

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss des Ubiquitin-Proteasom-Systems
auf das Adaptationsverhalten
neonataler Rattenkardiomyozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pia Leykam
aus Hildesheim

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl
2. Prof. Dr. med. T. Eschenhagen
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 22.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	1
1.1.1	Ubiquitinierung der Substrate	1
1.1.2	Das 26S Proteasom	2
1.1.3	Aufgaben des Proteasoms	4
1.1.4	Selektive Proteasominhibitoren	6
1.1.5	Biologische Effekte der Proteasominhibitoren	7
1.2	Kardiale Adaptation	9
1.3	Trophische Faktoren	10
1.3.1	Wachstumsfaktoren	10
1.3.2	Interaktion von Wachstumsfaktoren	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten	16
2.1.1	Verwendete Materialien	16
2.1.2	Durchführung	16
2.2	Zellkultur und Stimulation mit Wachstumsfaktoren	17
2.2.1	Verwendete Materialien	17
2.2.2	Durchführung der Stimulation	18
2.3	Total RNA Isolation	18
2.3.1	Verwendete Materialien	18
2.3.2	Durchführung	19
2.4	Reverse Transkription	20
2.4.1	Verwendete Materialien	20
2.4.2	Durchführung	20
2.5	DNase Verdau	21
2.6	Real-Time PCR	21
2.6.1	Verwendete Materialien	21
2.6.2	Durchführung	21
2.6.3	Relative Quantifizierung anhand der vergleichenden CT-Methode ($\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode)	23
2.6.4	Primerauswahl und Etablierung der Realtime-PCR	25
2.6.5	Ansetzen der PCR	29
2.7	Protein Extraktion	30
2.7.1	Verwendete Materialien	30
2.7.2	Durchführung	30
2.8	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	31

2.8.1	Verwendete Materialien	31
2.8.2	Durchführung	31
2.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	32
2.9.1	Verwendete Materialien	32
2.9.2	Durchführung	32
2.10	Western Blot Analyse	33
2.10.1	Verwendete Materialien	33
2.10.2	Durchführung	34
2.11	Immunfluoreszenz	36
2.11.1	Verwendete Materialien	36
2.11.2	Durchführung	36
2.12	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Morphologie	39
3.2	Expression der Hypertrophie-markergene in An- und Abwesenheit hypertropher Agonisten	41
3.3	Proteinnachweis von α -smooth muscle actin mittels Western Blot.....	48
3.4	Nachweis der Inhibition des Proteasoms durch relative Quantifizierung polyubiquitinerter Konjugate im Western Blot.....	49
3.5	Darstellung des zellulären Einbaus von α -smooth muscle actin durch Immunfluoreszenzfärbung	51
3.6	Expressionsanalyse der Gene für MyoD und Myogenin mit Hilfe der Realtime - PCR	55
4	Diskussion.....	56
4.1	Morphologische Veränderungen unter Proteasominhibition	57
4.2	Expressionsanalyse von Hypertrophie-markergenen mittels Realtime- PCR	59
4.2.1	Beeinflussung der Expression von Hypertrophie-markergenen durch Inhibition des Proteasoms	59
4.3	Einfluss der Inhibition des Proteasoms auf die Proteinexpression am Beispiel von α -sm actin	67
4.4	Nachweis der Inhibition des Proteasoms	68
4.5	Beeinflussung des zellulären Einbaus von α -sm actin durch die Inhibition des Proteasoms	69
4.6	Beeinflussung der Expression myogener Markergene durch Inhibition des Proteasoms	70
5	Zusammenfassung.....	72
6	Danksagung	74
7	Abkürzungen	75
8	Lebenslauf	79
9	Literaturverzeichnis	81
10	Erklärung	93

1 Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Regulation zellulärer Prozesse wird zum größten Teil über die Veränderung des Konzentrationsgleichgewichts regulatorischer Proteine gesteuert. Sie kann zum einen auf dem Level der Proteinsynthese, zum anderen auf Ebene des Proteinabbaus stattfinden, wobei letzterem eine zunehmend größere Bedeutung beigemessen wird. Infolgedessen spielen proteolytische Systeme eine wichtige Rolle als Regulatoren zellulärer Prozesse.

Das seit den späten 1980er Jahren bekannte (Tanaka et al.'86) Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der wichtigste selektive Proteinabbaumechanismus in Zytosol und Zellkern eukaryotischer Zellen. Es handelt sich dabei um eine große, multikatalytische Protease, die nicht nur für den Abbau von Proteinen mit einer relativ kurzen Lebenszeit, sondern auch für die Degradation langlebiger Proteine, die einen Großteil der zellulären Proteinmasse ausmachen, verantwortlich ist. Die Degradation von Proteinen durch das UPS besteht aus zwei aufeinander folgenden Schritten: zuerst wird das Substrat durch kovalente Bindung einer poly-Ubiquitinkette markiert, im zweiten Schritt erfolgt die Degradation des markierten Proteins durch das 26S Proteasom (Ciechanover '98).

1.1.1 Ubiquitinierung der Substrate

Der Großteil der vom Proteasom prozessierten Substrate wird vorher durch die kovalente Bindung einer poly-Ubiquitinkette markiert. Bei Ubiquitin handelt es sich um ein kleines, etwa 8 kDa großes Protein. Die Bindung eines Ubiquitinmoleküls an das Substrat erfolgt in drei Schritten (s. Abb. 1, zur Übersicht s. Ciechanover '98). Zunächst wird es am C-terminalen Glycin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert, dabei entsteht ein energiereiches Thiolester. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin von einem Ubiquitin-carrier-Enzym (auch Ubiquitin-conjugating-Enzym, E2), über eine Thiolesterbindung an das Substrat gebunden, das spezifisch an eine von vielen verschiedenen Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3) gebunden ist. E3 Enzyme katalysieren die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Substrat. An das bereits konjugierte Ubiquitin werden im Folgenden weitere aktivierte Ubiquitine angehängt. So entsteht eine poly-Ubiquitinkette, die dem Proteasom als Marker bei der Substraterkennung dient. Nach ihrer Abspaltung vom Substrat wird die Ubiquitinkette recycled und wiederverwertet. Dies geschieht mit Hilfe zweier Enzyme, der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase (UCH) und der Ubiquitin-spezifischen Protease (UBP, auch Isopeptidase). Es handelt sich dabei um Thiol-Proteasen, die in der Lage sind, den C-terminalen Ubiquitinrest zu erkennen (Wilkinson et al. '97). Das Ubiquitin-System ist hierarchisch aufgebaut: Es gibt nur ein E1 Enzym, das Ubiquitin für die unterschiedlichen nachfolgenden Konjugationen akti-

viert. Dagegen gibt es verschiedene Isoformen von E2s, die jeweils wiederum mit einer oder mehreren E3 Isoformen interagieren können. Die Zahl der soweit beschriebenen E3 Enzyme ist noch überschaubar, es ist jedoch zu vermuten, dass sehr viel mehr Isoformen existieren, als bisher bekannt sind. Es ist wahrscheinlich, dass jedes E3 Isoenzym für sich in der Lage ist, mehrere verschiedene Substrate, die gewisse strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, zu erkennen. Damit sind die E3 Enzyme wesentlich an der Spezifität des Ubiquitin-Systems beteiligt (Ciechanover et al.). Koeg et al. beschreiben die Existenz eines zusätzlichen Enzyms, E4, das an der Herstellung der poly-Ubiquitinkette beteiligt ist (Koeg et al. '99).

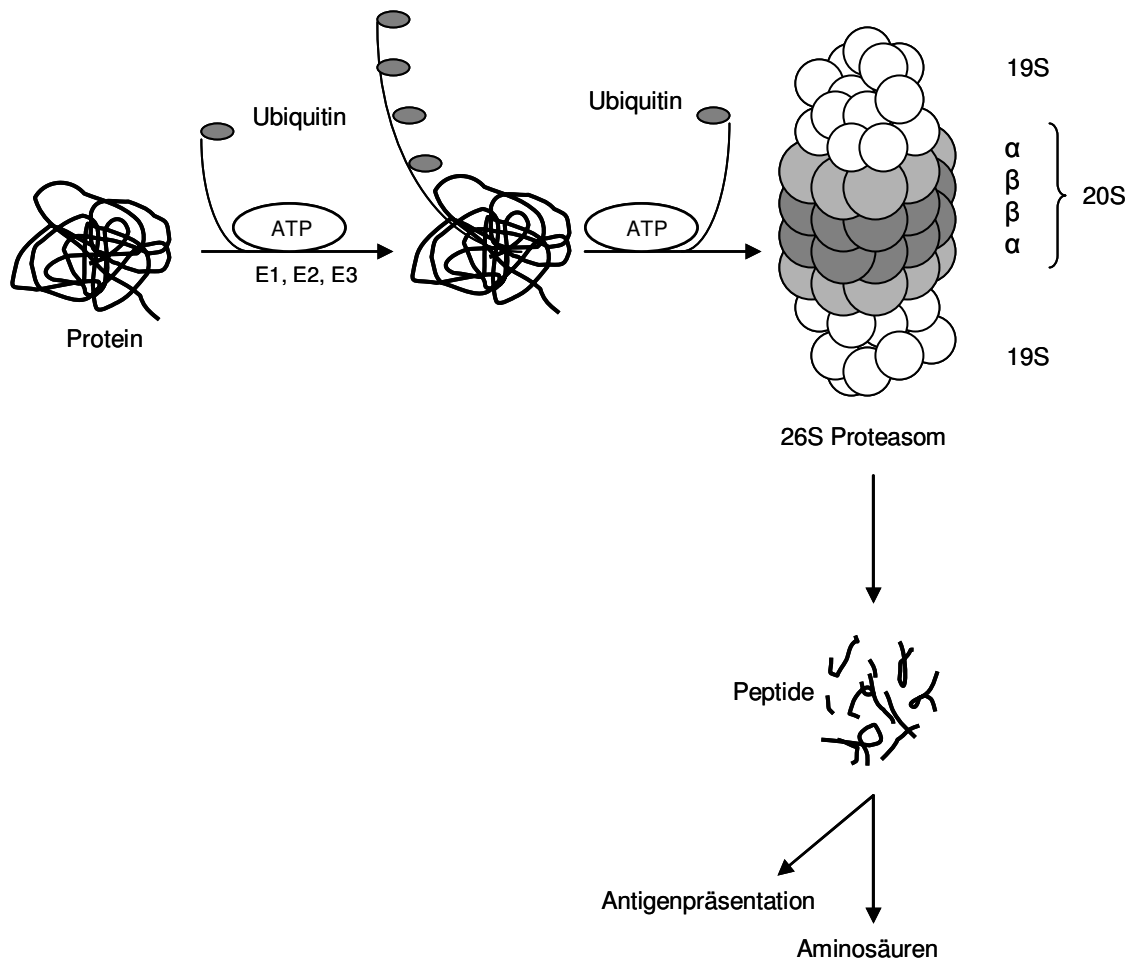


Abb. 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System (nach Lee und Goldberg '98).

1.1.2 Das 26S Proteasom

Das ca. 2000 kDa große 26S Proteasom ist in der Lage, polyubiquitinierte Proteine spezifisch zu erkennen und schnell in kleine, 3-22 Aminosäuren große Peptide zu spalten (Kisselev et al. '99). Es besteht aus dem zentralen 20S Komplex, der eine Größe von 720 kDa hat und das katalytische Zentrum des Systems darstellt, und zwei regulatorischen 19S Komplexen (die auch als PA 700 bezeichnet werden und jeweils 890 kDa groß sind), die jeweils auf einer Seite ATP abhängig an ihn binden. Der 20S Komplex hat die Form eines Hohlzylinders

und ist aus vier übereinander liegenden Ringen, zwei katalytisch inaktiven α - und zwei β -Ringen aufgebaut (siehe Abb. 1). Jeder äußere Ring besteht aus sieben verschiedenen α -Untereinheiten, während die inneren Ringe aus jeweils sieben β -Untereinheiten aufgebaut sind (Baumeister et al. '92). Die katalytisch inaktiven α -Untereinheiten dienen zum einen der Stabilisierung der Ringstruktur des 20S Komplexes, zum anderen spielen sie eine Rolle bei der Bindung der 19S Komplexe. Eukaryote 20S Komplexe weisen sechs katalytische Zentren auf, von denen jeweils drei auf den beiden zentralen β -Ringen liegen. Im Gegensatz zu anderen Proteasen nutzen die proteolytisch aktiven Einheiten des Proteasoms N-terminale Threoninreste der β -Untereinheit als Nukleophile (Kisselev und Goldberg '01). Die aktiven Zentren des Proteasoms unterscheiden sich in ihrer Spezifität und wurden nach ihrer Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteasen benannt. Dabei ist zu beachten, dass diese Namen lediglich Ähnlichkeiten in der Substratspezifität bezeichnen und nichts über die Funktionsweise oder Struktur der katalytischen Einheit aussagen.

Man unterscheidet drei verschiedene proteolytische Einheiten: die Trypsin-ähnliche, die Chymotrypsin-ähnliche und die Caspase-ähnliche Einheit. Die Trypsin-ähnliche proteolytische Einheit, die auf der $\beta 2$ Untereinheit lokalisiert ist, spaltet nach basischen Aminosäuren. Die Chymotrypsin-ähnliche Untereinheit spaltet nach hydrophoben Resten und liegt auf der $\beta 5$ Untereinheit. Die dritte proteolytische Caspase-ähnliche Einheit (früher Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase-ähnliche Einheit) findet sich auf der $\beta 1$ Untereinheit und spaltet Bindungen vornehmlich nach sauren Resten auf. Zusätzlich zu den genannten proteolytischen Aktivitäten gibt es Hinweise auf die Existenz zweier weiterer Peptidase Aktivitäten, die ‚branched-chain amino acid-preferring‘ Aktivität, die vornehmlich hinter Leucinen spaltet und die ‚small neutral amino acid-preferring‘ Aktivität (Orlowsky et al. '93).

Die 19S Komplexe haben die Aufgabe, die Aufnahme von Substraten ins proteolytische Zentrum zu regulieren. Sie bestehen aus einer so genannten ‚base‘ und einem ‚lid‘ (Baumeister et al. '99). Das ‚lid‘ bindet an die poly-Ubiquitinkette der markierten Substrate und spaltet sie ab. Vermutlich ist die Bindung der 19S Untereinheiten an die poly-Ubiquitinkette verantwortlich für die Erkennung der Substrate. Die aus acht Polypeptiden bestehende ‚base‘ enthält sechs homologe ATPasen, die an der ATP abhängigen Öffnung der α -Untereinheiten beteiligt sind, und so den Zugang von Substraten zum katalytischen Zentrum des 20S Komplexes ermöglichen. Nur ungefaltete Proteine können durch die schmale Öffnung der α -Ringe in das Innere des Proteasoms aufgenommen und somit prozessiert werden. Dies gewährleistet neben der notwendigen vorhergegangenen Ubiquitinierung und der ungewöhnlichen räumlichen Struktur des Proteasoms, mit der katalytischen Einheit auf der Innenseite des Komplexes, einen Schutz vor der unspezifischen Verdauung anderer Proteine. Außer mit dem 19S Komplex kann das 20S Proteasom auch mit einem 11S Komplex (auch PA28,

Song et al. '97) assoziiert sein. Die Komplexbindung mit PA 28 ist ATP-unabhängig, der PA 28-20S Komplex kann nur Peptide, aber keine intakten Proteine spalten und muss daher dem 26S Proteasom nachgeschaltet sein.

Es kann die vom 26S Proteasom bereitgestellten Peptide weiter in kleinere Peptide aufspalten und spielt im Rahmen des Antigenprocessings eine wichtige Rolle (Wolf et al. '04). Möglicherweise kommt der PA28 Untereinheit in diesem Rahmen eine regulatorische Funktion zu, indem sie durch eine Veränderung der Peptidaseaktivität des 20S Komplexes die Effizienz des Antigenprocessings erhöht.

So konnte auch die Existenz eines asymmetrischen Proteasoms nachgewiesen werden, das an den verschiedenen Enden des 20S Komplexes einen 19S bzw. PA28 Komplex bindet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass für die effiziente Produktion von Antigen Peptiden ein komplexes Zusammenspiel aus Substraterkennung (19S Komplex) und der regulatorischen Funktion des PA28 Komplexes erforderlich ist (Glickmann et al. '02).

Die vom Proteasom generierten Peptide werden im Cytosol durch andere Peptidasen weiter zu Aminosäuren hydrolysiert oder der Klasse 1-Antigenpräsentation zugeführt (Coux et al. '96).

1.1.3 Aufgaben des Proteasoms

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der Hauptproteinabbaumechanismus in eukaryonten Zellen, es ist für den Abbau zahlreicher zellulärer Proteine verantwortlich und erfüllt eine Vielzahl von unterschiedlichen Aufgaben (zur Übersicht s. Coux et al. '96).

Eine wichtige Aufgabe des Proteasoms besteht im Abbau abnormaler und fehlgefalteter Proteine, die spezifisch erkannt und rasch entfernt werden. Des Weiteren spielt das Proteasom eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse, indem es zum Beispiel am Abbau von Tumorsuppressorproteinen, Transkriptionsfaktoren und deren Inhibitoren, Zellzyklusproteinen (z.B. Cycline) und von Membranproteinen beteiligt ist. Durch den Abbau regulatorischer Proteine nimmt das Proteasom wesentlich Einfluss auf den Zellzyklus. So ist das Ubiquitin-Proteasom-System für den Abbau der Zellzyklusregulatoren Cyclin A, B, D und E und des cyclin-dependent Kinase-Inhibitor p27 verantwortlich und ist so am Fortschreiten des Zellzyklus, insbesondere der S-Phase, beteiligt (Naujokat et al '02). Die Aktivität von cyclin-dependent Kinasen (CDK) wird über die Konzentration ihrer Inhibitoren reguliert, die zur Aktivierung der Kinase durch selektive Proteolyse entfernt werden müssen. Die meisten dieser CDK-Inhibitoren, so auch p21, p57 und p19 werden über das Proteasom abgebaut. CDK Inhibitoren verhindern die Bildung von Cyclin/ CDK Komplexen und führen so als Reaktion auf einen wachstumshemmenden Stimulus zu einer Arretierung des Zellzyklus. Dies spielt zum Beispiel eine entscheidende Rolle bei der terminalen Differenzierung eukaryonten

Zellen. Bei Wachstumsstimulation hingegen wird p27 rasch durch das Proteasom abgebaut. In diesem Zusammenhang ist das Proteasom wichtig als negativer Regulator terminaler Differenzierung, wie zum Beispiel von Fenteany et al. für neuronale Zellen beschrieben, in denen die Inhibition des Proteasoms eine terminale Differenzierung bewirkt (Fenteany et al. '95). Andererseits kann das Proteasom durch den Abbau von p21 und anderen Zellzyklusregulatoren, wie z.B. cyclin D1, eine Differenzierung bestimmter muriner und humaner Zellen induzieren. Auch Id Proteine werden über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Bounpheng et al. '99). Dabei handelt es sich um kleine helix-loop-helix Proteine, die mit der DNA-Bindungsstelle von bHLH-Transkriptionsfaktoren wie z.B. MyoD polymerisieren und so über negative Transkriptionsregulation im Rahmen zellulärer Vorgänge wie Zellwachstum und -entwicklung, Zellzyklus und Differenzierung von entscheidender Bedeutung sind (Norton et al. '98). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass dem Proteasom in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp und äußeren Einflüssen wie Kulturbedingungen o.ä. eine wichtige und komplexe Rolle im Rahmen der zellulären Differenzierung zukommt. Weiterhin gehören kurzlebige regulatorische Proteine, wie z.B. das Tumorsuppressorprotein p53, zu den Substraten des Ubiquitin-Proteasom-Systems. p53 führt, z.B. als Reaktion auf eine DNA-Schädigung, zu einer Arretierung des Zellzyklus, es wirkt antiproliferatorisch und proapoptotisch.

Über die Ubiquitin-Ligase Murine Double Minute Clone 2 (MDM-2) ist das Ubiquitin-Proteasom-System maßgeblich an der Regulation der Aktivität von p53 beteiligt. MDM-2 ermöglicht den Transport von p53 aus dem Zellkern und fördert die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau des Proteins. Dies führt zu einer verminderten Expression negativer Zellzyklusregulatoren, wie dem cyclin-dependent kinase Inhibitor p21, und proapoptotischer Mediatoren wie Bax (Herrmann et al. '04).

Des Weiteren ist das Proteasom über den Abbau von Transkriptionsfaktoren wie c-jun, E2F-1 und β -catenin an der Regulation von Zellwachstum und Genexpression beteiligt (Hershko und Ciechanover '98). Durch die Degradation von Proteinkinasen wie z. B. src und Proteinkinase C wird es für die Beendigung bestimmter Signaltransduktionskaskaden benötigt (Zu et al. '98). Durch den proteolytischen Abbau von I κ B, dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, ist das Ubiquitin-Proteasom-System entscheidend an der Entwicklung einer Entzündungsantwort beteiligt (Palombella et al. '98). Unter anderem über NF- κ B spielt das Proteasom auch eine Rolle bei der Regulation von Zellproliferation auf der einen, und Apoptose auf der anderen Seite, wie sie zum Beispiel im Rahmen der Entstehung einer Artherosklerose vorkommt. In anderen Arbeiten aus unserem Labor an vaskulären glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit einem Proteasominhibitor eine dosisabhängige Proliferationshemmung und eine gleichzeitige Apoptoseinduktion bewirkte. Dieser Effekt ging mit einer verminderten Aktivierung von NF- κ B und einer Erhöhung der Konzentration von p21 und p53 einher (Meiners et al. '02).

Es gibt Hinweise dafür, dass das Ubiquitin-Proteasom-System über den Abbau abnormer Proteine (hier MyBP-C) zum Beispiel auch an der Pathogenese kardialer Erkrankungen wie der hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt ist (Vosberg 2005).

Über den Abbau von Tumorsuppressorgenen und anderer Regulatorproteine (s.o.) spielt das Proteasom eine Rolle bei der Tumorentstehung. Durch die Prozessierung von Klasse 1 MHC Antigenen, die der Antigenpräsentation zugeführt werden, ist es essentiell für die Ausbildung einer Immunantwort (Rock und Goldberg '99). So hat das Ubiquitin-Proteasoms-System über Ubiquitin-Ligasen der Cbl Familie auch eine entscheidende Funktion bei der Regulation von T-Zell Rezeptoren und dem CD28 Signaltransduktionsweg (Rudd et al. '00).

1.1.4 Selektive Proteasominhibitoren

Mit der Identifizierung von Substanzen, die in der Lage sind, selektiv die Funktion des Proteasoms zu blockieren, wurde die Erforschung des Ubiquitin-Proteasom-Systems wesentlich erleichtert. Obwohl das Proteasom mehrere katalytische Zentren enthält, genügt die Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Einheit, um den Proteinabbau auf ein Minimum zu reduzieren, da diese Einheit einen Großteil der enzymatischen Aktivität ausmacht, und somit den limitierenden Faktor bei der Proteindegradation darstellt (Rock et al. '94). Es zeigte sich, dass die Inhibition der Trypsin- bzw. Caspase-ähnlichen Einheiten nur einen geringen Effekt auf den Gesamtproteinabbau hat (Heinemeyer et al. '97).

Man unterscheidet verschiedene Klassen von Proteasominhibitoren, von denen die meisten vornehmlich die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität hemmen; einige zusätzlich, wenn auch in einem wesentlich geringeren Ausmaß, die beiden anderen Aktivitäten. Die vor einigen Jahren zuerst entwickelten Proteasominhibitoren gehörten zur Klasse der Peptidaldehyde und sind auch heute noch weit verbreitet. Zu ihnen zählt auch das in dieser Arbeit verwendete MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO). Peptidaldehyde sind in der Lage, schnell in das Zellinnere zu gelangen und dort das Proteasom reversibel zu inhibieren, sie sind Substratanaloga vor allem an der Chymotrypsin-ähnlichen Einheit des 20S Proteasoms und verhindern wirksam den Übergangszustand der enzymatischen Aktivität. Dabei erfolgt ein Angriff des Inhibitors am N-terminalen Threonin des Proteasoms.

Da die Peptidaldehyde in hohen Konzentrationen auch andere Proteasen wie Calpaine und Cathepsine hemmen können, ist es bei der Verwendung dieser Substanzen notwendig, begleitende Kontrollversuche entweder mit Substanzen, die das Proteasom spezifischer inhibieren (wie das in dieser Arbeit verwendete MG262) oder mit Inhibitoren anderer zellulärer Proteasen (hier: ALLM, in niedriger Konzentration ein Calpaininhibitor) durchzuführen. MG132 ist durch eine hohe Potenz und relativ hohe Spezifität für das Proteasom gekennzeichnet. Es hemmt Calpaine und Cathepsine erst bei mindestens 10-fach höheren Konzentrationen, als sie für die wirkungsvolle Inhibition des Proteasoms benötigt werden (Tsubuki et

al. '96). Dies macht es zu einem der günstigsten Vertreter der Peptidaldehyde (Kisselev und Goldberg 2001).

Eine weitere Klasse von Proteasominhibitoren sind Peptidboronate, dazu zählt auch dass in dieser Arbeit als Kontrollsubstanz verwendete MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂), dessen Potenz 100-fach größer ist, als die von MG132 (Adams et al. '98). Peptidboronate sind wesentlich spezifischere Inhibitoren des Proteasoms als Peptidaldehyde. Weitere Klassen der Proteasominhibitoren bilden die Peptidvinylsulfone, die Epoxyketone sowie die nicht peptidalen Inhibitoren, zu denen z.B. Lactacystin zählt, das ursprünglich aus *Streptomyces* isoliert wurde und die β 5 Untereinheit des 20S Proteasom modifiziert und so irreversibel inhibiert (Fenteany et al. '95).

