken, insbesondere für seine unerschöpfliche Geduld und die Betreuung von Antonia.

Insbesondere meiner Tochter Antonia, die mir meinem Leben so viel Glück und Erfüllung schenkt.

Ich danke Kevin Schäfer und Markus Danzer, meinen lieben Freunden, die ich mittlerweile schon mehr als zwei Lebensjahrzehnte kenne, stellvertretend für alle meine Freunde, die immer zu mir gestanden haben und stehen werden. Ihr macht das Leben lebenswert.

Meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums.

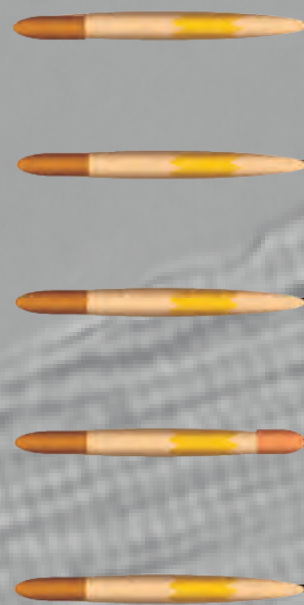
Ich danke allen für die Unterstützung und Hilfe in den letzten Jahren.

8.2 Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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, den 11 Juni 2010

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5540-0



9 783835 955400