1.1.5 Biologische Effekte der Proteasominhibitoren

Die Inhibition des Proteasoms bewirkt zunächst primär eine sofortige Abnahme des Gesamtproteinabbaus. Dies hat zum einen die Anhäufung ubiquitiniertes Proteine zur Folge, zum anderen akkumulieren fehlgefaltete und beschädigte Proteine, wodurch etwa ein bis zwei Stunden nach Proteasominhibition die Expression von Hitzeschockproteinen und Stressproteinen des Endoplasmatischen Retikulums induziert wird (Lee und Goldberg '98).

Über die Hemmung des Abbaus von I κ B, eines der ersten dem Proteasom zugeordneten Substrate, wird die anti-inflammatorische Wirkung der Proteasominhibitoren vermittelt. Durch die Stabilisierung von I κ B, das den Transkriptionsfaktor NF κ B inhibiert, kommt es zu einer verminderten Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren (z.B. TNF) und Leukozytenadhäsionsmoleküle wie ICAM oder VCAM, die bei vielen Krankheiten eine zentrale Rolle spielen (Pahl et al. '99).

Bei Inkubation über einen längeren Zeitraum, sind Proteasominhibitoren in der Lage, Apoptose zu induzieren (Drexler et al. '97), dies ist besonders bei proliferierenden Zelllinien der Fall. Einer der Gründe dafür ist vermutlich, dass Proteasominhibitoren, z.B. über Stabilisierung von Cyclinen, eine Arretierung des Zellzyklus bewirken (Drexler et al. '97). Des Weiteren wird vermutet, dass Proteasominhibitoren über die Stabilisierung regulatorischer Proteine, wie z.B. dem Tumorsuppressorprotein p53 (An et al. 2000) oder dem cyclin dependent kinase inhibitor p27 (Pagano et al. '95) Apoptose induzieren können. Die Akkumulation abnormaler Proteine bewirkt die Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase, die ebenfalls in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Merini et al. '98).

In nicht proliferierenden Zellen, wie z.B. in neuronalen Zelllinien, hingegen bewirkt eine Inkubation mit Proteasominhibitoren über einen Zeitraum von weniger als 16 Stunden eine Reduktion der durch verschiedene Arten des Zellstress induzierten Apoptose. Dies geschieht möglicherweise über die Stabilisierung des Apoptoseinhibitors bcl-2 (Kisselev und Goldberg

2001). Für einige Zelllinien ist beschrieben, dass Proteasominhibitoren eine Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Richtung bewirken können. Fenteany et al. beschreiben, dass die Inhibition des Proteasomsystems in murinen Neuroblastomzellen eine neuronale Differenzierung bewirken kann (Fenteany et al. '95). Ähnliches konnten auch Giasson et al. zeigen, sie beobachteten, dass die durch Proteasominhibition induzierte neuronale Differenzierung von Ratten-Phäochromozytomzellen (PC12) mit einer Aktivierung der Stress -aktivierten Proteinkinase (SAPK) einhergeht (Giasson et al. '99).

1.2 Kardiale Adaptation

Das Herz ist das zentrale Organ des Herz-Kreislauf-Systems, es macht beim gesunden Erwachsenen ca. 0,5% des Körpergewichtes aus. Herzgewebe setzt sich aus Fibroblasten, endothelialen Zellen und Neuronen zusammen, nur 20-30 % aller kardialen Zellen sind Kardiomyozyten, diese repräsentieren dabei aber 70-80% des Herzmuskelvolumens (Long '96). Grundsätzlich handelt es sich bei Herzmuskelzellen um postnatales, das heißt terminal differenziertes Gewebe ohne Möglichkeit der Zellteilung und damit des Zellersatzes (vergleichbar mit neuronalen Zellen). Trotzdem ist das Herz in der Lage, auf physiologische und pathologische Reize zu reagieren und sich an veränderte metabolische oder mechanische Bedingungen zu adaptieren. Dieser Vorgang wird als kardiales Remodelling bezeichnet.

Eine wichtige Form der kardialen Adaptation, z.B. bei Druck- und Volumenbelastung, Verlust kontraktile Materials oder durch Infarzierung kardialen Gewebes, ist die Hypertrophie. Hypertrophie ist definiert als Zunahme des Zellvolumens bei gleich bleibender Zellzahl. Unter kardialer Hypertrophie kommt es zu charakteristischen qualitativen und quantitativen Veränderungen des Phänotyps und der Genexpression (Schaub et al. '97).

Allgemeine Parameter hypertrophen Wachstums sind eine Zunahme des Myozytenvolumens, der Proteinsynthese und daraus folgend des Proteingehalts der einzelnen Zelle sowie des mRNA- und rRNA-Gehalts (Chien et al. '93). Auch auf molekularer Ebene sind charakteristische Veränderungen zu beobachten. Im Rahmen einer hypertrophen Reaktion kommt es zunächst nach etwa 30 bis 60 Minuten zu einer vorübergehenden Induktion so genannter early-response Gene (z.B. Egr-1, c-fos, c-jun, c-myc) (Hefti et al. '97). In Kardiomyozyten scheint diese frühe Genantwort nicht charakteristisch für die Reaktion auf einen hypertrophen Stimulus zu sein, sondern vielmehr die relativ unspezifische Antwort terminal differenzierter Zellen auf einen Wachstumsreiz darzustellen (Chien und van Bilsen '93). Nach etwa 6 bis 12 Stunden erfolgt eine Reexpression fetaler Gene, also der Gene, die normalerweise während der fetalen Entwicklung aktiv sind und die im adulten Myokard nur noch wenig bzw. gar nicht exprimiert werden. Dazu gehören β -myosin heavy chain (MHC) (Cheng et al. '86), α -smooth muscle actin (Eppenberger et al. '90) und der atriale natriuretische Faktor (ANF) (Eppenberger et al. '93). Außerdem ist eine vermehrte Expression konstitutiv exprimierter kontraktiler Proteine wie myosin-light-chain 2 (MLC2) (Lee et al. '88) und cardiac α -actin (Long et al. '89) zu beobachten, diese tritt etwas später nach ca. 12 bis 24 Stunden auf.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass nicht nur eine „klassische“ Hypertrophiereaktion existiert. Vielmehr kommt es in vivo durch das Zusammenwirken mehrerer hypertropher Stimuli und komplexer Interaktion zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen (dem so genann-

ten cross-talk) zur Ausbildung verschiedener hypertropher Phänotypen und Genexpressionsmuster (zur Übersicht s. Schaub et al. '97 und Abb. 2).

Primärzellkulturen neonataler und adulter Rattenkardiomyozyten stellen eine gute Möglichkeit dar, diese Veränderungen in vitro zu untersuchen und einzelnen hypertrophen Stimuli charakteristische morphologische und genetische Veränderungen zuzuordnen sowie spezifische Signaltransduktionswege aufzudecken. Durch die Verwendung von Zellkulturen kardialer Myozyten konnten zahlreiche Stimuli, die die Ausbildung einer hypertrophen Antwort hervorrufen, identifiziert werden (Schaub et al. '97). Hierzu gehören Wachstumsfaktoren wie EGF (endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und TGF (transforming growth factor) (Long '96). Auch Katecholamine, wie z.B. Adrenalin und Isoproterenol, sowie vasoaktive Peptide wie Angiotensin II und Endothelin-1 und Interleukine (IL-1, IL-6) können eine kardiale Hypertrophie induzieren.

Alle genannten Zytokine werden zumindest zu einem gewissen Teil in myokardialen Zellen exprimiert, die damit sowohl Synthese- als auch Wirkort dieser wachstumsinduzierenden Substanzen sind. Zellulärer Stress, wie z.B. durch Hypoxie, Hitzeschock oder myokardiale Infarktzierung geht in kardialen Myozyten mit einer verstärkten Expression einzelner Zytokine einher (Thompson et al. '98; Flanders et al. '93; Ladoux et al. '93). Dies könnte eine Anpassungsreaktion im Rahmen einer Adaptation an veränderte Bedingungen darstellen.

1.3 Trophische Faktoren

1.3.1 Wachstumsfaktoren

1.3.1.1 IGF (insulin-like growth factor)

IGF gehört zur Gruppe der Peptid – Wachstumsfaktoren, man unterscheidet zwei Isoformen, die beide strukturelle und biologische Homologien mit pro-Insulin aufweisen, IGF-I (70 AS) und IGF-II (67 AS) (Blakesley et al. '96). Kardiomyozyten exprimieren beide Isoformen (Schlüter et al. '95). IGF-II wird vermehrt während der fetalen Entwicklung exprimiert, im adulten Myokard dominiert IGF-I. Für den Membrantransport von IGF werden IGF-binding Proteine (IGFBP) benötigt. Die Wirkung von IGF wird zum großen Teil über den IGF-I Rezeptor, der eine Tyrosin-Kinase Aktivität enthält, vermittelt, die Rezeptorbindung wird vermutlich über die Bildung von IGF/IGFBP-Komplexen reguliert (White et al. '94).

1.3.1.2 TGF β 1 (transforming growth factor β 1)

TGF β gehört zu einer Gruppe regulatorischer Proteine, denen eine Homologie in 30-40 % ihrer Sequenz gemeinsam ist. In Säugern kommen drei Formen vor TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3. Sie sind zu 70-80 % homolog und entfalten in verschiedenen Zelltypen sehr unter-

schiedliche Aktivitäten (Lawrence et al. '95). Das aktive TGF β 1, ein 25 kDa großes Dimer, wird aus einem 390 AS Vorläuferprotein synthetisiert, das in ein N-terminales und ein C-terminales Segment aufgespaltet wird. Seine Wirkung wird über zwei Rezeptoren vermittelt: TGF β 1 bindet zuerst an einen Typ-II Rezeptor, der daraufhin mit dem Typ-I Rezeptor dimerisiert und diesen phosphoryliert, wodurch das Signal weitergeleitet werden kann. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um verwandte Serin-Threonin Kinasen (RSTKs). TGF β wird sowohl von ARCs als auch von NRCs vom ersten Tag in Kultur an in das Kulturmedium sezerniert (Schlüter et al. '95; Roberts et al. '92).

1.3.1.3 Vasoaktive Peptide, ET-1 (Endothelin-1)

Endothelin-1 ist ein vasokonstriktorisches wirksames Peptid aus 21 Aminosäuren. Es wird nach Abspaltung aus einem Vorläuferprotein von Endothelzellen und anderen Zellen, so auch Kardiomyozyten, sezerniert (Suzuki et al. '93). Man unterscheidet drei verschiedene Rezeptortypen ET-A, ET-B und ET-C. In Rattenherzen herrscht der vasokonstriktorisches Effekte vermittelnde ET-A Rezeptor vor. Es handelt sich dabei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der bei Aktivierung an stimulierende Gs-Proteine und inhibierende Gi-Proteine koppelt und so z.B. über Stimulation und Inhibition der Adenylatzyklase an der Regulation der Proteinkinase A (PKA) beteiligt ist (Hilal-Dandan '94).

1.3.1.4 Katecholamine

Ebenso wie bei Endothelin-1 wird auch die Wirkung von Katecholaminen auf das Wachstum von Kardiomyozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Dabei handelt es sich um heptahelicale membranständige Rezeptoren, die bei ihrer Aktivierung an hetero trimere GTP-bindende Regulatorproteine, die so genannten G-Proteine, binden. Man unterscheidet mehrere G-Proteine, die jeweils aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit bestehen (Gudermann et al. '96). Der α 1-Adrenozeptor interagiert bei Aktivierung vermutlich mit verschiedenen dieser G-Proteine, unter ihnen z.B. das Gq-Protein. Sowohl β 1- als auch β 2-Rezeptoren koppeln an stimulierende Gs-Proteine.

1.3.1.5 Trijodthyronin (T3)

Trijod-L-Thyronin (T3) ist die aktive Form des Schilddrüsenhormons, die durch die Deiodierung von L-Thyroxin (T4) entsteht. Ca. 0,3 % des im Serum enthaltenen T3 liegen in freier Form vor und können über einen energieabhängigen Prozess in die Zelle aufgenommen werden. Dabei spielen offensichtlich verschiedene T3 bindende Proteine (TBP) eine Rolle (Ichikawa et al. '95). Der primäre Wirkungsort von T3 ist der Zellkern. Der T3 Rezeptor (TR) gehört zu einer Gruppe von hormonsensitiven nukleären Transkriptionsfaktoren, in Struktur und Funktionsweise ist er den Steroidhormonrezeptoren oder auch dem Vitamin-D Rezeptor vergleichbar. Der T3-TR Komplex interagiert mit regulatorisch wirksamen DNA Regionen.

Damit umgeht T3 im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Substanzen viele Zwischenschritte klassischer Hypertrophie-Signalkaskaden und wirkt zum Großteil über eine direkte Beeinflussung der Transkription.

1.3.1.6 Mechanische Belastung

Unter physiologischen Bedingungen stellt vermutlich die mechanische Belastung durch erhöhten Druck- bzw. vermehrtes Volumen am häufigsten Anforderungen an das Adaptationsvermögen der Kardiomyozyten. In vivo kommt es unter hämodynamischer Belastung zu einer erhöhten myokardialen Proteinsynthese. Dabei führt Druckbelastung zu anderen charakteristischen Veränderungen als Volumenbelastung. Bei der Anpassung an veränderte physiologische Bedingungen spielt das Gleichgewicht der oben beschriebenen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. So führt eine Druckbelastung in Rattenherzen zu einer vermehrten Expression der mRNA für TGF β 3 und IGF I. Volumenbelastung hat eine verminderte Expression von acidic fibroblast growth factor (aFGF) zur Folge. Für die Vermittlung einer Hypertrophie durch Druckbelastung in adulten Rattenkardiomyozyten (ARC) hat z.B. ET-1 einen wichtigen Stellenwert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des ET-1 Rezeptors bei persistierender Druckbelastung eine Verminderung der erhöhten mRNA Expression von α -sk actin und ANF bewirkt (Ito et al. '94). Allgemein führt Druck-, aber nicht Volumenbelastung in Rattenherzen zu einer vermehrten Expression von β -MHC und α -sk actin (Calderone et al. '95). In vivo ist auch die mRNA für α -sm actin unter Druckbelastung vermehrt exprimiert (Black et al. '91). In vitro führt in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRC) die externe Applikation von mechanischem Stress durch passive Dehnung der Kardiomyozyten zur Ausbildung einer Hypertrophie und strukturellem Remodelling (Watson et al. '96). Bei der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, z.B. des MEK-ERK Signaltransduktionsweges, spielt hier unter anderem die Freisetzung von Angiotensin II, das sowohl parakrin als auch autokrin wirkt, eine Rolle. Ein weiteres Beispiel für an der Vermittlung einer zellulären Adaptation von Kardiomyozyten beteiligte Substanzen sind, sind Zytokine z.B. wie IL-1 β oder Cardiotrophin-1, die in NRC ebenfalls die Ausbildung spezifischer Formen der kardialen Hypertrophie bewirken.

	bFGF	IGF-I	TGF β	ET-1	α -adrenerge Stimulation	T3	Mechanische Belastung (Druck)	IL-1 β
α -MHC	↓	n. b.	↓	↑	↓ bzw. →	↑	↓	↓
β -MHC	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑ bzw. →
ANF	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
α -sm actin	↑	↓	↑	n. b.	n. b.	↑	↑	n. b.
α -sk actin	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	→

Tab.1: Effekte von trophischen Faktoren auf die mRNA und/ oder Proteinexpression myokardialer Hypertrophiemarker in NRCs bzw. ARC's nach Hefti et al. (n.b. = noch nicht bekannt)

1.3.2 Interaktion von Wachstumsfaktoren

In vivo kommt es bei physiologischen und pathologischen Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie z.B. bei vermehrter hämodynamischer Beanspruchung, myokardialer Infarzierung oder auch bei genetisch bedingten Defekten, zu kompensatorischen Reaktionen auf morphologischer und genetischer Ebene, wobei die individuelle Ausprägung der jeweiligen Adaptationsantwort vom Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren bestimmt wird. Unter normalen Bedingungen befinden sich die meisten der oben beschriebenen Hormone und Wachstumsfaktoren im Gleichgewicht. Wenn dieses durch einen physiologischen oder pathologischen Einfluss gestört wird, kann es sich zugunsten einer bestimmten Adaptationsreaktion verschieben. So ist z. B. in der perikardialen Flüssigkeit von Patienten mit instabiler Angina pectoris der Gehalt an FGF-2 erhöht (Fujita et al. '94). Dabei korreliert sowohl der FGF-2 Gehalt der perikardialen Flüssigkeit als auch die FGF-2 Konzentration im Serum mit der linksventrikulären myokardialen Masse (Corda et al. '97). In isolierten Rattenherzen bewirkt die Katecholamin-induzierte Steigerung der Kontraktionsrate die vermehrte Produktion und Freisetzung von aFGF und bFGF (Clarke et al. '95).

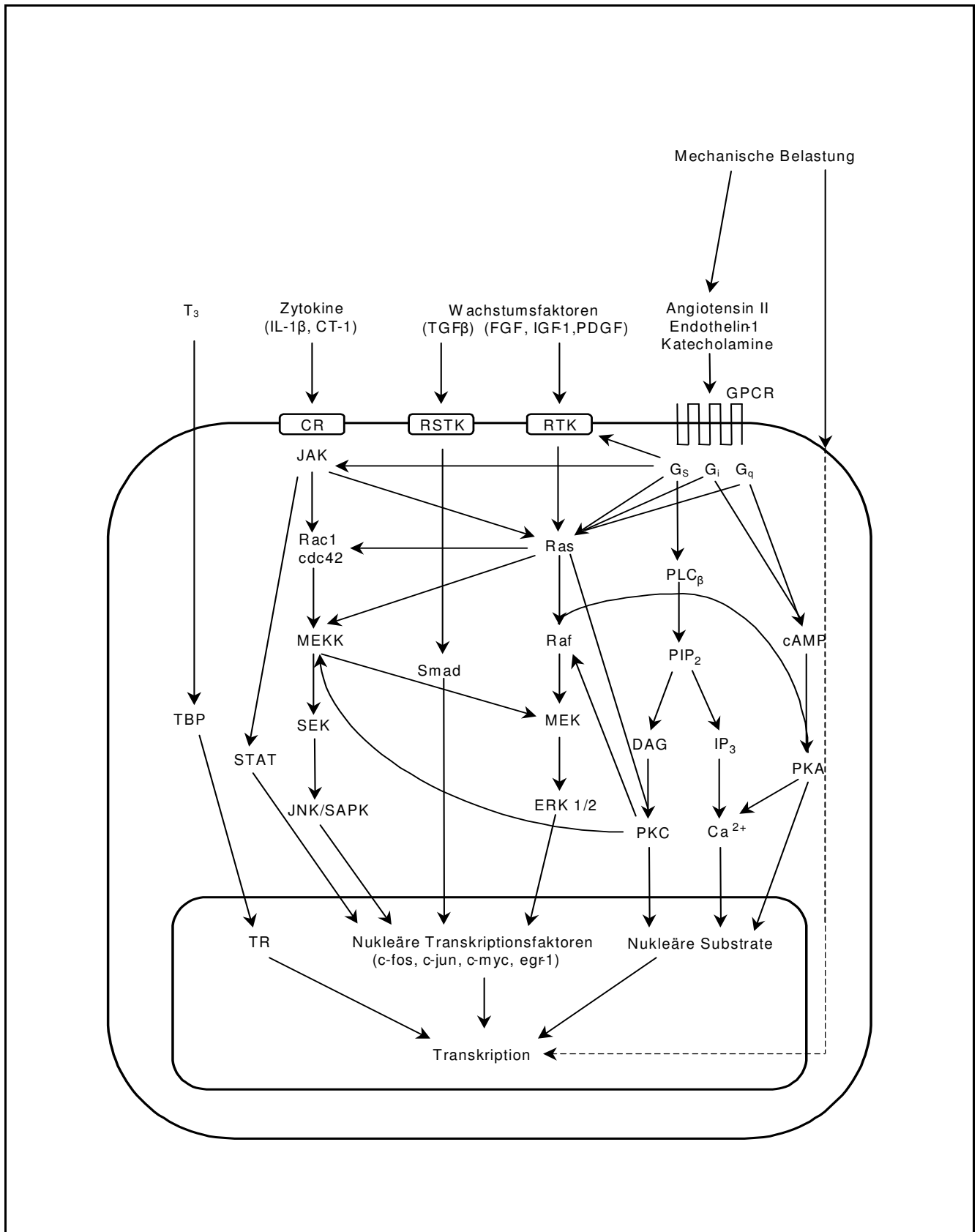


Abb. 2: Wachstumsfaktoren steuern über verschiedene Signaltransduktionswege die kardi-ale Genexpression (modifiziert nach Hefti et al. '97)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Vermittlung kardialer Adaptationsvorgänge, wie sie zum Beispiel im Rahmen einer Hypertrophie stattfinden, sind zahlreiche verschiedene trophische Faktoren beteiligt. Hierzu gehören u.a. α -adrenerge Agonisten, Endothelin-1, Angiotensin-II und verschiedene Peptid-Wachstumsfaktoren, ebenso wie verschiedene Cytokine und Triiodthyronin (T3) (zur Übersicht s. Hefti et al. '97).

Sowohl im physiologischen als auch im kompensierten pathologischen Zustand befinden sich die einzelnen Faktoren in einem fließenden Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht verschiebt sich bei Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie z.B. bei Druck- oder Volumenbelastung, Verlust kontraktiven Materials, oder auch bei erblichen Defekten. In der Folge kommt es unter veränderten Umgebungsbedingungen zu einer zellulären Adaptation. Je nach Art des Stimulus ist diese durch spezifische genetische und morphologische Veränderungen gekennzeichnet.

Ein experimentelles Modell, um diese Adaptationsvorgänge in vitro zu untersuchen, ist die Primärzellkultur neonataler Rattenkardiomyozyten (NRC). Unter Zusatz von 10% Serum lässt sich in diesen Zellen die Ausbildung einer Hypertrophie induzieren. Erste Befunde aus unserem Labor deuteten darauf hin, dass eine Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems diese Serum-vermittelte Hypertrophie verhindert (Meiners et al., Manuskript eingereicht). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern es sich bei der beobachteten Suppression der Hypertrophie um einen generellen Einfluss von Proteasominhibitoren auf eine myozytenspezifische Adaptationsreaktion handelt. Dazu wurden die Effekte von Proteasominhibitoren auf das Adaptationsverhalten von NRCs an verschiedene Kulturbedingungen untersucht: NRCs wurden in An- und Abwesenheit von Serum sowie in Gegenwart einzelner trophischer Stimuli kultiviert.

Ziel der Arbeit war es, die Effekte von Proteasominhibitoren zum einen auf die Morphologie der Zellen, zum anderen auf die Expression ausgewählter Strukturproteine und Hypertrophie-markergene unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels Realtime-PCR, Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbungen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

2.1.1 Verwendete Materialien

- Hanks CMF-HBSS Balanced Salt Solution w/o Calcium and Magnesium, (GibcoBRL)
- Trypsin (TRLS) 0,22 Filtered, 1 mg / 2 ml HBSS, (Cell Systems)
- Trypsin Inhibitor (SI), 2 mg/ ml HBSS, (CellSystems)
- L-15 (Leibovitz) Medium with L-Glutamine w/ L-Amino Acids, (GibcoBRL)
- Kollagenase (215 U/g), 70 mg in 50 ml L-15 Medium, (Cell Systems)
- Fibronectin (5 mg/ ml), eingesetzte Verdünnung 10 µg/ ml, (Promocell)

2.1.2 Durchführung

Die Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte nach einer an den Worthington Kit, Version 1.0.1, angelehnten, teilweise modifizierten Methode.

Tag 1:

Eine zwei bis drei Tage alte Ratte wurde durch Genickbruch getötet und in 96 %iger Ethanol-lösung sterilisiert. Das schlagende Herz wurde entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit 40 ml eiskaltem CMF HBSS gegeben. Dieser Vorgang wurde bei den weiteren Ratten wiederholt. Durch leichtes Schütteln des Röhrchens wurden die Herzen gewaschen, der Überstand wurde abgenommen und wiederum mit 10 ml HBSS gewaschen. Danach wurden die Herzen in 9 ml HBSS aufgenommen, in eine Petrischale gegeben und mit zwei Skalpell-ten zu Würfeln von ungefähr 1 mm³ Größe zerkleinert. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe möglichst wenig gequetscht wurde, um die Zellen unbeschädigt zu lassen. Zur Gewebelyse wurde 1ml Trypsinlösung (entspricht 50 µg/ ml) in die Petrischale gegeben, die Gewebestücke inkubierten über Nacht bei 4 °C.

Tag 2:

Am nächsten Tag wurden die trypsinverdauten Gewebestückchen unter der Bench mit einer 25ml Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um den Trypsinverdau zu beenden, wurden 2ml Trypsininhibitor zur Lösung gegeben. Durch leichtes Schwenken des Röhrchens wurde das Gewebe für ca. eine Minute oxygeniert und dann auf 37 °C erwärmt. Danach wurden 5 mg Kollagenase zugegeben und der Inhalt des Röhrchens gemischt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 30-45 Minuten bei 37°C und in leichter Bewegung gehalten.

Nach Beendigung des Kollagenaseverdaus wurden die Zellen unter der Bench zehnmal mit einer 10 ml Pipette auf und ab pipettiert. Um möglichst viele intakte Zellen zu erhalten, war es von entscheidender Bedeutung, diesen Arbeitsschritt langsam und unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen durchzuführen. Auf ein neues Zentrifugenröhrchen wurde nun ein 70 µm Nylon- Zellsieb gesetzt und mit 1 ml L-15 Medium befeuchtet. Nachdem sich die unverdauten Gewebereste ca. drei bis vier Minuten abgesetzt hatten, wurde der zellhaltige Überstand mit der Pipette abgenommen und durch das Sieb gegeben. Es wurden erneut 5 ml L-15 Medium zum Gewebepellet hinzugefügt und dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Abschließend wurde das Sieb mit 2 ml L-15 Medium gewaschen, die Zellen blieben für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Wenn nach dieser Zeit noch eine Trübung des Mediums erkennbar war, setzte man den Verdau für weitere zehn Minuten fort, war dies nicht der Fall wurden die Zellen sofort für 5 Minuten bei 83°C (700 U/ min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zunächst in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach dem Zählen wurden die Zellen mit Medium auf das Endvolumen verdünnt und mit einer Dichte von $125.000/\text{cm}^2$ auf mit Fibronectin vorbeschichtete six-well-Platten ausplattiert und für 24 Stunden unberührt im Inkubator belassen. In dieser Zeit konnten die intakten Kardiomyozyten am Boden des vorbeschichteten Kulturgefäßes adhären. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen, hierbei wurden nichtadhärente, defekte Zellen und Zellschrott entfernt.

2.2 Zellkultur und Stimulation mit Wachstumsfaktoren

2.2.1 Verwendete Materialien

Standard Kulturmedium

- 440 ml Medium199 mod. Earle's Salts with 1.25 mg/ l NAHCO_3 with L-Glutamine w/L-Amino Acids, (GibcoBRL)
- 50 ml Newborn Calf Serum (NBCS), (GibcoBR)
- 5 ml Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ ml bzw. 10.000 µg/ ml), (GibcoBRL)
- 500 µl Cytosine-β-arabinofuranoside (Ara-C), 100 mg in 41 ml M1, (Sigma)

Konzentration und Lösung der Wachstumsfaktoren (Stammlösung):

- 0,1 mM Endothelin-1 in H₂O/ 0,5% BSA, (Sigma)
- 1 mM IGF in H₂O, (Biosource)
- 10 mM Isoproterenol in H₂O, (Sigma)
- 10 mM Triiodthyronin in EtOH 99%, (Sigma)

Konzentration und Lösung der Proteasominhibitoren (Stammlösung):

- 10 mM MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) in DMSO, (Biomol PI102)
- 10 mM clasto-Lactacystin β -Lactone in DMSO, (Calbiochem)
- 10 mM ALLM (N-Ac-Leu-Leu-methional) in DMSO, (Calbiochem)

2.2.2 Durchführung der Stimulation

Für die Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. Proteasominhibitoren wurde ein Teil der Zellen in serumfreiem Kulturmedium und ein Teil der Zellen in Medium mit 10 % Serumanteil kultiviert. Das Mediumvolumen pro Well betrug 2 ml, zum Mediumvolumen wurde initial einmalig Wachstumsfaktor bzw. Proteasominhibitor entsprechend der jeweiligen Konzentration gegeben, um Pipettierungenauigkeiten zu vermeiden mit einer Mindestmenge von 1 μ l. Parallel zu den Stimulationen wurden Kontrollzellen mit der Substanz behandelt, in der der einzelne Wachstumsfaktor bzw. Proteasominhibitor gelöst wurde, um auszuschließen, dass ein möglicher Effekt allein durch das jeweilige Lösungsmittel bedingt war.

Eine Stimulation dauerte 48 Stunden, während dieser Zeit blieben die Zellen unberührt, es wurde kein weiterer Mediumwechsel vorgenommen.

2.3 Total RNA Isolation**2.3.1 Verwendete Materialien**

- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- TRIzol® Reagent, (GibcoBRL)
- Chloroform, (J.T.Baker)
- 2-Propanol, (J.T.Baker)
- Ethanol, (J.T.Baker)

2.3.2 Durchführung

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen. Pro well (ca. 9,8 cm²) wurde 1 ml TRIzol® Reagent verwendet, um die Zellen zu lysieren. Nachdem die Flüssigkeit einige Male durchmischt worden war, um möglichst alle Zellen von der Kulturschale zu lösen, wurden die Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden die Proben etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Je ml TRIzol® gab man 200 µl Chloroform hinzu, schüttelte die Probe kräftig und inkubierte wiederum drei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich die Probe in eine rote untere Phenol-Chloroform Phase, eine Interphase und eine wässrige obere Phase, die die RNA enthielt und ca. 60 % des Ausgangsvolumens ausmachte. Diese obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei war darauf zu achten, dass auf keinen Fall Teile der Interphase mitpipettiert wurden, um Verunreinigungen der RNA zu vermeiden. Durch Mischen mit 0,5 ml Isopropanol/ ml TRIzol® wurde die RNA gefällt.

Dafür inkubierte man erneut zehn Minuten bei Raumtemperatur und zentrifugierte dann zehn Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA mit 1 ml 75 %igem Ethanol pro ml TRIzol® gewaschen. Nach Zugabe des Ethanols wurde die Probe gevortext und für fünf Minuten bei 4 °C mit 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und die RNA kurz an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Die RNA wurde photometrisch vermessen und bei -20 °C eingefroren. Für die photometrische Messung wurde 1 µl der RNA 1:50 in Aqua bidest. verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

Die Konzentration der RNA berechnete sich nach folgender Formel:

$$C (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{Absorbtion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times K$$

(K ist die Konstante für die optische Dichte, sie beträgt für RNA 40 µg/ ml)

Ein Maß für die Reinheit der RNA ist der Quotient A₂₆₀/ A₂₈₀. Der Zielwert war zwischen 1,6 und 2,0.

2.4 Reverse Transkription

2.4.1 Verwendete Materialien:

- 5x First Strand Buffer, (GibcoBRL)
- 0,1 M DTT, (GibcoBRL)
- Ultrapure dNTP Set 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphate, (Pharmacia Biotech) (Stocklösung je 100 mM)
- RNasin® Ribonuclease Inhibitor, (Promega)
- M-MLV Reverse Transcriptase, (GibcoBRL)
- dN6 Hexamer (0,5 µg/ µl), (TIBMolbiol)

2.4.2 Durchführung

Die Reverse Transkriptions-Reaktion dient dazu, die RNA in DNA umzuschreiben, die als Ausgangsprodukt für die PCR (Polymerase Kettenreaktion) verwendet wird. Die hierbei entstehende DNA ist komplementär zur RNA und wird daher als cDNA (c=complementary) bezeichnet. Sie enthält im Gegensatz zu genomischer DNA ausschließlich codierende Sequenzen. Für die Reverse Transkription wurden 1 µg Total-RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Als Transkriptionenzym wurde eine M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase verwendet. Als Primer diente ein dN6-Oligonukleotid einer zufälligen Sequenz, ein so genannter Random-Hexamer Primer.

Ansatz 1:

- 1 µg Total RNA
- 2 µl Hexamer Primer (0,5 µg/ µl)
- Aqua bidest. ad 11,5 ml

Dieser Ansatz wurde zehn Minuten bei 70 °C inkubiert, um eine möglichst vollständige Anlagerung der Primer zu ermöglichen.

Ansatz 2:

- 4 µl 5x First Strand Buffer
- 2 µl 0,1M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP
- 0,5 µl RNasin (ca. 40 U/ µl)
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ µl)

Um zu gewährleisten, dass die Reaktionsbedingungen für alle RT Ansätze gleich waren, setzte man zunächst einen Master Mix für alle Proben an und gab davon je 8,5 µl zum jeweiligen RT Ansatz 1. Nach einer fünfminütigen Annealing-Reaktion bei 25 °C erfolgte die Elongationsreaktion für 60 Minuten bei 37 °C. Um eine Renaturierung der cDNA zu verhindern, wurde der Ansatz im Anschluss an die Reverse Transkriptions-Reaktion sofort auf Eis gestellt.

2.5 DNase Verdau

Die fertig umgeschriebene cDNA wurde im Anschluss mit dem Enzym DNase 1 von Ambion DNase verdaut, um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. Hierfür setzte man 0,5 µl DNase 1 (Ambion) (2 U/ µl) pro 20 µl RT Ansatz ein und inkubierte 15 Minuten bei 37 °C. Durch die anschließende zehnmünütige Inkubation bei 75 °C wurde das Enzym hitzeinaktiviert. Nach dem DNase Verdau wurde die cDNA 1:5 in Aqua bidest. verdünnt und in dieser Konzentration in die PCR eingesetzt.

2.6 Real-Time PCR

2.6.1 Verwendete Materialien

Sybr® Green PCR Core Reagents enthalten:

- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 5U/ µl
- AmpErase® UNG
- dNTP (je 2,5 mM) Mix with dUTP (5 mM)
- 10x Sybr® Green PCR Puffer
- 25 mM MgCl₂
- Oligonukleotide (TIBMolbiol)

2.6.2 Durchführung

Bei der Mitte der Achtziger Jahre entwickelten Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine durch spezifische Primer definierte enzymatische in vitro Replikation. Durch sich wiederholende Zyklen wird dabei eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht. Die DNA-Doppelstränge werden zunächst voneinander getrennt (denaturiert). Im zweiten Schritt (Annealing) lagern sich die Primer (kurze einzelsträngige Oligonukleotide einer gewünschten DNA-Sequenz) an die komplementäre Sequenz der Ausgangs-DNA an. Im dritten Schritt, der Extensionsphase, werden die Primer durch eine DNA-Polymerase ent-

lang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize verlängert. Hierfür ist die Anwesenheit von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) notwendig. Am Ende der Reaktion liegen die Ausgangs-DNA-Moleküle wieder in der doppelsträngigen Form vor. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Schritte kann ein beliebiges zwischen zwei Primern liegendes DNA-Segment exponentiell amplifiziert werden.

Mit der so genannten Real-Time PCR wurde ein homogenes Assay entwickelt, bei dem Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind. Ursprünglich werden für die quantitative Real-Time PCR TaqMan® Sonden verwendet, bei diesem Verfahren wird die 5'3'-Exonucleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase genutzt, hierbei wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt. Die Veränderung der Fluoreszenz wird mit Hilfe eines ABI PRISM 5700 Sequence Detectors Zyklus für Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß erfasst. Damit besteht bei der Real-Time PCR, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der es sich um eine reine Endpunktanalyse handelt, die Möglichkeit, die Amplifikation des Produktes in jedem einzelnen Zyklus zu verfolgen. So kann zum Beispiel beurteilt werden, ob ein Produkt schon sehr früh, oder erst zu einem relativ späten Zeitpunkt über die Nachweisgrenze amplifiziert wird.

Statt der TaqMan® Sonden können zur Real-Time Quantifizierung von PCR-Produkten auch Doppelstrang-DNA-bindende Farbstoffe verwendet werden. In den vorliegenden Experimenten wurde der Farbstoff SYBR Green 1 benutzt, der aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität für Doppelstrang-DNA besonders geeignet ist. Es wird angenommen, dass SYBR® Green in die kleine Furche der DNA bindet und in gebundenem Zustand fluoresziert. Dieses Fluoreszenzsignal wird genutzt, um den Amplifikationsprozess im Laufe der PCR darzustellen. Genauso wie im ursprünglichen 5'-Exonucleaseassay wird die Fluoreszenz über den Verlauf der Reaktion aufgezeichnet. Außerdem wird ein zusätzlicher Farbstoff, ROX, als interne Passivreferenz verwendet. Dieser Farbstoff ist im 10x SYBR® Green PCR Puffer enthalten und hat keinen Anteil an der Amplifikation. Als passiver Referenzfarbstoff liefert er einen internen Standard, auf den das SYBR® Green Signal während der Datenaufzeichnung abgeglichen werden kann. Diese Normalisierung ist notwendig, um Volumen- und Konzentrationsschwankungen, z.B. durch Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Aufgrund der Tatsache, dass im SYBR® Green Assay jede doppelsträngige DNA zu einem Fluoreszenzsignal führt, dient neben der sorgfältigen Primerauswahl die Schmelzkurvenanalyse als weitere Spezifitätskontrolle. Nach jedem PCR-Lauf werden die Dissoziationskurven der entstandenen Produkte aufgezeichnet, so kann das Vorliegen von Primerdimeren und unspezifischen Nebenprodukten, die ein verfälschtes Fluoreszenzsignal generieren würden, beurteilt werden.

Die PCRs in dieser Arbeit wurden mit dem ABIPRISM 5700 Sequence Detection System durchgeführt. Eine PCR teilte sich wie folgt in verschiedene Schritte auf:

Schritt 1: 50 °C, 2 Minuten (AmpErase® UNG)

Dieser Schritt dient dem Schutz vor carryover-Kontaminationen durch Produkte aus vorherigen PCRs, bei 50 °C arbeitet die im PCR Master Mix enthaltene AmpErase® UNG, eine E. coli Uracil N-Glycosylase. Da der im SYBR® Green PCR Master Mix enthaltene dNTP-Mix statt dTTPs dUTPs enthält, werden im Laufe der PCR entstehende Produkte mit Uracil statt Thymin synthetisiert. Die AmpErase verhindert eine Amplifikation von carryover-Produkten, indem sie dUracile aus der DNA ausbaut und somit dUTP enthaltende DNA abasisch und damit anfällig gemacht werden. Auf RNA oder dThyminhaltige DNAs hat das Enzym keinen Einfluss.

Schritt 2: 95 °C, 10 Minuten (Denaturierung)

Dieser Schritt hat mehrere Funktionen; zum einen werden die nach dem UNG Verdau abasischen carryover-Moleküle zerstört, zum anderen wird das Enzym hitzeinaktiviert. Außerdem wird in diesem Denaturierungsschritt die AusgangsdNA denaturiert und aufgefaltet. Die inaktiv vorliegende DNA Polymerase AmpliTaq®, eine spezielle DANN- Polymerase, wird erst durch die 10-minütige Inkubation bei 95 °C irreversibel aktiviert.

Schritt 3: 95 °C, 15 Sekunden, 65 °C, 1 Minute, 40 Zyklen, (Annealing und Extension)

Die AmpliTaq Gold DNA Polymerase ist bereits bei Temperaturen von >55 °C signifikant aktiv. Daher bietet es sich an, Annealing und Extension zu einem Schritt zusammenzufassen und eine so genannte 2-Schritt PCR durchzuführen. Das hat unter anderem den Vorteil, dass mit höheren Annealing-Temperaturen (>55 °C) generell spezifischere Produkte generiert werden können.

2.6.3 Relative Quantifizierung anhand der vergleichenden CT-Methode ($\Delta\Delta CT$ -Methode)

Bei dieser Form der Quantifizierung wird die Expression der Zielsequenz relativ auf die Expression einer anderen, nicht verwandten Sequenz, eines so genannten Housekeeping-Gens bezogen. Housekeeping-Gene sind Gene, deren Expression unabhängig z.B. von der Art der Behandlung einer Zelllinie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen relativ konstant bleibt. In den vorliegenden Experimenten wurde hierfür die Hypoxanthin-Guanin-

Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet, ein Enzym, das bei der Nucleotidbiosynthese eine Rolle spielt.

Der ABIPRISM SDS gibt nach Ablauf einer PCR für jede Probe den entsprechenden CT-Wert an. Dieser so genannte threshold cycle bezeichnet die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über die Grundlinie (baseline) ansteigt. Diese Zykluszahl wird auf die Zykluszahl des zugehörigen Housekeeping-Gens abgeglichen (ΔCT) und graphisch als $2^{-\Delta Ct}$ dargestellt. Diese Darstellung ist sinnvoll, weil es pro Zyklus der PCR theoretisch zu einer exponentiellen Verdopplung der DNA-Produktmenge kommt.

Um die Methode der relativen Quantifizierung anhand der vergleichenden CT-Methode anwenden zu können, dürfen die Effizienzen von Zielsequenz und Housekeeping-Gen sich nicht zu sehr voneinander unterscheiden. Eine empfindliche Methode, um zu überprüfen, ob die Amplifikationen zweier Reaktionen annähernd gleich sind, ist der Vergleich des ΔCT bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen. Hierfür wurden jeweils Dreifachbestimmungen für die Verdünnungen 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 durchgeführt und der Logarithmus der Startkonzentration über dem ΔCT (CT Zielsequenz-CT Housekeeping-Gen, hier: HPRT) graphisch dargestellt (Abb.3).

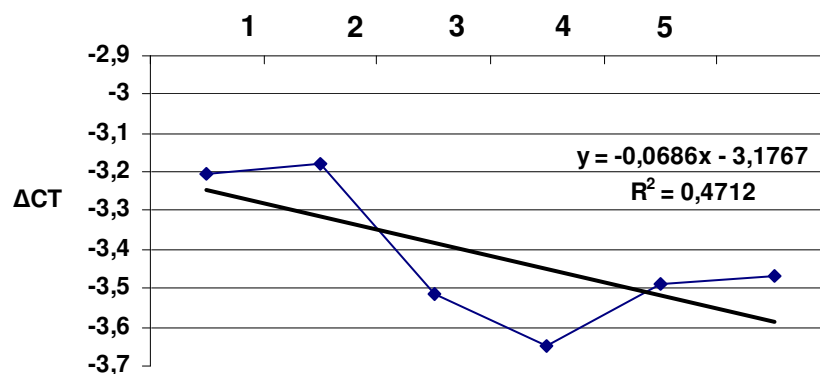


Abb. 3: Vergleich der Effizienzen von α -MHC und HPRT durch die Darstellung von ΔCT

Wenn die Effizienzen für beide Amplifikate ungefähr gleich sind, nähert sich die Steigung des Graphen (y) dem Wert 0. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung $< 0,1$ sein. Ist dies der Fall, kann die $\Delta\Delta CT$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden, ohne dass eine Standardkurve erstellt werden muss. Der ΔCT -Wert errechnet sich durch Substraktion des CT-Mittelwerts des Housekeeping Gens vom CT-Mittelwert der Zielsequenz. Er wird bei der $\Delta\Delta CT$ -Methode zusätzlich auf die Kontrolle (hier DMSO, bzw. serumfreie Kultur) abgeglichen. Liegt die Effizienz der Reaktion zwischen 0,8 und 1, lässt sich die Konzentration der

Zielsequenz normalisiert mit einem Housekeeping-Gen und relativ zu einer Kontrolle näherungsweise nach der Formel

$$X = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

berechnen.

Die Standardabweichung (s) für $\Delta\Delta CT$ wird aus den Standardabweichungen der CT-Werte aus mehreren unabhängigen Ansätzen (n) nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{s^2 \text{ Zielgen/ HPRT PI} + s^2 \text{ Zielgen/ HPRT Kontrolle}}$$

Sie wird als standard error of means (SEM) betrachtet, also auf die Zahl der unabhängigen Ansätze bezogen:

$$\text{SEM} = \frac{\sqrt{s^2_1 + s^2_2 + \dots + s^2_n}}{\sqrt{n}}$$

Graphisch wird sie wie folgt dargestellt:

$$\text{plus: } (2^{-\Delta\Delta CT} - \text{SEM}) - (2^{-\Delta\Delta CT})$$

$$\text{minus: } (2^{-\Delta\Delta CT}) - (2^{-\Delta\Delta CT} + \text{SEM})$$

2.6.4 Primerauswahl und Etablierung der Realtime-PCR

Um einen möglichen Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Expression bestimmter Hypertrophie-markergene zu untersuchen, wurden einige charakteristische Gene ausgewählt. Mit Hilfe der „Primer Express“ Software der Firma PE Applied Biosystems wurden für diese Gene spezifische PCR-Primer designed und etabliert. Die gewünschten Sequenzen wurden den gängigen Datenbanken entnommen.

Für die Auswahl der Primer galten folgende Kriterien:

- Länge 18-30 Basen
- G+C Gehalt ca. 20-60 %
- möglichst keine Poly (T)-Abschnitte (unspezifische Bindungen)

- möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte
- keine 3'-Komplementarität der Primer (Primer-Dimere)
- Ampliconlänge idealerweise zwischen 50 und 150 bp

Die Primer wurden vorzugsweise aus der jeweiligen mRNA-Sequenz, also exonspezifisch und unter Auslassung der Intron-Strukturen gewählt, um möglichst keine genomische DNA sondern ausschließlich cDNA zu amplifizieren.

2.6.4.1 Primermatrix

Da die beiden jeweils zusammengehörenden Primer sich bezüglich ihres Hybridisierungsverhaltens unterscheiden können, war es notwendig, zunächst das optimale Konzentrationsverhältnis Primer fw/ Primer rev zu bestimmen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationskombinationen der beiden Primer getestet und ermittelt, welche Kombination die niedrigsten CT-Werte ergab, mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse konnte das Entstehen von Primerdimeren und Nebenprodukten beurteilt werden.

	Forward Primer (nM)		
Reverse Primer (nM)	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	300/50	300/300	900/300
900	900/50	300/900	900/900

Tab. 2: Primer-Matrix

2.6.4.2 Primereffizienz

Nachdem die optimale Konzentrationskombination eines Primerpaares ermittelt wurde, musste nun noch die Effizienz des Primers bestimmt werden. Dazu wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve erstellt, es wurden verschiedene Verdünnungen der Ausgangs-DNA in die PCR eingesetzt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, jeweils 3-fach Bestimmungen).

Unter Annahme einer 100%igen Effizienz sollte pro Zyklus eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorherigen Zyklus erfolgen. Hierfür gilt die Formel:

$$Y=X(1+E)^n$$

(Y: hergestelltes Amplifikat, X: Startkopienzahl, E: Effizienz der Reaktion, n: Anzahl der Zyklen)

Zur Erstellung einer Standardkurve wird diese Gleichung logarithmiert:

$$\log Y = \log X + n \log (1+E)$$

Graphisch wird der CT-Wert über dem log der Startkopienzahl aufgetragen:

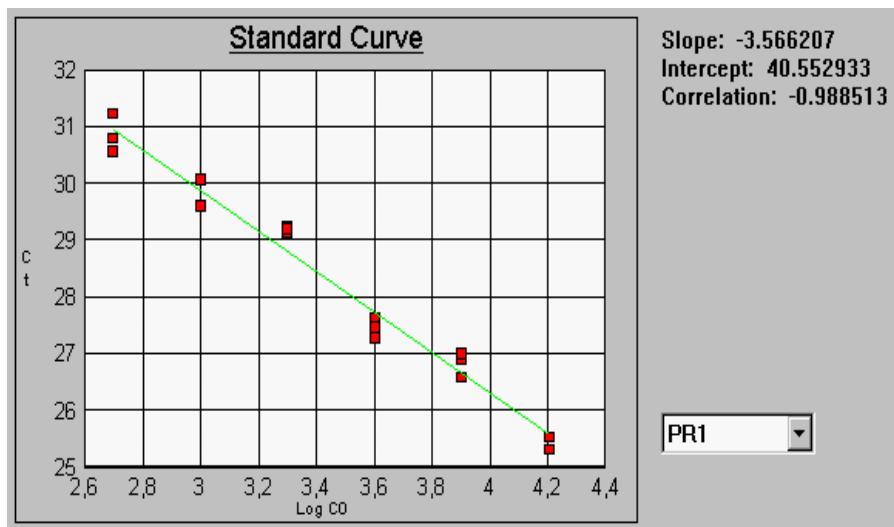


Abb. 4: Standardkurve von α -MHC

Daraus leitet sich die Steigung der Geraden ab:

$$s = -1/\log (1 + E)$$

Aus dieser Gleichung errechnet sich anhand der von der SDS-Software bei der Standardkurvenherstellung gelieferten Daten die Effizienz der Reaktion:

$$\log (1 + E) = 1/s$$

$$1 + E = 10^{1/s}$$

$$E = 10^{1/s} - 1$$

Für das oben gezeigte Beispiel ergibt sich daraus eine Effizienz von 0,91.

Die Effizienz sollte zwischen 0,9 und 1,0 liegen um einen möglichst optimalen Ablauf der Reaktion zu gewährleisten. Sie liegt umso höher, je kürzer das generierte Amplicon ist. Daher sind Amplicons mit einer Länge zwischen 50 und 75 bp wünschenswert. Zusätzlich ist darauf zu achten, dass sich die Effizienz eines Primers nicht zu sehr von der des eingesetzten Housekeeping-Gens unterscheidet, um sicher zu gehen, dass eine relative Quantifizierung möglich ist.

Primer	Konzentration	Effizienz
ANF	900/900	0,97
α -MHC	900/900	0,99
β -MHC	300/300	0,83
cardiac actin	300/300	0,85
MLC2	300/300	0,97
MyoD	300/300	0,9
Myogenin	300/300	1
HPRT	300/300	0.91

Tab. 3: Konzentrationen und Effizienzen der verwendeten PCR-Primer (hier: HPRT)

α -MHC (α -myosin heavy chain)

fw: 5'-AAC-GCC-CAA-GCC-CAC-TTG-AA-3' (Basenpaarposition 4973-4992)

rev: 5'-CAT-TGG-CAC-GGA-CTG-CGT-CA-3' (5014-5033)

Amplicon: 61 bp

β -MHC (β -myosin heavy chain)

fw: 5'-GAG-CCT-CCA-GAG-TTT-GCT-GAA-GGA-3' (4942-4965)

rev: 5'-TTG-GCA-CGG-ACT-GCG-TCA-TC-3' (4982-5001)

Amplicon: 60 bp

ANF (atrial natriuretic factor)

fw: 5'-TCG-CAA-AAG-ATC-CCA-AGC-CCT-T-3' (546-567)

rev: 5'-AGT-GGC-AAT-GCG-ACC-AAG-CTG-T-3' (579-601)

Amplicon: 56 bp

CAA (cardiac- α -actin)

fw: 5'-CCA-CAG-ATT-TGG-TGT-GCG-ACA-3' (98-118)

rev: 5'-CAT-CAT-CAC-CCG-CAA-AGC-CAG-3' (140-160)

Amplicon: 63 bp

MLC-2 (myosin light chain-2)

fw: 5'-AAA-GGA-GCT-GAC-CCG-GAG-GAG-A-3' (293-314)

rev: 5'-TCA-GCG-ACC-CTT-TGC-CTT-CG-3' (346-365)

Amplicon: 73 bp

HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase)

fw: 5'-GCG-GCA-AGT-TGA-ATC-TAC-AAG-AGT-CCT-3' (690-716)

rev: 5'-ACG-TCT-GCT-AGT-TCT-TTA-CTG-GCC-ACA-3' (722-748)

Amplicon: 59 bp

2.6.5 Ansetzen der PCR

Um Pipettierungenauigkeiten zu vermeiden und Konzentrationsunterschiede auszugleichen, ist es sinnvoll, so wenig Pipettierschritte wie möglich durchzuführen. Es ist hilfreich, zunächst einen Mastermix für alle Proben anzulegen.

Ansatz 1:

- Primerpaar in der vorher durch Optimierung bestimmten Konzentration
- Auffüllen mit Aqua bidest. auf 11,5 μ l je Reaktion
- Gesamt: 11,5 μ l x Anzahl der Proben

Ansatz 2:

- 1 μ l cDNA pro Primer
- je 12,5 μ l SYBR® Green PCR Master Mix
- Gesamt: 13,5 μ l x Anzahl der Gene

Pro well einer 96-well Mikrotiterplatte wurden abschließend 11,5 µl aus Ansatz 1 und 13,5 µl aus Ansatz 2 pipettiert, das ergab ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl je Reaktion. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.7 Protein Extraktion

2.7.1 Verwendete Materialien

- PBS
- Trypsin / EDTA, (GibcoBRL)
- Proteasehemmercocktail (Complete, 1:25), (Roche)
- RIPA-Lysepuffer (1 l, Stocklösung 50 mM) :
 - 50 ml 1M Tris, (Serva)
 - 50 ml 3M NaCl, (Merck)
 - 10 ml NP4O (IGEPAL), (Sigma)
 - 50 ml 10 % Sodiumdeoxcholate (NaDoc), (Sigma)
 - 10 ml 10 % SDS, (Serva)
 - 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), (Roche) als Proteaseinhibitor

2.7.2 Durchführung

Für die Proteinextraktion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Pro well wurden 400µl Trypsin/ EDTA hinzugegeben und drei Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von der Kulturplatte zu lösen. Danach gab man vier ml Medium 199 (10 % NBS) hinzu, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Um die Zellen zu konzentrieren, wurden sie in ein 15 ml Falcon überführt und zehn Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Zum Schutz vor Proteasen wurde ein Proteasehemmercocktail (complete) hinzugefügt. Der Extrakt wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, in dieser Zeit wurden die Zellen lysiert. Anschließend zentrifugierte man 20 Minuten lang bei 15000 rpm und 4 °C, der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Danach wurden die Proben bei -70 °C eingefroren.

2.8 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

2.8.1 Verwendete Materialien:

- Protein Assay Reagent, (BioRad), 1:5 in Aqua bidest. verdünnt
- Bovines Serumalbumin (BSA), (Sigma)

2.8.2 Durchführung

Dieser Proteinnachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Proteine. Der Farbstoff Coomassie G liegt in saurer Lösung in der kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) vor. Bei der Bildung der Farbstoff-Protein-Komplexe wird das Gleichgewicht in Richtung der anionischen Form mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm (blau) verschoben.

Für die Proteinbestimmung gibt man 1 ml Bradford-Reagens (BioRad) in eine Plastikkuvette und fügt 1 µl des jeweiligen Proteinextraktes hinzu. Nach drei, jedoch nicht später als nach zehn Minuten, wird die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Als Vergleichsstandard dient eine mit BSA erstellte Eichgerade, durch Interpolation wurde die entsprechende Proteinmenge bestimmt.

2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.9.1 Verwendete Materialien

SDS-Gele (Mini, je 2 Gele, 20 ml):

	8% Trenngel	12% Trenngel	Sammelgel
40 % Acrylamid, (Roth)	4 ml	6 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8 (Serva)	5 ml	5 ml	/
H ₂ O	10,6 ml	8,6 ml	14,6 ml
10 % SDS, (Serva)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
10 % APS, (Sigma)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED, (Sigma)	12 µl	8 µl	10 µl
1M Tris pH 6,8 (Serva)	/	/	2,5 ml

Tab. 4: SDS-Gele

- Isopropanol, (J.T.Baker)
- Laufpuffer 1 x SDS, (Serva)
- Prestained Proteinmarker, Broad Range, (BioLabs)
- 5 x SDS-Ladepuffer
- 250 mM Tris-Cl (pH 6,8), (Serva)
- 500 mM Dithiothreitol, (Serva)
- 10 % SDS, (Serva)
- 0,5 % Bromphenolblau, (Serva)
- 50 % Glycerol, (Sigma)

2.9.2 Durchführung

Die Gelzusammensetzung ergibt sich aus Tabelle 1.2. Einem Aliquot des Trenngels wurde APS (Ammoniumperoxidsulfat) und TEMED (Tetraethyldiamin) zugesetzt und zunächst das

Fußgel gegossen (ca. 0,5 cm). War das Fußgel erhärtet, wurde das Trenngel gegossen (ca. 2/3 des Gesamtgels) und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Nach ca. 30 Minuten war das Trenngel polymerisiert, das Isopropanol wurde mit Wasser abgespült und eventuelle Flüssigkeitsreste mit Filterpapier entfernt. Nun wurde das Sammelgel gegossen und vorsichtig die Kämme eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, setzte man das Gel in eine Elektrophoresekammer ein und füllte die Kammer mit 1 x SDS als Laufpuffer. Die Proben wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt, fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und zusammen mit dem Marker aufgetragen (25 µl/ Tasche). Dann ließ man die Gele bei 20mA/ Gel laufen.

2.10 Western Blot Analyse

2.10.1 Verwendete Materialien

- **Waschpuffer (2 l):**

- 20 x TBS, (Serva) 100 ml

- 10% Tween20, (Aldrich) 4 ml

- **Blocklösung (100 ml):**

- 5 % Trockenmilch, (DIFCO) 5 g

- 0,01 % Gelatine, (Merck) 500 µl 2 %

- 1 % BSA (Fraktion V), (Sigma) 1g

- 10 % Tween20, (Aldrich) 200 µl

- 20 x TBS, (Serva) 5 ml

- **10 x Blotpuffer (5 l):**

- 151,25 g Tris, (Serva)

- 703,75 g Glycin, (Sigma)

- Aqua bidest. ad 5 l

- Blotting Membran IMMOBILON-P (PVDF), (MilliPore)
- 3 MM Filterpapier (Whatman)
- Roney Kandahar Black India Ink
- ECL Plus Western Blot Detection System, (Amersham Pharmacia)

- **1. Antikörper:**

Smooth-muscle actin monoclonal anti-mouse Antikörper, (Sigma)

α -myosin heavy chain monoclonal anti-mouse Antikörper, (Biocytex)

Ubiquitin polyclonal anti-rabbit Antikörper, (DAKO)

- **2. Antikörper:**

Peroxidase conjugated AffinePure Donkey anti-mouse bzw. anti-rabbit, (Sigma)

2.10.2 Durchführung

Beim Western Blot werden zuvor durch Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Filtermembran (in diesem Fall Polyvinylidenfluorid, PVDF) übertragen (geblottet). Die auf der Membran gebundenen Proteine können dann z.B. im immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und kurz vorbereitet:

- eine Minute 100 % Methanol, (J.T.Baker)
- zwei Minuten H_2O
- fünf Minuten Blotpuffer (s.o.)

Diese Schritte dienen dazu, die hydrophobe Membran zu aktivieren und für Proteine aufnahmefähig zu machen.

Pro Gel wurden sechs 3MM Whatman-Papiere und ein PVDF-Filter auf etwas mehr als Trenngelgröße zugeschnitten und kurz in Blotpuffer getaucht, das Gel wurde kurz in 20 % Methanol und 1 x Blotpuffer inkubiert. Da bei dieser Methode nur eine geringe Puffermenge benötigt wird und die Pufferflüssigkeit auf die Filterpapiere begrenzt ist, wird von so genanntem ‚SemiDry-Blotting‘ gesprochen.

Die Blot-Kammer (Biometra) wurde wie folgt von oben nach unten zusammengesetzt:

Kathode
3 Lagen 3MM Whatman-Papier
Gel
PVDF-Membran
3 Lagen 3MM Whatman-Papier
Anode

Mit einer 5 ml Pipette wurden eventuelle Luftblasen weggerollt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine von minus nach plus erfolgte für ca. eine Stunde bei 250 mA.

Durch Färbung mit India Ink ließ sich die einheitliche Beladung der einzelnen Taschen mit den jeweiligen Proteinextrakten kontrollieren:

- 10 µl India Ink
- 20 µl 20 % Tween20, (Aldrich)
- 2,5 ml 20 x TBS, (Serva)
- ad 10 ml mit H₂O

(10 Minuten färben bei Raumtemperatur, dann zehn Minuten entfärben in 1 x TBS)

Nun wurde die Membran zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran möglichst vollständig abzusättigen und so unspezifischen Hintergrund zu vermeiden.

Der primäre Antikörper wurde entsprechend der gewünschten Konzentration in Blockpuffer verdünnt, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler.

Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran gewaschen:

- 1 x fünf Minuten 1x TBS + 0,02 % Tween20
- 3 x 15 Minuten s.o.

Dann wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (α -mouse- bzw. α -rabbit POD, 1:10000 in Blockpuffer verdünnt) inkubiert.

Nach der zweiten Inkubation wurde wie folgt gewaschen:

- 1 x 5 Minuten 1 x TBS + 0,02 % Tween20
- 3 x 15 Minuten s.o.

Zum Nachweis von Peroxidase-Konjugaten wurde das Luminiszenzsystem ECL Plus von Amersham Pharmacia verwendet. Der feuchte PVDF-Filter wurde eine Minute in einem 1:40

Gemisch der beiden Reagenzien (2 ml Reagens A, 50 µl Reagens B) geschwenkt, sofort in Folie verpackt und zum Entwickeln auf einen Röntgenfilm (Kodak, Xomat, AR 5) aufgelegt.

2.11 Immunfluoreszenz

2.11.1 Verwendete Materialien

- **Fixierungspuffer:**

4 % PFA in PBS

- **Waschpuffer:**

0,02 % Triton-X 100, (Sigma)

0,05 % BSA in PBS

- **Permeabilisierungspuffer:**

0,8 % Triton-X 100

0,05 % BSA in PBS

- **Blockpuffer:**

0,02 % Triton-X 100

1 % BSA in PBS

- **Antikörperpuffer:**

0,02 % Triton-X 100

0,5 % BSA in PBS

- Smooth-muscle monoclonal anti-mouse Antikörper, (Sigma)
- CyTM3 conjugated AffinePure Donkey anti-mouse Antikörper, (Dianova)
- DAPI (Bisbenzimid), (Sigma)

2.11.2 Durchführung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen zunächst in speziellen 8-well Zellkulturkammern (Nunc) kultiviert, die aus einem Glas-Objektträger und einer Polystyrol-Kammer bestanden. Die Kammer konnte nach der Färbung der Zellen entfernt werden, und verursachte so keine Störungen der Fluoreszenz. Pro well wurden 50.000 Zellen plattiert, man beschickte jedes well mit 0,5 ml Kulturmedium. Die Zellkultur und die Stimulationen wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben durchgeführt.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, 15 Minuten in 4 % Paraformaldehyd (PFA, in PBS gelöst) fixiert und 20 Minuten im oben beschriebenen Permeabili-

sierungspuffer permeabilisiert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen 30 Minuten in Blockpuffer inkubiert. Die Antikörper wurden entsprechend ihrer Konzentration in Antikörperpuffer verdünnt, die Inkubation mit dem primären Antikörper α -smooth-muscle-actin und dem sekundären CyTM3-Antikörper erfolgte nacheinander für jeweils eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Zwischen allen Schritten, (mit Ausnahme nach dem Blockierungsschritt), wurden die Zellen drei x drei Minuten, nach den Antikörperinkubationen drei x zehn Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Im Anschluss erfolgte eine zehnmünütige DAPI-Kernfärbung (37 °C, feuchte Kammer).

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden im invertierten Axiovertmikroskop betrachtet.

2.12 Statistische Auswertung

Da es sich bei den vorliegenden Versuchsergebnissen um Daten aus einem biologischen Modell handelt, und zunächst nur kleine n-Zahlen betrachtet wurden, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

3 Ergebnisse

Ausgangspunkt für die vorliegenden Versuche war die Beobachtung, dass sich in einem in unserem Labor etablierten Hypertrophiemodell mit NRCs, die 48h in serumhaltigem Medium kultiviert worden waren, durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems die Entwicklung einer Hypertrophie, (zunächst rein morphologisch im Sinne einer Volumenzunahme), verhindern ließ. Daraufhin sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Proteasominhibitoren auf das Differenzierungsverhalten neonataler Rattenkardiomyocyten (NRC) unter verschiedenen Kulturbedingungen, insbesondere in An- und Abwesenheit Hypertrophie-induzierender Agonisten, untersucht werden.

Dafür wurden die Zellmorphologie, die Expression ausgewählter Markergene auf mRNA-Ebene, der Gehalt exemplarisch betrachteter Markerproteine sowie der zelluläre Einbau eines charakteristischen Strukturproteins betrachtet.

Bei serumfrei kultivierten NRCs konnte gezeigt werden, dass die Zugabe eines Proteasominhibitors die Ausbildung einer charakteristischen Morphologie bewirkte. Dies ließ vermuten, dass eine Proteasominhibition Einfluss auf das Differenzierungsverhalten, insbesondere der serumfrei kultivierten Zellen, hat.

Mit Hilfe der Realtime-PCR wurde auf mRNA-Ebene die Expression ausgewählter Hypertrophie-markergene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Inhibition des Proteasoms die serumbedingte Induktion dieser Gene reduzieren ließ. In serumfrei kultivierten Zellen zeigte sich außerdem ein differentieller Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sich durch Proteasominhibition auch die durch andere hypertrophe Stimuli, wie zum Beispiel bestimmte Wachstumsfaktoren oder Hormone, hervorgerufene Induktion der Hypertrophie-markergene reduzieren bzw. sogar verhindern ließ; am Beispiel von ET-1 konnte dargestellt werden, dass dieser Effekt abhängig von der Konzentration des Proteasominhibitors war.

Mit Hilfe einer Western Blot Analyse wurde exemplarisch der zelluläre Gehalt an α -smooth muscle actin bestimmt. Dabei konnte demonstriert werden, dass eine Proteasominhibition eine Abnahme des Gehalts an α -smooth muscle actin zur Folge hatte. Dieser Effekt ließ sich auch an serumfrei kultivierten, also nicht hypertrophen Zellen dokumentieren.

Die spezifische Inhibition des Proteasoms durch MG132 in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors wurde durch die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine im Western Blot nachgewiesen.

Anhand der Immunfluoreszenzfärbung mit einem α -smooth muscle actin Antikörper konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die unter Proteasominhibition beobachteten morphologischen Veränderungen der NRCs auch mit einer Neuorganisation des kontraktiven Apparats einhergehen.

In Anbetracht der phänotypischen Veränderungen und der bis dahin gewonnenen PCR-Daten schien es denkbar, dass den insbesondere bei den serumfrei kultivierten NRCs beobachteten Befunden ein myogener Effekt des Proteasominhibitors zugrunde lag. Mit Hilfe der Realtime-PCR wurde die Expression zweier Schlüsselgene der myogenen Differenzierung betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms eine verstärkte Expression von MyoD in Anwesenheit von Serum kultivierten Zellen zur Folge hatte. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Expression von Myogenin durch Proteasominhibition supprimiert wurde.

3.1 Morphologie

Morphologische Veränderungen über 48 h

Zunächst wurden NRCs über einen Zeitraum von 48 h kultiviert, ein Teil der aus einer Primärzellpräparation stammenden Zellen in Abwesenheit von Serum, ein anderer Teil in Anwesenheit von 10 % FCS. Im Vergleich zu den serumfrei kultivierten Zellen zeigten die in Anwesenheit von 10 % Serum kultivierten NRCs ein deutlich dichteres Wachstum, die Zellen waren deutlich größer und erschienen vitaler. Dieser rein morphologisch als Hypertrophie interpretierte Effekt konnte durch eine gleichzeitige Inhibition des Proteasomsystems verhindert werden, unter Zusatz von MG132 waren die Zellen deutlich schlanker. Zudem zeigten die Zellen, die in 10 % FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren, in Anwesenheit des Proteasominhibitors eine charakteristische längliche Morphologie mit schlankeren Zellkörpern und schmalen dendritenartigen Ausläufern.

Serumfrei kultivierte NRC zeigten in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG132 ein dichteres Wachstum, die Zellen wirkten insgesamt kräftiger und vitaler, was auch durch eine lebhaftere spontane Kontraktionsfähigkeit im Vergleich zur serumfreien Kultur ohne Zusatz eines Proteasominhibitors sichtbar wurde. Auch in diesen Zellen war die Ausbildung einer charakteristischen Morphologie, gekennzeichnet durch schlanke Zellkörper und längliche Ausläufer, zu beobachten.

Die beobachteten Effekte blieben unter Zusatz von ALLM, einem Inhibitor zytoplasmatischer Proteasen aus, was als Nachweis für die Spezifität der beschriebenen Befunde diente.

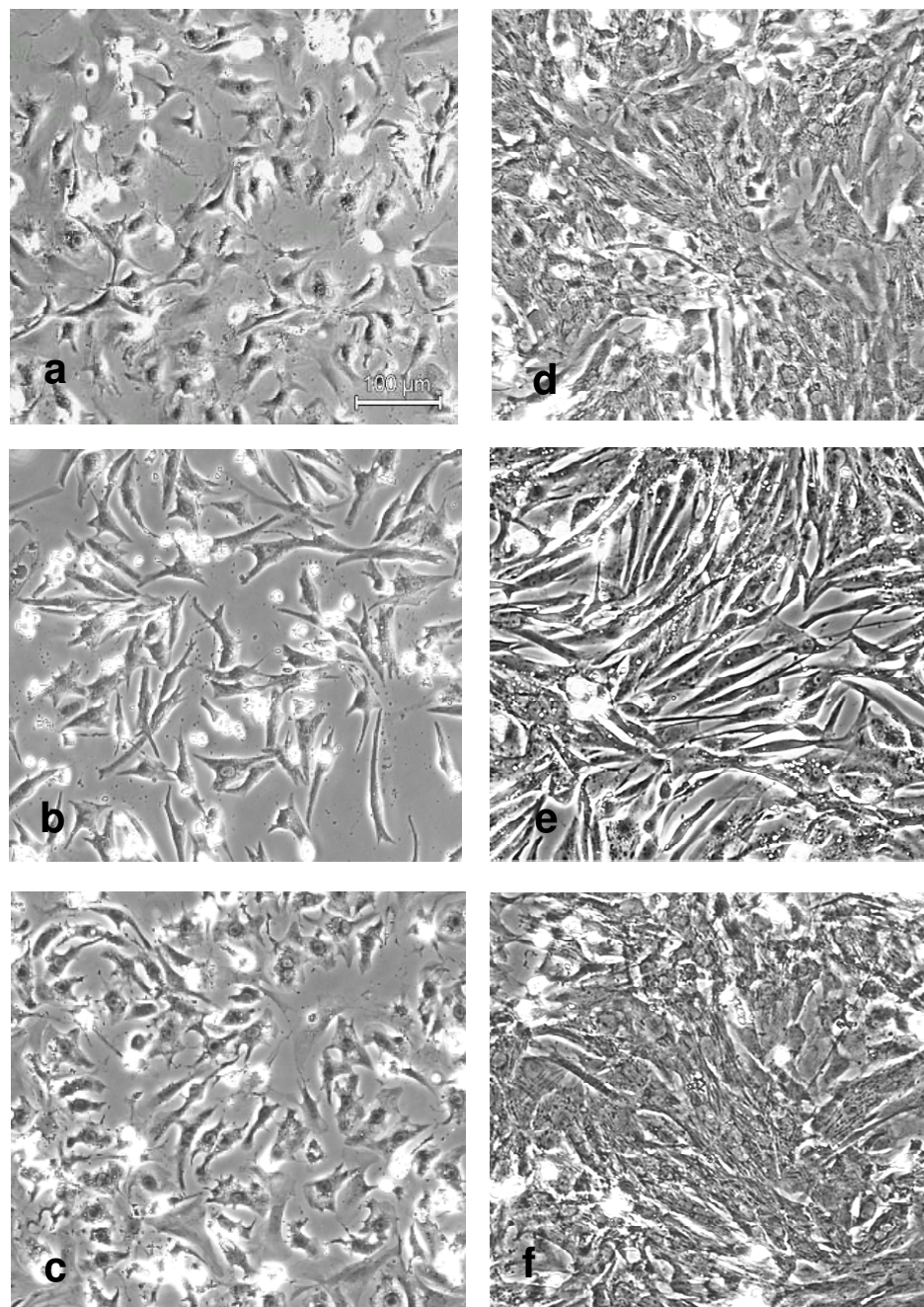


Abb. 5: Phasenkontrastfotos über 48 Stunden kultivierter NRCs

- a-c: ohne Serum
- d-f: +10 % FCS
- a+d: Kontrollen (+DMSO)
- b+e: +1 μM MG132
- c+f: +1 μM ALLM

3.2 Expression der Hypertrophie marker Gene in An- und Abwesenheit hypertropher Agonisten

Im Folgenden wurde die mRNA-Expression der oben genannten Gene in NRCs, die unter unterschiedlichen Bedingungen über 48 Stunden kultiviert worden waren, mit Hilfe der Real-time-PCR relativ quantifiziert.

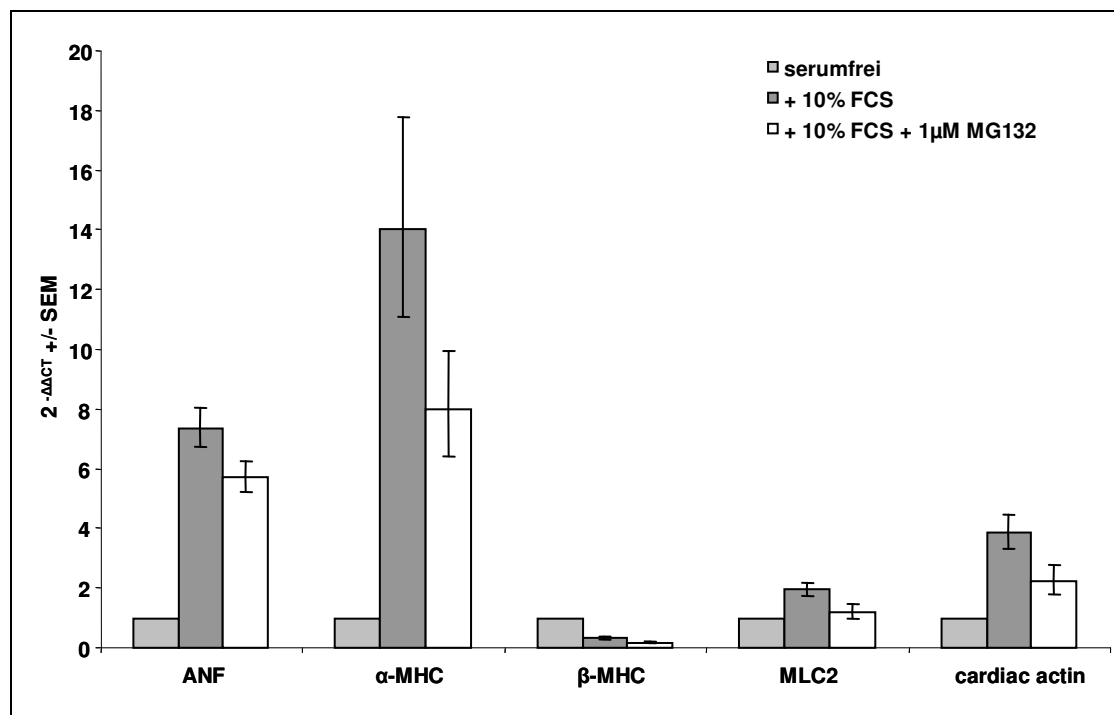


Abb. 6.1: Expression der Hypertrophie marker in NRCs, 48h in An- und Abwesenheit von 10 % FCS kultiviert, + 1 µM MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 mit +/- SEM

Abbildung 6.1 zeigt die Expression der Markergene in serumfrei kultivierten NRCs im Vergleich zu in Anwesenheit von 10 % FCS (mit und ohne Zusatz von 1 µM MG132) gewachsenen Zellen. Zunächst fällt auf, dass sich die Expression aller Markergene, mit Ausnahme von β-MHC, durch die Anwesenheit von Serum als Induktor einer Hypertrophie vervielfacht, im Falle von α-MHC sogar um das etwa 14-fache, und dass diese induzierte Expression durch eine Inhibition des Proteasoms durch MG132 vermindert werden kann. Im Gegensatz zu den anderen Markergenen wird die Expression von β-MHC durch die Anwesenheit von 10 % FCS verringert und durch zusätzliche Gabe von 1 µM MG132 weiter vermindert.

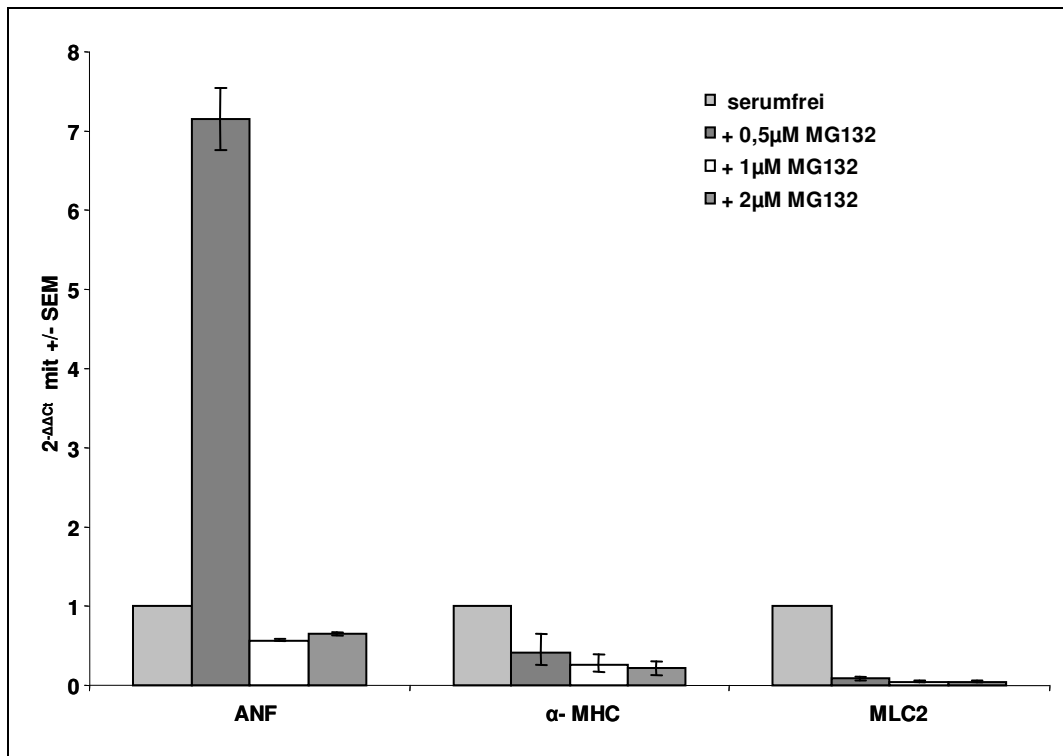


Abb. 6.2a: Expression von ANF, α -MHC und MLC2 in serumfrei kultivierten NRCs + 0,5 bzw. 1 oder 2 μ M MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus $n=2$ mit +/- SEM

In Abbildung 6.2a und 6.2b ist die Expression der Hypertrophiemarker in ausschließlich serumfrei kultivierten NRCs, denen verschiedene Konzentrationen des Proteasominhibitors MG132 zugesetzt wurden, dargestellt. Hier sticht die Expression von ANF hervor. Bei diesem Gen bewirkt die Zugabe des Proteasominhibitors in geringer Konzentration (0,5 μ M) eine massive Induktion (7-fach des Ausgangswertes), wohingegen höhere Konzentrationen (1 und 2 μ M) offensichtlich supprimierend wirken. Insbesondere bei α -MHC, aber auch bei cardiac actin ist eine dosisabhängige Suppression der Genexpression erkennbar. Für β -MHC und Myosin Light Chain2 wird bereits durch Gabe von MG132 in niedrigster Konzentration (0,5 μ M) eine so starke Suppression bewirkt, dass eine weitere Konzentrationserhöhung des Proteasominhibitors keinen zusätzlichen Effekt zeigt.

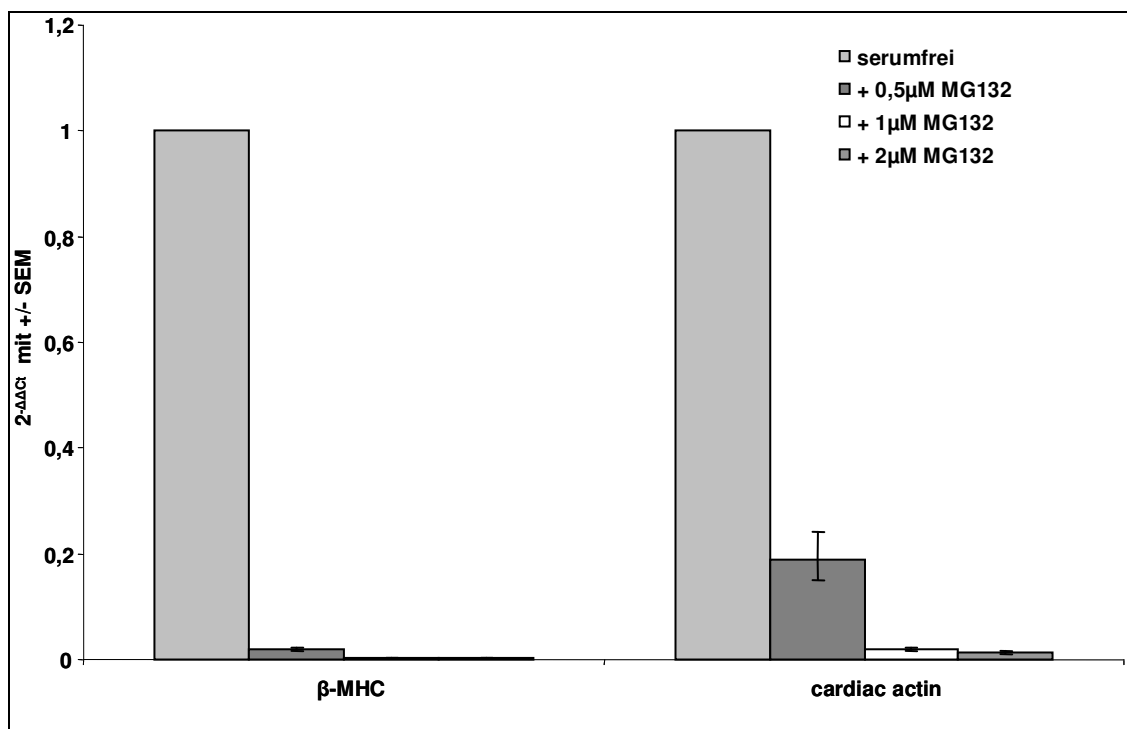


Abb. 6.2b: Expression von β -MHC und cardiac actin in serumfrei kultivierten NRCs + 0,5 bzw. 1 oder 2 μ M MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus $n=2$ mit +/- SEM

Um zu untersuchen, ob die Suppression der durch 10 % FCS induzierten Hypertrophie-markergene durch eine Inhibition des Proteasoms auch für andere Hypertrophie-Agonisten zu zeigen ist, wurde die Expression von ANF und MLC2 als einem frühem und einem spätem Hypertrophie-marker für verschiedene hypertrophe Agonisten relativ quantifiziert. Abbildung 6.3a zeigt die Expression von ANF in NRCs, die unter Zusatz eines Hypertrophie-Agonisten in der angegebenen Konzentration bzw. unter zusätzlicher Gabe von 1 μ M MG132 kultiviert worden waren, im Vergleich zu serumfrei kultivierten Zellen. Die stärkste Induktion von ANF (ca. neunfach des Ausgangswertes) zeigte sich in Zellen, die in Anwesenheit von 10 μ M Isoproterenol kultiviert worden waren. Diese massive Induktion konnte durch Zusatz von 1 μ M MG132 sogar unter den Ausgangswert in der serumfreien Kultur supprimiert werden. Ein ähnlich eindrucksvoller Effekt zeigte sich bei der durch 0,1 μ M Endothelin-1 induzierten Hypertrophie (Induktion auf ca. achtfach des Ausgangswertes, durch Proteasominhibition Suppression auf ca. ein Viertel des Ausgangswertes). Weniger ausgeprägt, aber immer noch deutlich zeigten sich die oben beschriebenen Effekte bei NRCs, die in Anwesenheit von 10 μ M T3, bzw. 0,1 μ M IGF kultiviert worden waren. Der Zusatz von 0,1 μ M TGF- β hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Expression von ANF.

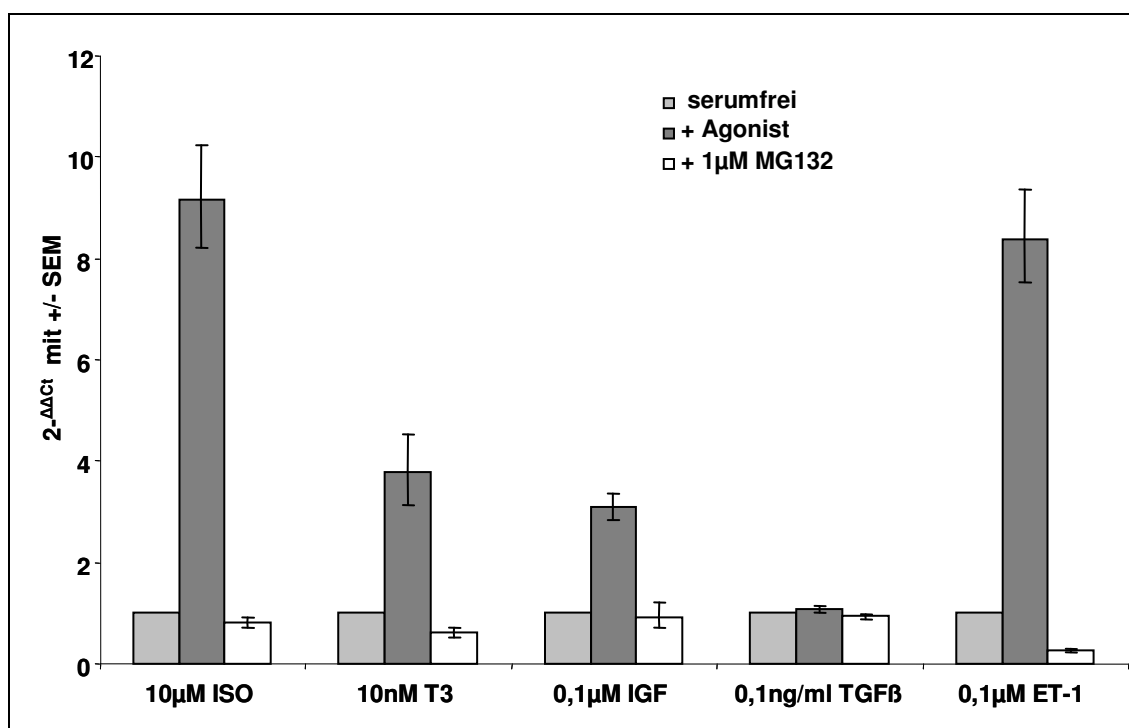


Abb. 6.3a: Expression von ANF in NRCs, die über 48 h in Anwesenheit von 10 μ M ISO; 10 nmT3; 0,1 μ M IGF; 0,1 ng/ml TGF β bzw. 0,1 μ M ET-1 kultiviert wurden, +1 μ M MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 mit +/- SEM

In Abbildung 6.3b wurde die Genexpression von MLC2 in Zellen, die unter oben beschriebenen Bedingungen kultiviert worden waren, analysiert. Für MLC2 zeigte sich im Gegensatz zu ANF die stärkste Induktion durch Zusatz von 0,1 μM IGF (ca. dreifach des Ausgangswertes), wesentlich schwächere, aber immer noch sichtbare Effekte zeigten sich durch die Gabe von 10 μM ISO bzw. 0,1 μM ET-1 (ca. 1,5-fach des Ausgangswertes). Der Zusatz von 10 nM T3 hatte nur einen sehr geringen, Zusatz von 0,1 ng/ml TGF- β , wie bereits bei ANF beobachtet, gar keinen Effekt auf die Expression von MLC2. Durch die zusätzliche Gabe von 1 μM MG132 über 48 Stunden ließ sich die durch alle Hypertrophie-Agonisten induzierte Expression von MLC2 auf ein Minimum weit unter dem Ausgangswert in der serumfreien Vergleichskultur supprimieren.

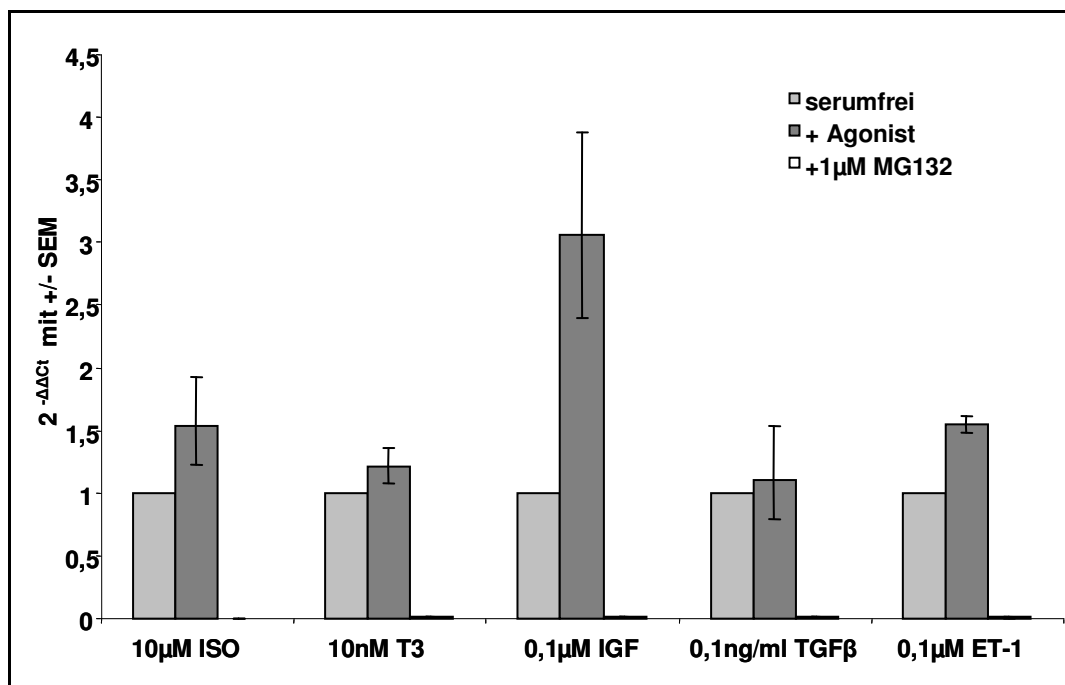


Abb. 6.3b: Expression von MLC2 in NRCs, die über 48 h in Anwesenheit von 10 μM ISO; 10 nmT3; 0,1 μM IGF; 0,1 ng/ml TGF β bzw. 0,1 μM ET-1 kultiviert wurden, + 1 μM MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 mit +/- SEM

Im Folgenden wurde die Expression der Hypertrophiemarkergene in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors am Beispiel der durch 0,1 μM ET-1 induzierten Hypertrophie betrachtet. Abbildung 6.4a und 6.4b zeigen, dass bei einigen der untersuchten Gene die Expression abhängig von der Konzentration des Proteasominhibitors ist. Besonders deutlich wird dies wiederum am Beispiel von ANF. Wie bereits in Abbildung 6.3a sichtbar, bewirkt Anwesenheit von 0,1 μM ET-1 eine ca. achtfache Induktion des Gens. Durch Zusatz von 0,5 μM MG132 kann diese fast auf den Ausgangswert in serumfrei kultivierten NRCs supprimiert werden. Eine Steigerung der MG132 Konzentration auf 1 bzw. 2 μM führt zu einer weiteren Supprimierung der Genexpression. Die Expression von α -MHC wird durch 0,1 μM ET-1 geringfügig vermindert, MG132 in geringer Konzentration (0,5 bzw. 1 μM) führt zu einer weiteren Suppression auf ca. ein Viertel des Ausgangswertes. In höherer Konzentration von 2 μM steigt die Genexpression wieder auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes an, es ist also ein differentieller Effekt des Proteasominhibitors in Abhängigkeit von der Konzentration erkennbar. Bei MLC2, β -MHC und cardiac actin hat bereits eine geringe Konzentration von MG132 (0,5 μM) eine Reduktion der Genexpression auf ein Minimum des Ausgangswertes zur Folge, so dass eine weitere Dosissteigerung ohne nennenswerten zusätzlichen Effekt bleibt.

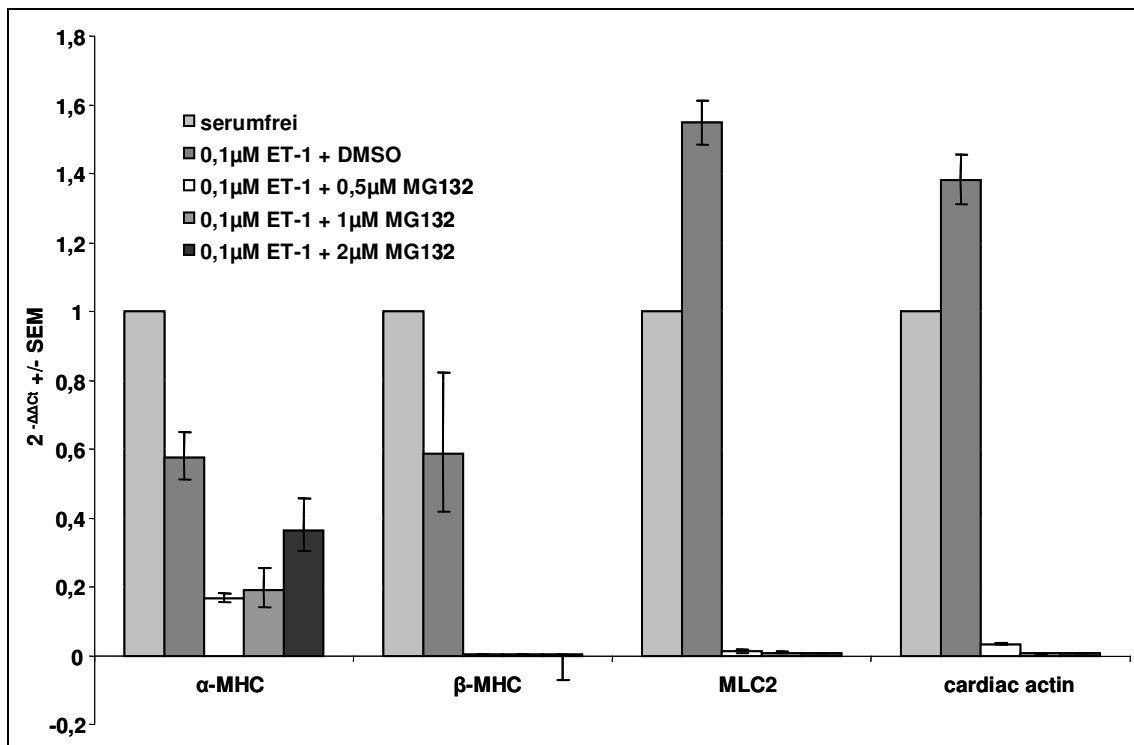


Abb. 6.4a: Expression von α - und β -MHC, MLC2 und cardiac actin in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors am Beispiel von 0,1 μM ET-1, + 0,5 bzw. 1 oder 2 μM MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus $n=2$ mit +/- SEM

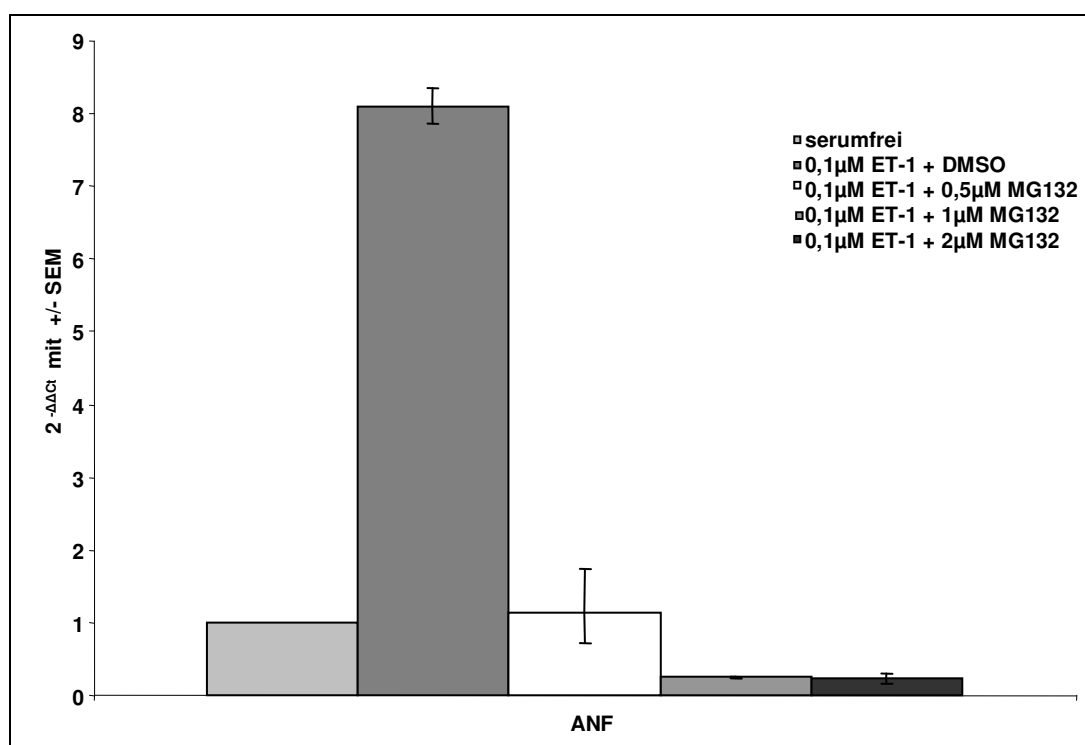


Abb. 6.4b: Expression von ANF in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors am Beispiel von 0,1 µM ET-1, + 0,5 bzw. 1 oder 2 µM MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 mit +/- SEM

3.3 Proteinnachweis von α -smooth muscle actin mittels Western Blot

Um die Effekte einer Inhibition des Proteasoms auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde α -smooth muscle actin (α -smactin) als zusätzliches Markerprotein ausgewählt und die Proteinexpression in An- und Abwesenheit von Serum und MG132 in verschiedenen Konzentrationen betrachtet.

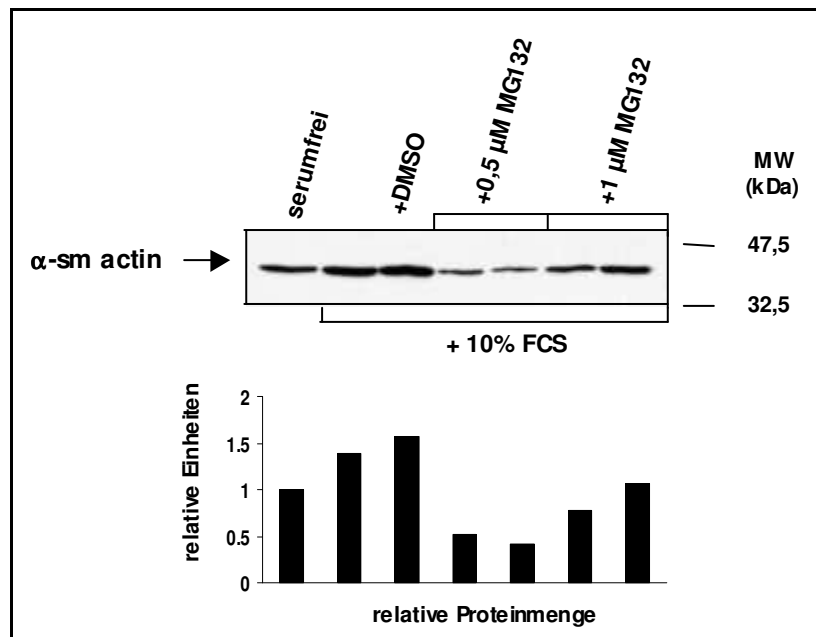


Abb. 7.1: Veränderung der Proteinmenge von α -sm actin nach 48 Stunden Kultivierung in Anwesenheit von 10 % FCS. Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge abgeglichen auf die Kontrolle nach Densitometrie.

Abb. 7.1 zeigt in einem repräsentativen Western Blot den Gehalt an α -sm actin in Zellen, die über 48 Stunden in Anwesenheit von 10 % FCS sowie MG132 in verschiedenen Konzentrationen kultiviert worden waren. Durch Anwesenheit von 10 % FCS erhöhte sich die Proteinmenge um knapp die Hälfte, durch Koinkubation mit MG132 in niedriger Konzentration (0,5 μ M) konnte die Proteinmenge deutlich verringert werden. Bereits diese geringe Menge reichte aus, um die Proteinmenge auf etwa die Hälfte des Wertes in der serumfrei kultivierten Kontrollkultur zu senken. Die Koinkubation mit MG132 in höherer Dosis (1 μ M) hingegen führte nicht zu einer weiteren Verminderung der Proteinmenge, sondern zeigte einen schwächeren, wenn auch immer noch deutlichen Effekt als die geringere Dosis von 0,5 μ M MG132.

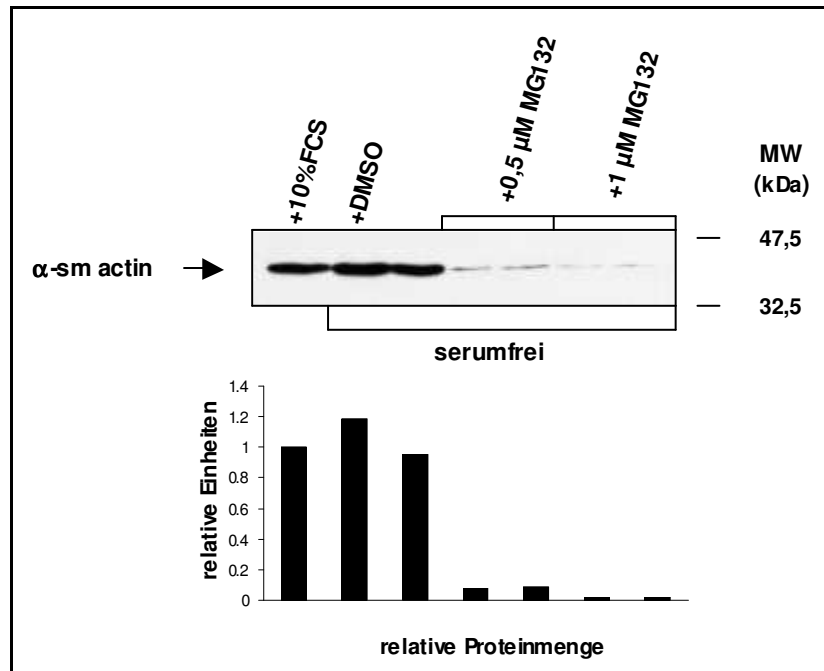


Abb. 7.2: Proteinmenge von α -smooth muscle actin nach serumfreier Kultivierung der NRCs über 48 Stunden, sowie in Kombination mit 0,5 μ M bzw. 1 μ M MG132. Im Diagramm ist die relative Proteinmenge abgeglichen auf die Kontrolle nach densitometrischer Auswertung dargestellt.

In Abbildung 7.2 ist die Menge an α -sm actin in über 48 Stunden serumfrei kultivierten Zellen dargestellt. In diesen Zellen führte die Zugabe von MG132 dosisabhängig zu einer drastischen Verminderung des Proteingehaltes. Bereits durch Koinkubation mit 0,5 μ M MG132 konnte die Proteinmenge auf etwa ein Zehntel des Wertes in den Kontrollzellen gesenkt werden. Dieser Effekt ließ sich durch eine Erhöhung der MG132 Dosis auf 1 μ M noch verstärken.

3.4 Nachweis der Inhibition des Proteasoms durch relative Quantifizierung polyubiquitinerter Konjugate im Western Blot

Um die wirksame Inhibition des Proteasoms nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde die Akkumulation ubiquitinerter Konjugate im Western Blot gezeigt. Abbildung 7.3 zeigt die Menge an polyubiquitinierten Proteinen jeweils in serumfrei und in unter Zusatz von 10 % FCS kultivierten NRCs. In serumfrei kultivierten Zellen konnte bereits bei einer MG132 Konzentration von 0,1 μ M eine effiziente Inhibition des Proteasoms und daraus resultierende Anhäufung ubiquitinerter Proteine gezeigt werden, ein Effekt, der sich dosisabhängig steigern ließ. In NRCs, die in Anwesenheit von 10 % FCS kultiviert worden waren, war erst bei einer Konzentration von 1 μ M MG132 eine wirksame Inhibition des Proteasoms zu sehen.

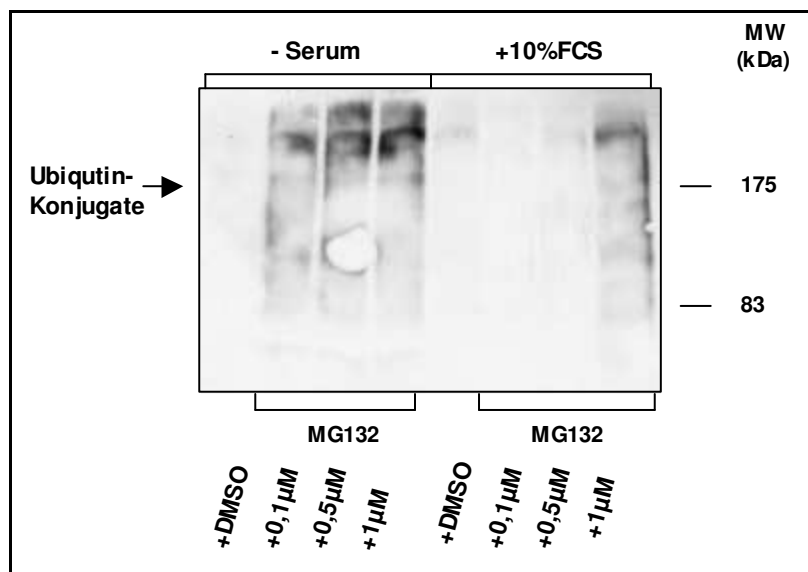


Abb. 7.3: Darstellung der Menge polyubiquitiniertes Proteinen nach 48 Stunden Kultivierung in An- und Abwesenheit von 10 % Serum, sowie jeweils in Kombination mit 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM MG132.

3.5 Darstellung des zellulären Einbaus von α -smooth muscle actin durch Immunfluoreszenzfärbung

Um die Wirkung einer Proteasominhibition auf den zellulären Einbau von Strukturproteinen zu untersuchen, wurden NRCs über 48 Stunden in An- und Abwesenheit von 10 % FCS sowie mit und ohne Zusatz von 1 μ M MG132 kultiviert und anschließend mit einem monoklonalen Maus α -sm actin Antikörper inkubiert, der an einen fluoreszierenden Cy3 Antikörper gekoppelt wurde. Abbildung 8.1 zeigt einen neonatalen Rattenkardiomyozyten, der über 48 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert wurde. Der Kardiomyozyt hatte die typische Morphologie nach Kultur ohne Zusatz von Kälberserum, die Zellfläche war relativ klein, die Zelle bildete nach 48 Stunden keine bzw. sehr kurze Ausläufer. Die Zelle zeigte eine gleichmäßig kräftige, relativ scharf begrenzte Anfärbung für α -smooth muscle actin, die Actinfilamente sind länglich parallel angeordnet und deutlich voneinander abgrenzbar.

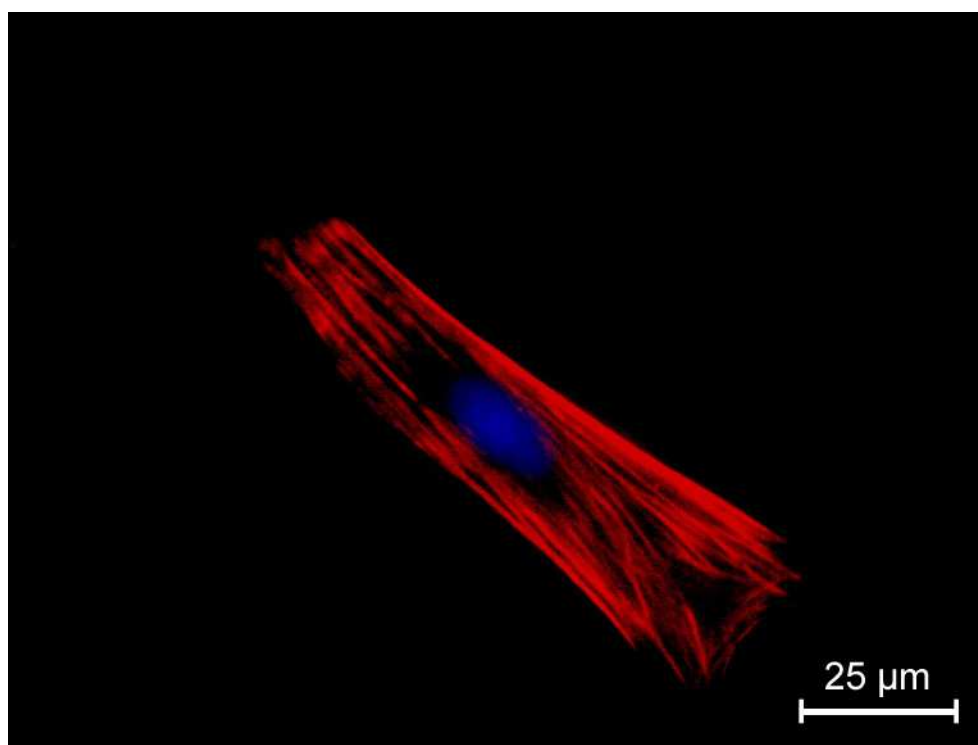


Abb. 8.1: NRC, über 48 Stunden serumfrei kultiviert, Immunfluoreszenzfärbung mit α -smooth muscle actin

In Abbildung 8.2 ist ein Rattenkardiomyozyt nach 48-stündiger Kultur in Anwesenheit von 10 % fetalem Kälberserum zu sehen, er imponierte deutlich größer. Im Gegensatz zur eher länglichen Struktur der serumfrei kultivierten NRCs zeigte er die für die bei Kultivierung unter Zusatz von Serum typische abgeflachte Morphologie mit ausgeprägten, aber eher kurzen Ausläufern. Die Färbung für α -sm actin erschien vor allem zentral um den Kern aufgelockert, die Actinfilamente waren in Anwesenheit von Serum, besonders in der Zellperipherie, weniger deutlich voneinander abzugrenzen.

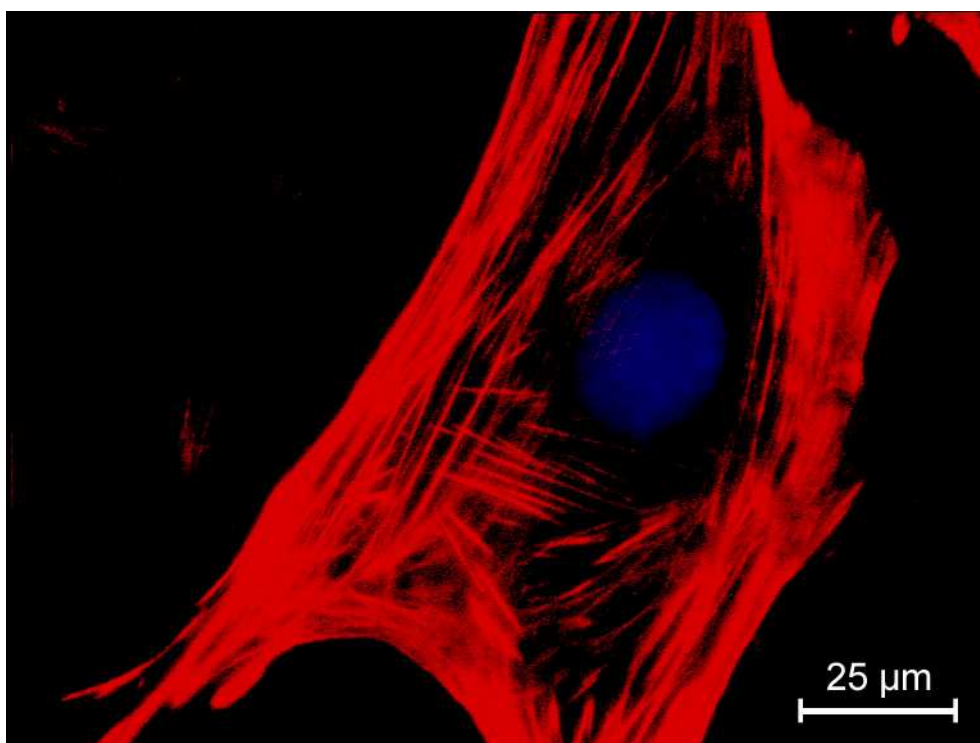


Abb. 8.2: NRC über 48 Stunden in Anwesenheit von 10 % FCS kultiviert.

Bei Koinkubation mit $1\mu\text{M}$ MG132 zeigten NRCs, die in Anwesenheit von FCS kultiviert wurden, eine deutlich diffusere Anfärbung für $\alpha\text{-sm actin}$, die Actinfilamente waren nur noch schwach voneinander abgrenzbar, die Anfärbbarkeit war in der Zellperipherie in den für die Kultivierung unter Zusatz von MG132 charakteristischen langen Ausläufern, am intensivsten, wie in Abbildung 8.3 zu sehen.

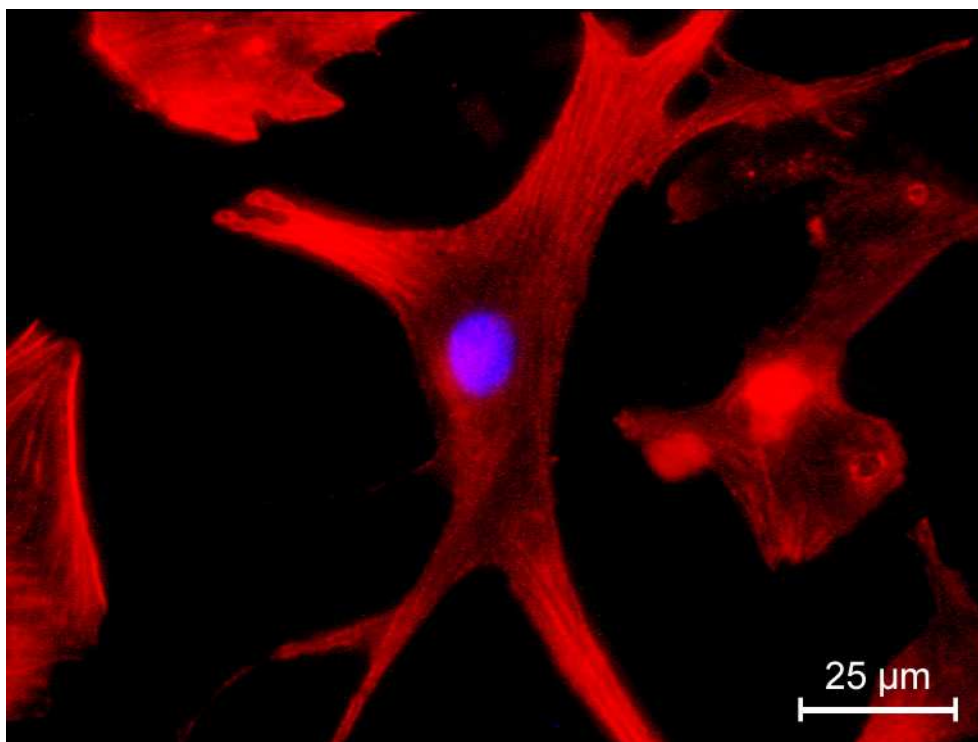


Abb. 8.3: NRC über 48 Stunden in Anwesenheit von 10 % FCS + $1\mu\text{M}$ MG132 kultiviert.

Abbildung 8.4 zeigt einen Kardiomyozyten, der 48 Stunden serumfrei, aber unter Zusatz von 1 μM MG132 kultiviert wurde. Bei der Betrachtung dieser Zellen fiel auf, dass die ebenfalls diffuse Anfärbung für $\alpha\text{-sm actin}$ schwächer, zentral um den Kern sogar ganz aufgehoben war. Im Vergleich zu serumfrei gehaltenen NRCs, die ohne Zusatz von MG132 kultiviert wurden (Abb. 8.1), fiel die eher abgeflachte Morphologie der Zelle und das diffuse staining für $\alpha\text{-sm actin}$ auf, das in den vergleichsweise eher kurzen Zellausläufern am intensivsten war.

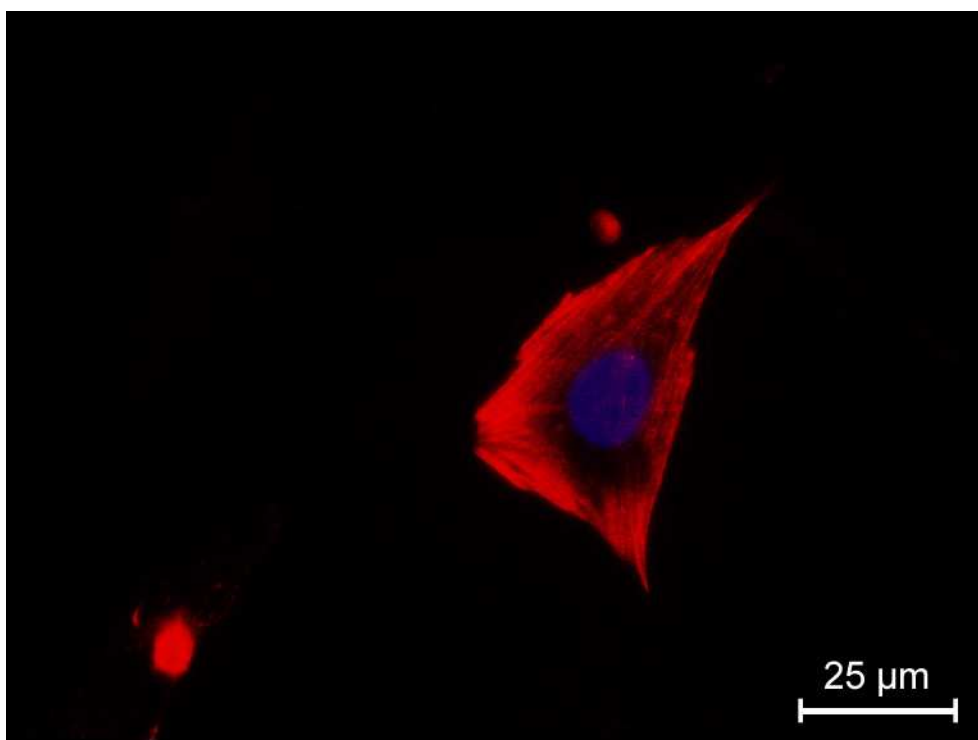


Abb. 8.4: NRC über 48 Stunden serumfrei in Anwesenheit von 1 μM MG132 kultiviert.

3.6 Expressionsanalyse der Gene für MyoD und Myogenin mit Hilfe der Real-time-PCR

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Hypertrophiemarkergenen wurde auch die Expression von MyoD und Myogenin, zweier Gene, die im Rahmen der myogenen Differenzierung eine wichtige Rolle spielen, anhand der Realtime-PCR relativ quantifiziert. Unter der Annahme, dass die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems, insbesondere in serumfrei kultivierten NRCs, einen myogenen Effekt haben könnte, wurde die Expression beider Gene in NRCs betrachtet, die in An- und Abwesenheit von Serum kultiviert worden waren. Zunächst fiel auf, dass MyoD offensichtlich in serumfrei kultivierten Zellen stärker exprimiert wurde (ca. doppelt so viel wie in der serumhaltigen Kultur), während Myogenin in Anwesenheit von Serum ca. doppelt so stark exprimiert war.

Die Inhibition des Proteasoms mit 1 μM MG132 zeigte auf die Expression von MyoD in serumfrei kultivierten NRCs keinen signifikanten Effekt. In den in Anwesenheit von 10 % FCS gewachsenen Zellen wurde MyoD in Anwesenheit von MG132 verstärkt exprimiert (Zunahme der Expression um etwa ein Drittel).

Die Expression von Myogenin wurde durch MG132 deutlicher beeinflusst, in den serumfrei kultivierten Zellen konnte die Expression dieses Gens durch die Inhibition des Proteasoms mit 1 μM MG132 um etwa ein Viertel supprimiert werden. Auch in den mit Serum behandelten Zellen schien MG132 die Myogeninexpression, wenn auch weniger ausgeprägt, zu supprimieren.

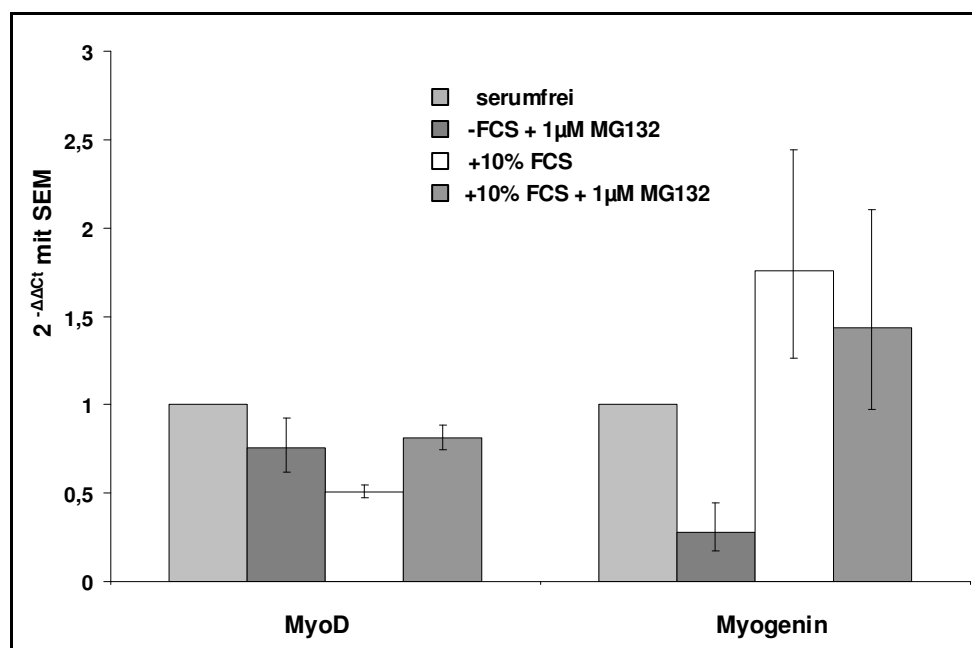


Abb. 9: Expression von MyoD bzw. Myogenin in in An- und Abwesenheit von FCS kultivierten NRCs, + 1 μM MG132, dargestellt sind die Mittelwerte aus $n=2$ mit \pm SEM

4 Diskussion

Basierend auf der Beobachtung, dass in einem etablierten Modell neonataler Rattenkardiomyozyten (NRCs) durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems eine serum-induzierte Hypertrophie, zunächst rein morphologisch, verhindert werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Proteasom am Adaptationsprozess kardialer Myozyten, wie er z.B. bei der Ausbildung einer Hypertrophie vorkommt, beteiligt ist.

Bei der Betrachtung der Morphologie der NRCs zeigte sich, dass die Ausbildung der hypertrophietypischen Morphologie, die die Zellen bei Stimulation mit Serum entwickelten, durch die Inhibition des Proteasoms verhindert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz des Proteasominhibitors, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Serum die Ausbildung einer spezifischen Zellmorphologie bewirkte. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Inhibition des Proteasoms einen generellen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von NRCs hatte.

Mit Hilfe der Realtime-PCR wurde die Expression mehrerer Hypertrophiemarkergene unter verschiedenen Kulturbedingungen und in Abhängigkeit von der Inhibition des Proteasoms relativ quantifiziert. Hierbei wurde zum einen deutlich, dass unterschiedliche Kulturbedingungen die Ausprägung verschiedener Genexpressionsmuster zur Folge hatten, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Markergene durch verschiedene Stimuli durch die Inhibition des Proteasoms supprimiert werden konnte.

Auf Proteinebene konnte mit Hilfe einer Western Blot Analyse gezeigt werden, dass die Proteasominhibition einen verminderten Gehalt an α -smooth muscle actin als weiterem Hypertrophiemarkerprotein zur Folge hatte. Hierbei konnte ein dosisabhängiger Effekt des Proteasominhibitors nachgewiesen werden.

Durch den Nachweis polyubiquitinerter Proteine im Western Blot konnte die wirksame Inhibition des Proteasoms in Abhängigkeit von der Dosis des Inhibitors belegt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in serumfrei kultivierten Zellen bereits geringe, nicht toxische Dosen des Proteasominhibitors genügten, um einen sichtbaren Effekt zu erzielen.

In der Immunfluoreszenzfärbung ließ sich am Beispiel von α -smooth muscle actin nachweisen, dass eine Proteasominhibition den zellulären Einbau von Strukturproteinen beeinflusst. Damit konnte demonstriert werden, dass die Organisation des kontraktiles Apparates zumindest zum Teil über die Aktivität des Proteasoms reguliert wird.

Des Weiteren konnte am Beispiel von MyoD und Myogenin der Nachweis erbracht werden, dass die Behandlung mit MG132 in Kardiomyozyten, wenn auch in geringen Maße, Einfluss auf die Expression dieser Gene nimmt, möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Inhibiti-

on des Proteasoms in kardialen Myozyten eine Differenzierung der Zellen in Richtung Muskelzelle bewirkt.

4.1 Morphologische Veränderungen unter Proteasominhibition

Die Kultur neonataler Rattenkardiomyozyten stellt ein geeignetes und häufig verwendetes in vitro-Modell zur Untersuchung der Vorgänge am Herzen in vivo dar. Im Gegensatz zu in vivo-Modellen ist es in Kultur möglich, den Einfluss einzelner trophischer Faktoren auf Phänotyp und Genexpressionsmuster der Zellen zu untersuchen. Bereits 1982 konnten Simpson et al. zeigen, dass sich in NRCs durch Serum dosisabhängig eine Hypertrophie induzieren ließ (Simpson et al. '82). Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen. Mit der Kultivierung von NRCs in Anwesenheit von 10% fetalem Kälberserum wurde für unser Labor ein in vitro-Modell für die kardiale Hypertrophie etabliert. Unter Zusatz von Serum entwickelten die Zellen eine charakteristische Morphologie, die durch größere Zellkörper und dichteres Zellwachstum gekennzeichnet war, vergleichbar mit Befunden von Eppenberger et al. in adulten Kardiomyozyten (Eppenberger et al. '93; '94).

Der beschriebene Effekt ließ sich durch Inhibition des Proteasoms supprimieren. Bei Behandlung über 48 Stunden reichten relativ geringe Dosen von MG132 bzw. seines potentere und das Proteasom spezifischer inhibierenden Boronatanalogons MG262 (zur Übersicht s. Kisselev + Goldberg 2001) aus, um die Entwicklung einer seruminduzierten Hypertrophie zumindest morphologisch zu verhindern, ohne zytotoxisch zu wirken. Eine Behandlung der Zellen mit einem spezifischen Cathepsininhibitor zeigte keine Wirkung auf die Morphologie der Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich um einen proteasomspezifischen Effekt handelte.

Außerdem fiel auf, dass die Proteasominhibition nicht nur die Ausbildung einer seruminduzierten Hypertrophie supprimierte, sondern zusätzlich die Ausprägung einer charakteristischen Morphologie hervorrief, die durch längliche schlanke Zellkörper und schmale, dendritenartige Zellfortsätze gekennzeichnet war (s. Abb. 5 b und e). Auch in serumfrei kultivierten Zellen bewirkte die Inhibition des Proteasoms die Ausbildung einer charakteristischen Morphologie, ebenso wie in der serumhaltigen Vergleichskultur gekennzeichnet durch eher längliche Zellkörper und schmale Zellfortsätze, diese waren aber in den serumfrei kultivierten Zellen vergleichsweise kurz ausgeprägt. Interessanterweise erschienen diese Zellen in Anwesenheit des Proteasominhibitors insgesamt kräftiger und vitaler als die Zellen in der serumfreien Kontrollkultur. Hierfür könnte der kardioprotektive Effekt der Proteasominhibitoren durch Induktion von Hitzeschockproteinen verantwortlich sein, den auch Stangl et al. beschrieben. Sie konnten zeigen, dass Behandlung mit Proteasominhibitoren die Widerstandsfähigkeit neonataler Rattenkardiomyozyten gegenüber toxischen Einflüssen wie Hitze oder

Hypoxie erhöhte, und dass dieser Effekt mit einer spezifischen Induktion von Hitzeschockproteinen einherging (Stangl et al. 2002).

Unter Umständen stellen die typischen morphologischen Veränderungen, die unter Proteasominhibition in NRCs sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Serum auftraten, einen nicht zell- sondern proteasomspezifischen Effekt dar. Dafür spräche die Tatsache, dass ähnliche Morphologien in unserem Labor auch in anderen mit Proteasominhibitoren behandelten Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen beobachtet wurden. Möglicherweise induziert die Inhibition des Proteasoms eine Differenzierung der Zellen. Für diese Vermutung sprechen z.B. Befunde von Fenteany et al., die zeigten, dass Proteasominhibitoren in Neuroblastomzellen den Auswuchs von Neuriten induzierten (Fenteany et al. '95). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dem Proteasom in diesem Zusammenhang eine Rolle als Negativ-Regulator einer terminalen Differenzierung zukommt.

Da sowohl negative als auch positive Regulatoren des Zellzyklus Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind, spielt das Proteasom eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und ist wesentlich an der Regulierung des Gleichgewichtes von Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Je nach Differenzierungszustand der jeweiligen Zellen und abhängig von den Umgebungsbedingungen kann das Proteasom regulativ in beide Richtungen wirken (Naujokat und Hoffmann 2002).

Der Zellzyklus und damit verbunden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung etc. werden zum einen positiv über die Aktivierung von Cyclinen und „cyclin-dependent kinases“ (CDKs), zum anderen negativ über so genannte „cyclin-dependent kinase inhibitors“ (CDKis) reguliert. Solche CDKis sind z.B. p21 und p27. Beide werden vom Proteasom abgebaut (z. Übersicht s. Brooks et al. '98). Sowohl p21 als auch p27 sind in kardialen Myozyten exprimiert. Capasso et al. vermuten, dass in Kardiomyozyten kurz nach der Geburt der Zellzyklus aktiv arretiert wird. Brooks et al. sehen in der zunehmende Expression von p21 während der embryonalen Entwicklung der Kardiomyozyten einen möglichen Grund dafür, dass die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit verlieren. In reifen Kardiomyozyten findet sich eine besonders hohe Konzentration von CDKis. Engel et al. postulierten, dass die hohe Expression von p21 in ARCs zum Teil für die aktive Zellzyklusarretierung dieser Zellen verantwortlich ist (Engel et al. '98). Während einer kardialen Hypertrophie kommt es zu einer vorübergehend verminderten Expression von CDKis wie p21 und p27 (Brooks et al. '98). Li et al. zeigten, dass eine kardiale Hypertrophie in Folge von Druckbelastung mit einer verminderten Expression von p21 einhergeht, während die Aktivität von Cyclin/ CDK Komplexen aber erhöht war (Li et al. '97). Möglicherweise wirkt p21 hier über einen anderen Mechanismus. In Oligodendrozyten konnte gezeigt werden, dass p21 unabhängig von einer Zellzyklusregulierung einen positiven Effekt auf die Differenzierung der Zellen zeigte (Zezula et al. '01). Möglicher-

weise könnte in unseren Versuchen ein ähnlicher Effekt durch die Stabilisierung von p21 nach Inhibition des Proteasoms vermittelt werden. Tamamori et al. konnten zeigen, dass in NRCs die „over-expression“ von p21 eine serum-induzierte Zunahme des Zellwachstums und der Proteinsynthese sowie die vermehrte Expression von α -sk actin und ANF verhindern konnte (Tamamori et al. '98). Auch Engel et al. beobachteten, dass die ektope Expression von p21 in ARCs die serum-induzierten morphologischen Veränderungen verhinderte (Engel et al. '02).

Betrachtet man die kardiale Hypertrophie als Äquivalent zum proliferativen Zustand im Sinne einer vermehrten Reaktion auf individuell unterschiedliche Wachstumsfaktoren, geht möglicherweise die Verhinderung der Ausbildung einer Hypertrophie durch Inhibition des Proteasoms damit einher, dass das Proliferation/ Apoptose (bzw. Differenzierung)-Gleichgewicht sich in Richtung Differenzierung der Zellen verschiebt. Für diese Hypothese sprechen auch Beobachtungen von Mugita et al. Sie zeigten in Mausmyozyten, dass die Inhibition des Proteasoms zu einer Zellzyklusarretierung führte, die von einer vermehrten Expression von p21, sowie MyoD und Myogenin, zweier Schlüsselgene der myogenen Differenzierung begleitet war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Proteasom u.a. über die transkriptionelle Regulation von myogenen Schlüsselgenen und Zellzyklusregulatorproteinen an der Differenzierung von Muskelzellen beteiligt ist (s.u.) (Mugita et al. '99).

4.2 Expressionsanalyse von Hypertrophiemarkergenen mittels Realtime-PCR

4.2.1 Beeinflussung der Expression von Hypertrophiemarkergenen durch Inhibition des Proteasoms

Die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie als Reaktion auf einen pathologischen oder physiologischen Stimulus resultiert in der Ausbildung eines individuellen Phänotyps, der durch charakteristische Veränderungen der Zellmorphologie, des Proteinhaushaltes und des Genexpressionsmusters gekennzeichnet ist. Neben der allgemeinen Steigerung der RNA-Synthese im Rahmen einer Hypertrophie kommt es zur vermehrten Expression einzelner Hypertrophiemarkergene, die charakteristisch für die Ausbildung einer Hypertrophie sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige dieser Hypertrophiemarkergene ausgewählt (α - und β -MHC, α -sm actin, ANF und MLC2), und die Expression ihrer mRNA mit Hilfe der Realtime-PCR untersucht.

4.2.1.1 Stimulation mit Serum

Bei Kultivierung der NRCs in Anwesenheit von 10% FCS zeigte sich eine vermehrte mRNA Expression aller betrachteten Markergene mit Ausnahme von β -MHC (s. Abb. 6.1). Besonders deutlich war dies im Falle von α -MHC, dessen Expression sich unter Stimulation mit Serum um das etwa 14-fache vervielfachte. Diese Beobachtungen mögen zunächst erstau-

nen, da in adulten Rattenkardiomyozyten eine Hypertrophiereaktion in einer Vielzahl der Fälle eine gegensätzliche Wirkung auf das Genexpressionsmuster zur Folge hat. Häufig kommt es zum so genannten „switch“ der Isoformen, das üblicherweise vermehrt exprimierte α -MHC wird im Zuge einer hypertrophen Antwort herabreguliert, während das normalerweise während der Fetalphase vorhandene β -MHC reexprimiert wird. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es keinesfalls möglich ist, von einer allgemein gültigen „hypertrophen Reaktion“ zu sprechen oder die Hypertrophie allgemein mit einer Rückkehr zum fetalen Genexpressionsmuster gleichzusetzen. Vielmehr sind morphologische und genetische Veränderungen stark abhängig von der Art des hypertrophen Stimulus. Je nach Wachstumsstimulus kommt es zur Ausbildung einer individuellen hypertrophen Antwort, die durch die Ausprägung einer spezifischen Morphologie und eines charakteristischen Genexpressionsmusters gekennzeichnet ist. Die T3-induzierte kardiale Hypertrophie beispielsweise bewirkt in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine vermehrte Expression von α -MHC und verhindert eine Angiotensin II-induzierte vermehrte Expression von β -MHC (Wang et al. 2006),

Hinzu kommt, dass die beobachteten Veränderungen als die Summation von Einzeleffekten zu verstehen sind, da im Serum eine Vielzahl von trophischen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Katecholamine, und eben auch Schilddrüsenhormon (T3) etc. enthalten sind. Folglich resultieren die bei Kultivierung unter Zusatz von Serum beobachteten morphologischen und genetischen Veränderungen aus der Summe der Einflüsse vieler verschiedener trophischer Faktoren, die sich untereinander beeinflussen und miteinander in Wechselwirkung treten.

Experimente legen nahe, dass diese Interaktion unter anderem auf Ebene der Signaltransduktion stattfindet: ein Beispiel dafür sind IGF-I und bFGF, die beide unter Druckbelastung in Rattenherzen vermehrt gebildet werden und eine gegensätzliche Wirkung bezüglich der Sarkomerogenese aufweisen. Während IGF-I in ARC die Expression von α -sm actin und ANF vermindert, den Sarkomeraufbau fördert und somit begünstigend auf eine Differenzierung der Zelle wirkt, zeigt bFGF in ARCs eher den gegensätzlichen Effekt. Es bewirkt die vermehrte Expression von ANF und α -sm actin und hemmt den Aufbau des Sarkomers, wirkt also differenzierungsinhibierend (Gosteli-Peter et al. '96; Harder et al. '96). Für die differentielle Wirkung der beiden Wachstumsfaktoren ist wiederum die Anwesenheit von 1 nm T3 erforderlich, dem in diesem Zusammenhang eine permissive Funktion zukommt (Schaub et al. '97).

Durch Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 konnte die Expression aller Markergene um mindestens ein Viertel vermindert werden, im Falle von β -MHC sogar unter den serumfreien Kontrollwert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Inhibition des Proteasoms die durch Serum induzierte Expression von Hypertrophie-markergenen supprimiert.

4.2.1.2 Expression der Hypertrophiemarkergene in serumfrei kultivierten NRCs (Abb. 6.2)

In serumfrei kultivierten NRCs konnte ein dosisabhängiger Effekt von MG132 gezeigt werden. Am auffälligsten war dieser im Falle von ANF, hier bewirkte der Zusatz von MG132 eine massive Induktion des Gens (etwa siebenfach des Ausgangswertes), höhere Dosen des Proteasominhibitors (1 μ M und 2 μ M) dagegen führten zu einer Suppression der Genexpression sogar unter den Ausgangswert. Hier zeigte sich ein differentieller Effekt des Proteasominhibitors je nach Konzentration.

Eine Erklärung dafür wäre zum Beispiel, dass MG132 in niedriger Dosis in serumfrei kultivierten NRCs stimulierend auf die Transkription der RNA wirkt und so eine vermehrte Expression von ANF induziert. Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte die Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren durch Proteasominhibition sein. So wird z.B. die Mehrzahl der AP-1 Faktoren, eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, zu denen u.a. c-jun und c-fos gehören, über das Proteasom abgebaut. Rosenzweig et al. beschrieben die Existenz eines AP-1 bindenden regulatorischen Elementes, das für die Expression von ANF benötigt wird und in vitro ein c-fos / c-jun Heterodimer bindet (Rosenzweig et al. '91). Möglicherweise führt eine Stabilisierung von AP-1 so zu einer vermehrten Expression von ANF. Im Gegensatz zur vermuteten Induktion der Transkription von ANF führen höhere Dosen von MG132 offensichtlich zu einer Suppression der Genexpression.

Dieser differentielle Effekt auf die Expression von ANF korreliert mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Möglicherweise kommt es je nach Ausmaß der Inhibition zellulärer Proteasen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts der die Genexpression positiv und negativ regulatorisch beeinflussenden Faktoren.

Hierfür spricht die Beobachtung, dass in unserem Labor u.a. an HUVEC Zellen gezeigt werden konnte, dass MG132 in sehr niedrigen Dosen (70 nm) nur die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms hemmte, während die Trypsin-ähnliche Aktivität kompensatorisch hochreguliert wurde und die Caspase-ähnliche Aktivität weitestgehend unbeeinflusst blieb. In hohen Konzentrationen dagegen inhibierte MG132 alle drei Aktivitäten. Diese differentielle Hemmung bzw. kompensatorische Hochregulierung der drei Aktivitäten je nach Konzentration des Proteasominhibitors könnte eine Erklärung für die oben beschriebenen scheinbar gegensätzlichen Beobachtungen sein.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Tatsache, dass das Proteasom neben am Proteinabbau auch an der Regulation verschiedenster anderer zellulärer Prozesse beteiligt ist, so zum Beispiel an der Regulation der Aktivität, Lokalisation und Anzahl von Transkriptionsfaktoren (s.u., Muratani et al. 2003).

Im Falle von α -MHC führte die Inhibition des Proteasoms dosisabhängig zu einer Suppression der Genexpression, wobei im Falle von β -MHC, MLC2 und cardiac actin bereits die

kleinste Dosis von 0,5 μM MG132 ausreichte, um die Expression auf ein Minimum zu supprimieren, so dass eine weitere Dosissteigerung ohne signifikanten Effekt blieb. Hierbei ist zu beachten, dass eine Dosis von 2 μM MG132 vermutlich bereits zytotoxisch wirkte und die Expression dieses Gens hier daher möglicherweise nicht beurteilt werden kann.

4.2.1.3 Expression einzelner Hypertrophiemarkergene in Anwesenheit verschiedener Agonisten (s. Abb. 6.3a + b, 6.4a + b)

Um zu untersuchen, ob die Suppression der durch Serum induzierten Hypertrophiemarkergene durch Proteasominhibition auch für eine durch andere Agonisten ausgelöste Hypertrophie zu zeigen ist, wurde die Expression von zwei der vorher betrachteten Hypertrophiemarker, ANF und MLC2, exemplarisch relativ quantifiziert. Dabei wurde ANF als relativ früh exprimiertes Markergen ausgewählt (Induktion nach etwa sechs bis zwölf Stunden, s. Schaub et al. '97), MLC2 als konstitutiv exprimiertes Strukturprotein, das gewöhnlich erst nach etwa zwölf bis 24 Stunden hochreguliert wird (Lee et al. '88).

Die verschiedenen Agonisten hatten unterschiedliche Effekte auf die Expression der beiden betrachteten Gene, auch die Wirkung des Proteasominhibitors variierte in Anwesenheit verschiedener trophischer Stimuli.

4.2.1.3.1 Isoproterenol

Isoproterenol, das als Agonist sowohl am β 1- als auch am β 2- Rezeptor wirkt, induzierte die Expression beider Markergene. Es bewirkte von allen betrachteten Stimuli die stärkste Induktion von ANF (ca. neunfach des Ausgangswertes). Die Expression von MLC2 wurde durch Stimulation mit 10 μM Iso um etwa die Hälfte gesteigert. Diese Befunde korrelieren mit der Tatsache, dass die typischen transkriptionellen Veränderungen, zu denen es im Rahmen einer über den Gq-Ras-Raf-ERK oder über den PKC Signaltransduktionsweg vermittelten Hypertrophie kommt, üblicherweise einer Stimulation mit α -adrenergen Agonisten zugeschrieben werden können (Hefti et al. '97). Sowohl α - als auch β -adrenerge Agonisten (wie z.B. Isoproterenol) sind in der Lage, eine MEK bzw. ERK Aktivierung zu bewirken, wenn auch über verschiedene Signalkaskaden (Bogoyevitch et al. '96). Simpson et al. konnten bereits 1982 zeigen, dass α - und β -Rezeptor Agonisten in NRCs die Ausbildung einer Hypertrophie bewirken (Simpson et al. '82). Knowlton et al. zeigten, dass α -adrenerge Stimulation in NRCs zur vermehrten Expression von ANF und MLC2 führte (Knowlton et al. '91). Stimulation mit α - oder β -Rezeptor Agonisten hat eine vermehrte mRNA Expression von α -sk actin zur Folge (Martin et al. '96), β -adrenerge Stimulation führt zu einer Anhäufung von α -MHC (Rupp et al. '91), wohingegen eine α -adrenerge Stimulation in einer Akkumulation von β -MHC resultiert (Wasp et al. '90). Es konnte gezeigt werden, dass eine β -adrenerge Stimulation in vitro eine Deorganisation des kontraktiven Apparates zur Folge hat, dieser Ef-

fekt wird vermutlich über einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom vermittelt, der unter α -adrenerger Stimulation nicht zu beobachten ist (Hori et al. '94).

Ebenso wie die Signaltransduktionswege sind auch die resultierenden Phänotypen einer durch Katecholamine induzierten Hypertrophie denen einer durch Stimulation mit Angiotensin II oder Endothelin-1 hervorgerufenen Hypertrophie sehr ähnlich. Sowohl Endothelin-1 als auch α -adrenerge Stimulation bewirken in NRCs eine Zunahme der Zellgröße (Ito et al. '91; Simpson '85). Wie bei einer ET-1 induzierten Hypertrophie können die durch Katecholamin-Stimulation hervorgerufenen phänotypischen Veränderungen in NRCs durch Gabe von Retinolsäure verhindert werden (Zhou et al. '95).

Die beobachtete Induktion der Expression von ANF und MLC2 konnte durch Koinkubation mit MG132 unter den Kontrollwert supprimiert werden, im Falle von MLC2 führte die Inhibition des Proteasoms zur vollständigen Suppression des Gens.

4.2.1.3.2 T3

Die Expression von ANF wurde in Anwesenheit von T3 um das etwa vierfache erhöht, auf die Expression von MLC2 zeigte die Stimulation mit dem Schilddrüsenhormon nur geringen Einfluss (Induktion um etwa ein Viertel). Dazu passen Befunde von Ladenson et al., die zeigten, dass in vivo bei Ratten die Stimulation mit T3 eine vermehrte Expression von ANF bewirkt (Ladenson et al. '88).

T3 ist in Kardiomyozyten an der Regulation einer Vielzahl kardiospezifischer Gene beteiligt und nimmt damit Einfluss auf zentrale funktionelle Prozesse wie kontraktile Funktion und intrazelluläre Ca^{2+} -Verwertung. So enthalten z.B. die Promotorregionen der Gene für α -MHC, α -sk actin und SERCA 2 T3-bindende Elemente. In ARCs bewirkt T3 die Ausbildung einer charakteristischen Morphologie. Abhängig von der T3 Konzentration begrenzt sich die Ausbreitung des myofibrillären Apparates auf das Gebiet um den Zellkern, während das Actin-Zytoskelett von vergleichbaren Veränderungen unbetroffen bleibt. Parallel zu einem verminderten myofibrillären Wachstum kommt es zu einer vermehrten Expression von α -smooth muscle actin. Bezüglich der MHC-Isoformen unterscheidet sich T3 von den anderen beschriebenen Wachstumsfaktoren, es bewirkt eine vermehrte Expression von α -MHC, während die Expression von β -MHC reduziert wird (Schaub et al. '97). Ebenfalls in ARCs wurde beobachtet, dass die spontane Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten mit der Serum T3 Konzentration korreliert, die Schlagfrequenz der Zellen nimmt mit steigender T3 Konzentration zu (Gosteli-Peter et al. '96). Der positiv inotrope und chronotrope Effekt von T3 wird im Gegensatz zu den oben erwähnten direkten Effekten vermutlich über Katecholamine vermittelt (Zimmer et al. '95). So ist beschrieben worden, dass T3 Stimulation in NRCs die vermehrte Expression des β 1-adrenergen Rezeptorgens bewirkt. Vermutlich ist T3 aber zusätzlich auch über andere Signaltransduktionswege wirksam, so wird in aviären Myoblasten

durch Stimulation mit T3 eine terminale Differenzierung der Zellen induziert, ein Effekt, der vermutlich cAMP vermittelt ist (Marchal et al. '95).

Sowohl die T3-induzierte Expression von ANF als auch die Expression von MLC2 konnten durch Inkubation mit 1 μ M MG132 supprimiert werden.

4.2.1.3.3 IGF

Die Inkubation mit IGF führte zu einer deutlich gesteigerten Expression beider Gene, ANF und MLC2 wurden nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor etwa dreimal so stark exprimiert. Für MLC2 zeigte sich IGF als der stärkste Induktor dieses Gens. Diese Beobachtung korreliert mit Daten von Ito et al., die zeigten, dass IGFs in isolierten NRCs eine Hypertrophie induzieren und die verstärkte Expression von ventrikulärem MLC2 und anderen kontraktile Proteinen wie inhibitorischem Troponin I bewirken, auch α -sk-actin wird nach Stimulation mit IGF I vermehrt exprimiert (Ito et al. '93 + '94; Fuller et al. '92). Florini et al. beobachteten, dass IGF I in NRCs zu einer Hochregulierung von β -MHC führt (Florini und Ewton '92). Harder et al. zeigten hingegen in adulten Kardiomyozyten, dass Stimulation mit 500 ng/ml IGF I eine verminderte Expression von ANF zur Folge hatte (Harder et al. '95). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass in neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren unterschiedlich stark exprimiert sind, und die Wirkung der Wachstumsfaktoren abhängig vom Differenzierungszustand des Gewebes ist.

IGFs werden z.B. unter Druckbelastung des kardialen Gewebes vermehrt exprimiert und scheinen an der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie beteiligt zu sein (Turner et al. '88; Donohue et al. '94). Applikation von IGFs nach myokardialer Infarzierung zeigte einen positiven Effekt auf die kontraktile Funktion (Duerr et al. '95). In ARCs ist eine verminderte Expression von α -sm actin (weniger ausgeprägt auch in NRCs) durch IGF-I beschrieben (Donath et al. '94), außerdem bewirkt IGF-I in ARCs ein beschleunigtes Remodelling sowie ein vermehrtes myofibrilläres Wachstum (Eppenberger et al. '96).

Wahrscheinlich spielen IGFs auch eine Rolle im Rahmen der Muskeldifferenzierung. Florini et al. beschreiben die Induktion von Myogenin, einem Schlüsselgen der myogenen Differenzierung, durch IGFs (Florini und Ewton '92).

Die Inhibition des Proteasoms mit MG132 führte zur Verminderung der Expression beider Gene unter den Ausgangswert, im Falle von MLC2 wurde die Expression auf ein Minimum reduziert.

4.2.1.3.4 TGF β

Die Stimulation mit TGF β zeigte keinen nennenswerten Effekt auf die Expression der betrachteten Markergene. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Daten von Brand et al.,

die in NRCs bei Stimulation mit TGF β eine vermehrte Expression von ANF beschrieben. Sie beobachteten außerdem eine Hochregulierung von β -MHC, α -sk muscle actin und α -sm actin, während die Expression von α -MHC vermindert war (Brand und Schneider '95).

TGF β 3 wird z.B. bei Druckbelastung des Herzgewebes auf mRNA Ebene vermehrt exprimiert. Obwohl TGF β sowohl in ARC als auch in NRC alleine nicht in der Lage ist, eine Zunahme der Zellgröße oder des Gesamtproteingehalts zu bewirken, kann es in Kombination mit Isoproterenol eine Hypertrophie induzieren (Schlüter et al. '95). Es könnte daher essentiell für die Ausbildung einer Hypertrophie nach β -adrenerger Stimulation von ARCs sein. So stimuliert in NRCs Isoproterenol die Produktion von TGF β , das wiederum eine Hypertrophie induziert (Long et al. '93). Massague et al. konnten zeigen, dass TGF β die Differenzierung myogener Zelllinien inhibiert (Massague et al. '86). Außerdem verhindert es die Proliferation neonataler Myozyten und die Proteinsynthese skeletaler Myoblasten (Blachowski et al. '95).

Die Koinkubation mit MG132 zeigte keinen Effekt auf die Expression von ANF, die MLC2 Expression hingegen wurde durch die Inhibition des Proteasoms, auch ohne vorherige Induktion des Gens, vollständig supprimiert.

4.2.1.3.5 Endothelin-1

Stimulation mit ET-1 bewirkte eine vermehrte Expression beider Markergene. Im Falle von ANF kam es zu einer massiven Induktion um das etwa achtfache des Ausgangswertes, MLC2 wurde in Anwesenheit des Peptids um den Faktor 0,5 induziert. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten von Sugden et al., die ebenfalls zeigten, dass die Stimulation mit ET-1 in NRCs eine vermehrte Expression von MLC2 und ANF zur Folge hatte. Sie beobachteten außerdem, dass neben early-genes wie c-jun und c-fos zunächst β -MHC und α -sk actin, später auch α -cardiac actin vermehrt exprimiert wurden (Sugden und Bogoyevitch '96). Auch Wang et al. beobachteten eine Induktion der MHC-Isoformen unter Endothelin (Wang et al. '92). Diese durch ET-1 hervorgerufenen charakteristischen Veränderungen auf Transkriptionsebene werden vermutlich über den Gq-Ras-Raf-ERK Signaltransduktionsweg vermittelt, aber auch der Ras-MEKK1-SEK-JNK pathway ist an der Ausbildung einer Hypertrophie als Antwort auf eine ET-1 Stimulation beteiligt (Bogoyevitch et al. '96). In ARCs spielt ET-1 eine Rolle bei der Ausbildung einer Hypertrophie in Folge von Druckbelastung. Eine Blockade des ET-1A Rezeptors hat bei persistierender Druckbelastung eine Verminderung der erhöhten Expression von ANF und α -sk actin mRNA zur Folge (Ito et al. '94).

Die Koinkubation mit MG132 führte zu einer massiven Suppression sowohl von ANF als auch von MLC2, die Expression beider Gene wurde in Anwesenheit des Proteasominhibitors auf ein Minimum unter den Ausgangswert reduziert.

Am Beispiel von ET-1 konnte außerdem gezeigt werden, dass der Effekt des Proteasominhibitors bei einigen der untersuchten Gene dosisabhängig war (s. Abb. 6.4a + b). Besonders deutlich wurde dieser Zusammenhang wiederum am Beispiel von ANF, hier reichte bereits die geringe Dosis von 0,5 μM MG132 aus, um die durch ET-1 um etwa das achtfache vermehrte Expression wieder auf den Ausgangswert zu senken. Dieser Effekt konnte durch Steigerung der Dosis auf 1 μM noch einmal verstärkt werden, eine weitere Dosissteigerung auf 2 μM hatte keinen signifikanten Effekt.

Wie bereits beschrieben, induzierte ET-1 die Expression von MLC2 um etwa den Faktor 0,5, außerdem konnte die Induktion von cardiac actin um etwa ein Viertel gezeigt werden. Wie schon oben erwähnt, korrelieren diese Daten mit Beobachtungen, die Sugden et al. in NRCs machten (Sugden und Bogoyevitch '96). Die MHC Isoenzyme hingegen zeigten in unseren Experimenten eine verminderte Expression nach Stimulation mit ET-1. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Daten von zum Beispiel Sugden et al., sowie Wang et al. (Wang et al. '92), die eine Induktion von β -MHC beschrieben (s.o.). Die scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse könnten möglicherweise dadurch erklärt werden, dass Wang et al. die Genexpression nach 1-24 Stunden bestimmten, während in der vorliegenden Arbeit die Endothelin-Stimulation über 48 Stunden durchgeführt wurde. In adulten NRCs findet die Reexpression fetaler Gene normalerweise nach ca. sechs bis 20 Stunden statt (Hefti et al. '97). So wäre eine mögliche Erklärung für die o.g. scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse, dass nach 48 Stunden Stimulation die initial vermehrte Genexpression der MHC-Gene wieder abfällt.

Bei cardiac actin und MLC2 genügte die geringe Dosis von 0,5 μM MG132, um die Genexpression vollständig zu supprimieren, eine Dosissteigerung zeigte keinen weiteren Effekt, auch im Falle von α -MHC war kein dosisabhängiger Effekt von MG132 zu erkennen. Bei der scheinbaren Induktion dieses Genes nach Stimulation mit 2 μM MG132 handelt es sich wahrscheinlich um ein Artefakt, da diese Konzentration über 48 Stunden einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen haben dürfte.

Die vorliegenden mRNA Daten lassen darauf schließen, dass die Inhibition des Proteasoms die Expression der betrachteten Markergene beeinflusst. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Expression der durch verschiedene trophische Stimuli induzierten Markergene durch Proteasominhibition supprimiert wurde. In serumfrei kultivierten NRCs zeigte sich ein differentieller Effekt des Proteasominhibitors in Abhängigkeit von der Dosis. Die Tatsache, dass die Expression des als Housekeeping-Gen verwendeten HPRT von der Inhibition des Proteasoms unbeeinflusst blieb, lässt darauf schließen, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen nicht um einen allgemeinen transkriptionellen Effekt auf die Expression aller

Gene handelte, sondern vielmehr spezifisch die Expression kardialer Markergene beeinflusst wurde.

Es bleibt die Frage offen, ob die beobachteten Effekte direkte Effekte von MG132 sind, oder ob sie über eine Regulierung der Transkription z.B. durch Interaktion mit Signaltransduktionskaskaden vermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit könnte die Beeinflussung der RNA-Stabilität durch die Inhibition des Proteasoms sein. Andere Versuche in unserem Labor zeigten allerdings, dass die Inhibition des Proteasoms in mit Isoproterenol stimulierten Zellen einen verminderten Proteingehalt von BNP (brain natriuretic peptide) bewirkte, einem im Ventrikel gebildeten ANF Analogon, das ebenfalls als sensibler Hypertrophiemarker gilt. Diese Befunde sprechen eher für eine transkriptionelle Beeinflussung der ANF Expression. Eble et al. postulierten hingegen, dass kontraktile Proteine des myofibrillären Apparates, wie z.B. sarcomeric-MHC, vom Proteasom abgebaut werden. Sie beobachteten eine Stabilisierung dieses Proteins nach Proteasominhibition (Eble et al. '98).

4.3 Einfluss der Inhibition des Proteasoms auf die Proteinexpression am Beispiel von α -sm actin

Bei α -sm actin handelt es sich um eine Actin Isoform, die typischerweise in Skelettmuskel und in glatten Muskelzellen vorkommt. α -sm actin ist ein typisches Hypertrophiemarkerprotein, es gehört zu einer Gruppe fetaler Gene, die im Rahmen einer hypertrophen Reaktion vermehrt exprimiert werden (Eppenberger und Flamme '90). Die Stimulation der NRCs mit 10 % FCS resultierte in einer geringfügigen Zunahme der Proteinmenge. Durch die Inhibition des Proteasoms nahm die Proteinmenge in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors deutlich ab. Dabei war interessanterweise zu beobachten, dass die geringere Dosis von 0,5 μ M MG132 einen größeren Effekt zeigte als die Dosis von 1 μ M (s. Abb. 7.1).

Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnten möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass eine Proteasominhibition nicht nur den Abbau, sondern auch die Transkription von α -sm actin beeinflusst. Über die Regulation von Lokalisation, Aktivität und Anzahl von Transkriptionsfaktoren hat das Ubiquitin-Proteasom-System einen maßgeblichen Einfluss auf die zelluläre Transkription (Muratani et al. 2003). Eine Inhibition des UPS führt zu umfassenden Veränderungen des transkriptionellen Status der Zelle bis hin zur Induktion einer Apoptose (Mitsiades et al. 2002). Unter anderem am Beispiel von Smad2 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Transkriptionsfaktoren eng an ihren proteolytischen Abbau gebunden ist (Lo et al. '99). So wird eine genaue Transkriptionsregulation ermöglicht, indem die Aktivierung eines Gens an die Synthese seiner Transkriptionsfaktoren gekoppelt ist. Für die Vermittlung nicht-toxischer spezifischer benefizieller Effekte scheint die Dosierung des Proteasominhibitors eine zentrale Rolle zu spielen. Eine aktuelle Arbeit aus unserem Labor zeigte, dass in Endothelzellen eine Inhibition des Proteasoms dosisabhängige Effekte zum

einen auf die Transkription, zum anderen auf die Stabilisierung des posttranslationalen Proteins je nach Effektivität der Hemmung hatte (Meiners et al. 2006). In dieser Arbeit induzierten niedrige Dosierungen des Inhibitors ein protektives Genexpressionsmuster, während durch hohe Dosierungen eine pro-apoptotische Antwort vermittelt wurde. Diese Daten korrelieren mit vielfältig beschriebenen benefiziellen Effekten von Proteasominhibitoren auf unterschiedlichen Zelltypen, wie Muskel- und Endothelzellen, neuronale Zellen, Osteoklasten, Osteoblasten, und in verschiedenen Tiermodellen (Garrett et al. 2003; Ding et al. 2003; Meiners et al. 2006; Stangl et al. 2004; Zavrski et al. 2005).

In serumfrei kultivierten Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten, bereits 0,5 μM MG132 führten zu einer drastischen Reduktion der Proteinmenge auf ein Minimum des Ausgangswertes, durch Dosiserhöhung konnte dieser Effekt nur noch geringfügig gesteigert werden (s. Abb. 7.2). Die eindrucksvollere Abnahme der Proteinmenge in serumfrei kultivierten NRCs im Vergleich zu den in Anwesenheit von Serum kultivierten Zellen ist vermutlich durch die bereits beschriebene Tatsache zu erklären, dass Serum eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren enthält, deren Auswirkungen auf die Expression des betrachteten Proteins sich summieren. So ist beispielsweise eine Erhöhung des Proteingehaltes an α -sm actin in NRCs bei Stimulation mit bFGF oder T3 beschrieben, während Behandlung mit IGF einen gegenteiligen Effekt zeigt (Harder et al. '98).

Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass die Behandlung mit Proteasominhibitoren nicht nur die mRNA Expression der betrachteten Markergene beeinflusst, sondern offensichtlich auch Veränderungen auf Ebene des Gehaltes bestimmter Markerproteine bewirkt

4.4 Nachweis der Inhibition des Proteasoms

Um die wirksame Inhibition des Proteasoms nachzuweisen, wurde die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine im Western Blot gezeigt. Dabei wurde deutlich, dass in NRCs, die in Anwesenheit von Serum kultiviert worden waren, erst bei einer Dosis von 1 μM MG132 eine wirkungsvolle Inhibition des Proteasoms demonstriert werden konnte, während in serumfrei kultivierten Zellen bereits die geringe Dosis von 0,1 μM eine sichtbare Akkumulation der Proteine bewirkte (s. Abb. 7.3). Dieser Effekt konnte dosisabhängig gesteigert werden. Diese Beobachtungen korrelieren mit den auf Proteinebene gezeigten Befunden, in denen in serumfrei kultivierten Zellen die gleiche Dosis des Proteasominhibitors eine wesentlich stärkere Reduktion des Proteingehaltes bewirkte. Ein Grund dafür, dass in in Anwesenheit von Serum kultivierten Zellen eine höhere Dosis MG132 benötigt wurde, um das Proteasom effektiv zu inhibieren, könnte sein, dass der Proteasominhibitor möglicherweise bereits zum Teil von Serumbestandteilen abgefangen wird, und so gar nicht erst in die Zelle gelangen kann. Mög-

licherweise beeinflusst auch die serum-induzierte Signaltransduktionskaskade die Aktivität des Proteasoms.

4.5 Beeinflussung des zellulären Einbaus von α -sm actin durch die Inhibition des Proteasoms

Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Proteingehalt von α -sm actin (s.o.), sondern auch der Einbau dieses Strukturproteins in das Zytoskelett durch die Inhibition des Proteasoms beeinflusst wurde. In serumfrei kultivierten NRCs zeigte die gesamte Zelle eine kräftige Anfärbbarkeit für α -sm actin, die Actinfilamente waren parallel angeordnet und deutlich abgrenzbar (s. Abb. 8.1). Bei Koinkubation mit MG132 waren die Actinfilamente eher diffus angeordnet und schwächer angefärbt, was für eine Desorganisation des kontraktilen Apparates und einen Ausbau von α -sm actin aus dem Zytoskelett spricht (s. Abb. 8.4). Offensichtlich führte die Behandlung mit dem Proteasominhibitor zu einer Umstrukturierung des zellulären α -sm actins, dass nicht mehr gleichmäßig über die Zelle verteilt vorlag, sondern sich vor allem in der Zellperipherie organisierte, während das Gebiet um den Zellkern praktisch nicht angefärbt wurde.

In Zellen, die mit 10 % FCS stimuliert worden waren, zeigte sich eine ebenfalls kräftige, aber eher ungeordnetere und besonders zentral um den Zellkern aufgelockerte Färbung für α -sm actin als in den serumfrei kultivierten Vergleichszellen (s. Abb. 8.2). Diese Befunde korrelieren mit Beobachtungen von Harder et al., die in ARCs, die in Anwesenheit von Serum kultiviert worden waren, ebenfalls zeigen konnten, dass α -sm actin nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt war, sondern in so genannte stress fibre like structures (SFLS) eingebaut wurde und ebenfalls in der zentral um den Zellkern gelegenen Region nicht anfärbbar war (Harder et al. '96). SFLS dienen während der Sarkomerogenese als „Gerüst“, an das sich vorübergehend exprimiertes α -sm actin möglicherweise als zusätzliches Stützprotein anlagert und so die Organisation des Sarkomers erleichtert (Donath et al. '94).

In den in Anwesenheit von Serum kultivierten Zellen war der Effekt des Proteasominhibitors besonders deutlich, die Actinfärbung erschien deutlich schwächer und diffuser (s. Abb. 8.3). Offensichtlich kam es auch hier zu einem Ausbau des Proteins, das sich wiederum vor allem in die Zellperipherie verlagerte. Diese Beobachtungen korrelieren mit der auf Proteinebene gezeigten verminderten Expression von α -sm actin nach Proteasominhibition. Schaub et al. postulieren, dass in ARCs ein extrem hoher Gehalt an α -sm actin in Zusammenhang mit einem reduzierten myofibrillären Wachstum steht (Schaub et al. '97). Möglicherweise fördert die Inhibition des Proteasoms eine Neuorganisation des myofibrillären Apparates, die mit einer relativ verminderten α -sm actin Expression einhergeht. Dafür spräche auch die Beobachtung, dass serumfrei kultivierte NRCs in Anwesenheit des Proteasominhibitors eine verbesserte Kontraktilität zeigten.

4.6 Beeinflussung der Expression myogener Markergene durch Inhibition des Proteasoms

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Inhibition des Proteasoms sowohl in mit, als auch in ohne Zusatz von Serum kultivierten NRCs die Ausbildung einer Morphologie bewirkte, die der von Skelettmuskelzellen ähnelte, entstand die Vermutung, dass die Proteasominhibition in NRCs möglicherweise eine myogene Differenzierung induziert. Um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten, wurde die Expression zweier myogener Schlüsselgene betrachtet. MyoD (myoblast-determining Gen) und Myogenin gehören zu einer Gruppe von vier ähnlichen Genen (zusammen mit myf5 und MRF4), die eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen spielen (zur Übersicht siehe Olson '93). In bestimmten anderen Zelllinien können diese Regulatorgene skelettmuskelspezifische Gene aktivieren. Die Mitglieder der MyoD Familie zeigen untereinander hohe Sequenzhomologien und kodieren für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die alle eine basic helix-loop-helix (bHLH) Region aufweisen. Diese bHLH Sequenz bindet an eine E-box genannte Sequenz der regulatorischen Region des vom jeweiligen Transkriptionsfaktor kontrollierten Gens (Rawls et al. '98). Obwohl viele der Gene, die über die MyoD/ Myogenin Familie reguliert werden, auch im Herzmuskel vorkommen, werden die Transkriptionsfaktoren, die zur MyoD-Gruppe gehören, im Herz normalerweise nicht exprimiert (Olson '93). Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass bHLH Proteine ebenfalls an der Kontrolle kardialer Transkription beteiligt sein könnten. Dafür spräche die Tatsache, dass bestimmte kardiale Muskelgene, wie z.B. α -cardiac actin oben beschriebene E-box Sequenzen enthalten, von denen einige auch in Skelettmuskel exprimiert sind, und die dort direkt über MyoD etc. reguliert werden. Die Aktivität von HLH Transkriptionsfaktoren wird u.a. über Dimerisierung mit inhibitorischen HLH Proteinen reguliert. Ein solches inhibitorisches HLH Protein ist z.B. Id, das inhibierend auf die Differenzierung skeletaler Myoblasten wirkt (Benezra et al. '90). Id wird auch in kardialen Muskelzellen exprimiert, die verstärkte Expression von Id inhibiert dort z.B. die Aktivität von α -cardiac actin Promotorregionen (Sartorelli et al. 91). Diese Zusammenhänge legen die Vermutung nahe, dass auch kardiale Transkription über bHLH analoge Proteine reguliert wird.

Bounpheng et al. konnten zeigen, dass Id Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden (Bounpheng et al. '99), aber auch MyoD selbst ist Substrat des Proteasoms (Floyd et al. '01).

In den vorliegenden Versuchen wurde die Expression der beiden oben beschriebenen Gene mit Hilfe der Realtime-PCR relativ quantifiziert (s. Abb. 9). Aufgrund der Tatsache, dass die betrachteten Gene in Herzmuskelzellen normalerweise nicht, bzw. in sehr geringem Masse exprimiert werden, sind die beobachteten Veränderungen nur sehr schwach ausgeprägt und mit Vorsicht zu beurteilen. Im Falle von MyoD fällt in mit Serum stimulierten NRCs eine Induktion des Gens um ca. ein Drittel in Anwesenheit des Proteasominhibitors auf. Dazu pas-

sen Befunde von Schneider et al., die zeigten, dass bestimmte Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung von Skelettmuskelzellen blockieren, in kardialen Zellen die Reexpression fetaler Gene induzieren, wie sie im Rahmen einer Hypertrophie vorkommt (Parker et al. '91). Offensichtlich aktivieren exogene Wachstumsfaktoren in Skelettmuskelzellen intrazelluläre Signalkaskaden, die die Aktivität der myogenen bHLH Regulatorproteine dämpfen. Entzug von Wachstumsfaktoren (möglicherweise mit der Inhibition einer kardialen Hypertrophie vergleichbar) führt zur Zellzyklusarretierung und terminalen Differenzierung der Zellen, die muskelspezifische Transkription wird aktiviert (Olson '93). In serumfrei kultivierten NRCs war die Expression von MyoD nicht signifikant verändert.

Bei der Betrachtung der Expression von Myogenin fiel auf, dass die Inhibition des Proteasoms in serumfrei kultivierten NRCs eine Verminderung der Genexpression auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes bewirkte. Die Myogeninexpression in den mit Serum stimulierten Zellen konnte aufgrund der hohen Streuung zwischen den einzelnen Experimenten nicht beurteilt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse darauf hindeuten, dass das Proteasom möglicherweise an der Regulation der Expression muskelspezifischer Gene in NRCs beteiligt ist. Die veränderte Expression dieser Gene könnte ein Hinweis auf eine Änderung des Differenzierungsverhaltens der Zellen in Anwesenheit des Proteasominhibitors sein. Ein möglicher Mechanismus dafür könnte eine Regulation myogener Schlüsselgene auf Transkriptionsebene sein, so wird z.B. auch p300, ein Aktivator von MyoD über das Proteasom abgebaut (Poizat et al. '00). Für diese Theorie sprechen auch Befunde von Mugita et al. (s. Abschnitt 4.1), die zeigen, dass das Proteasom über die transkriptionelle Regulation myogener Schlüsselgene und am Zellzyklus beteiligter Proteine an der Differenzierung von Muskelzellen beteiligt ist (Mugita et al. '99).

5 Zusammenfassung

Den hier durchgeführten Versuchen lag die Beobachtung zugrunde, dass sich in unserem Labor in Vorversuchen mit NRCs durch eine Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems die Entwicklung einer seruminduzierten Zunahme der Zellgröße, zunächst rein morphologisch, verhindern ließ.

Basierend auf dieser Beobachtung sollte untersucht werden, inwiefern es sich bei dieser Suppression der Hypertrophie um einen generellen Einfluss von Proteasominhibitoren auf das Adaptationsverhalten von NRCs handelt.

Als in vitro-Modell diente die in unserem Labor etablierte Kultur neonataler Rattenkardiomyozyten. Zunächst wurden die Zellen auf rein morphologischer Ebene betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Ausbildung des durch die Stimulation mit Serum induzierten morphologischen Phänotyps (gekennzeichnet durch größere Myozyten mit abgeflachten Zellkörpern und kurzen, kräftigen Ausläufern) durch gleichzeitige Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 verhindern ließ. Des Weiteren konnte auch in serumfrei kultivierten Zellen demonstriert werden, dass NRCs bei Behandlung mit dem Proteasominhibitor eine offenbar proteasomspezifische Morphologie entwickeln, die durch eher längliche Zellkörper mit schlanken Zellfortsätzen charakterisiert war, insgesamt erschienen diese Zellen vitaler und kräftiger als die in Abwesenheit von Serum kultivierten NRCs.

Der Einfluss einer Proteasominhibition auf RNA-Ebene wurde mit Hilfe der Realtime-PCR untersucht. Die Zellen wurden sowohl in An- und Abwesenheit von Serum, als auch in Anwesenheit ausgewählter Wachstumsfaktoren kultiviert. Als Vertreter der verschiedenen Substanzklassen wurden Endothelin-1, Insulin-like growth factor (IGF), Isoproterenol als α -adrenerger Agonist und Triiodthyronin (T3) betrachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms sich auch auf die Genexpression der Zellen auswirkte. Es wurden α -myosin-heavy-chain, β -myosin-heavy-chain, α -smooth-muscle-actin, cardiac- α -actin und myosin-light-chain-2 als exemplarische Hypertrophie-markergene ausgewählt. Anhand der Realtime-PCR wurde die Expression dieser Gene unter den jeweiligen Kulturbedingungen relativ quantifiziert.

Für die oben genannten Stimuli war unter Proteasominhibition einheitlich eine verminderte Expression der Hypertrophie-markergene zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems verursachte Suppression der Hypertrophie unabhängig vom jeweiligen Agonisten ist.

Auch auf Proteinebene konnte am Beispiel von α -smooth-muscle-actin die Beeinflussung des Gehalts an Markerproteinen durch Inhibition des Proteasoms gezeigt werden, in Abhän-

gigkeit von der Konzentration des Proteasominhibitors konnte eine Abnahme der Proteinmenge beobachtet werden.

In der Immunfluoreszenzfärbung wurde, wiederum am Beispiel von α -smooth-muscle-actin, demonstriert, dass die Inhibition des Proteasoms die Organisation des kontraktiles Apparates beeinflusste und sich auf den zellulären Einbau von strukturellen Proteinen auswirkte.

Die effiziente Inhibition des Proteasoms in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis MG132 wurde im Western Blot durch die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine nachgewiesen.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Proteasominhibition sowohl in serumfrei als auch in Anwesenheit von Serum kultivierten NRCs die Ausbildung einer Skelettmuskelzellen ähnelnden Morphologie bewirkte, wurde die Expression von MyoD und Myogenin, zweier Schlüsselgene der myogenen Differenzierung, untersucht. Dabei zeigte sich, dass in allen betrachteten Zellen durch MG132 die Expression dieser Gene beeinflusst wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Hypothese bestätigt werden, dass das Ubiquitin-Proteasom-System am Adaptationsprozess neonataler Rattenkardiomyozyten, wie etwa im Rahmen einer kardialen Hypertrophie, beteiligt ist, und dass eine Proteasominhibition eine Suppression der Kardiomyozytenhypertrophie unabhängig vom verwendeten Agonisten induziert.

6 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die gute Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med Karl Stangl und Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation im Molekularbiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Charité durchführen zu können.

Ganz herzlich möchte ich mich vor allem auch bei Frau Dr. rer. nat. Silke Meiners für ihre fortwährende Unterstützung und unermüdliche Geduld bedanken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors, die während meiner Zeit im Labor immer ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatten.

Meinen Mitstreitern auf dem Weg zur Promotion danke ich für die gute Zeit...

Nicht zuletzt möchte ich meiner lieben Familie danken, für alles, und vor allem dafür, dass sie die Hoffnung nicht aufgegeben haben :)...

7 Abkürzungen

ANF	atrial natriuretic factor
α -MHC	α -myosin-heavy-chain
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARA-C	Cytosin- β -Arabinofurasonid
ARC	adult rat cardiomyocytes
α -sk actin	α -skeletal muscle actin
α -sm actin	α -smooth muscle actin
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic helix-loop-helix
β -MHC	β -myosin heavy chain
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serumalbumin
caa	cardiac α -actin
cAMP	cyclic Adenosinmonophosphat
CDK	cyclin-dependent Kinase
CDKi	cyclin-dependent Kinase Inhibitor
cDNA	complementary DNA
CT	threshold cycle
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4'6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	Deoxynucleosid-Triphosphat
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein Ligase

EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	endothelial growth factor
Egr-1	early growth factor 1
ERK 1/2	extracellular signal regulated-Protein Kinase 1/2
ET-1	Endothelin-1
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G _s , G _i , G _q	GTP bindende Proteine
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	IGF binding Protein
I κ B	I kappa B
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Iso	Isoproterenol
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-jun N terminal Kinase (SAPK)
KDA	Kilodalton
L-15	Leibovitz-15 Medium
MAPK	mitogen activated Protein Kinase
MEK	mitogen activated ERK activating Kinase
MEKK	MEK Kinase
MHC I	major histocompatibility complex I
MLC2	myosin light chain 2

M-MLV	Moloney Murine Leukaemia Virus
MRNA	messenger
MYBP-C	myosin binding protein-C
MyoD	myoblast-determining Gen
NBCS	Newborn Calf Serum
NFκB	nuclear transcription factor kappa B
NRC	neonatal rat cardiomyocytes
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	Ras related C ₃ -botulinum toxin Substrat
Raf	eine MAPKK Kinase
Ras	rat sarcoma virus
RNA	ribonucleid acid
rRNA	ribosomale RNA
RSTK	Rezeptor mit Serin-Threonin Kinase Aktivität
RT	reverse Transkription
RTK	Rezeptor mit Tyrosin Kinase Aktivität
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEK	SAPK Kinase

SEM	standard error of means
SERCA	Ca ²⁺ -Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SFLS	stress fibre like structures
Smad	Wirbeltieranalogon des mothers-against-dpp Proteins der Drosophila
STAT	signal transducer and activator of transcription
T ₃	Trijodthyronin
TBP	T ₃ bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TnI	Troponin I
TTP	Thymidintriphosphat
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
UCH	Ubiquitin C-terminale Hydrolase
UNG	Uracil N-Glycosylase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTP	Uracil Triphosphat
VCAM	vascular cell adhesion molecule

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

9 Literaturverzeichnis

Adams J, Behnke M, Chen S, Cruikshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL: Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8:S. 333-338, 1998

An WG, Hwang SG, Trepel JB, Blagoskonny MV: Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21 (WAF1/ CIP 1) and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukaemia* 14: S. 1276-1283, 2000

Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E: The proteasome paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: S. 367-380, 1998

Blachowski S, Motyl T, Orzechowski A, Grzelkowska K, Interewicz B: Comparison of metabolic effects of EGF, TGF-alpha and TGF-beta in primary culture of fetal bovine myoblasts and rat L6 myoblasts. *Int J Biochem* 25: S. 1571-1577, 1993

Black FM, Packer SE, Parker TG Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, Schneider MD: The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J Clin Invest* 88: S. 1581-1588, 1991

Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D, Le Roith D: Signaling via the insulin-like growth factor receptor: does it differ from the insulin receptor signalling? *Cytokine Growth Factor Rev* 7:S. 153 – 159, 1996

Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, Weintraub H: Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 599: S.1-11, 1990

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61(1): S. 49-59, 1990

Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespie-Brown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ, Sugden PH: Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem J* 314: S. 115-121, 1996

Bounpheng MA, Dimas JJ, Dodds SG, Christy B: Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 13: S. 2257-2264, 1999

- Brand T, Schneider MD: The TGF-beta superfamily in myocardium: ligands receptors transduction and function. *J Mol Cell Cardiol* 27: S. 5-18, 1995
- Brooks G, Poolman RA, Li JM: Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 39: S. 301-311, 1998
- Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Thaik CM, Colucci WS: Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 92: S. 2385-2390, 1995
- Capasso JM, Bruno S, Cheng W et al: Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats. *Circ Res* 71: S. 1379-1389, 1992
- Cheng M, Nag AC: Biochemical evidence for cellular dedifferentiation in adult rat cardiac muscle cells in culture: expression of myosin isozymes, *Biochem and Biophys Res Commun* 137 (2): S. 855-862, 1986
- Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO Journal* 17 (24): S. 7151-7160, 1998
- Ciechanover A, Breitschopf K, Hatoum OA, Bengal: Degradation of MyoD by the ubiquitin pathway: regulation by specific DNA-binding and identification of a novel site for ubiquitination.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL: Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: S. 442-451, 2000
- Clarke MS, Caldwell RW, Chiao H, Miyake K, McNeil PL: Contraction induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* 76: S 927- 934, 1995
- Corda S, Mebazaa MP, Gandolfini MP, Fitting C, Marotte F, Peynet J, Charlemagne D, Cavaillon JM, Payen D, Pappaport L, Samuel JL: Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res* 81 (5): S. 679-687, 1997
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: S. 801-847, 1996

Ding Q, Reinacker K, Dimayuga E, Nukala V, Drake J, Butterfield DA, Dunn JC, Martin S, Bruce-Keller AJ, Keller JN: Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS Lett* 546: S. 226-232, 2003

Donath MY, Zapf J, Eppenberger-Eberhardt M, Froesch ER, Eppenberger HM: Insulin-like growth factor-I stimulates myofibril development and decreases smooth muscle alpha-actin of adult cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: S. 1686-1690, 1994

Donohue TJ, Dworkin LD, Lango MN, Fliegner K, Lango RP, Benstein JA, Slater WR, Catanese VM: Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation* 89: S. 799-809, 1994

Drexler HC: Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: S. 855-860, 1997

Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J: Insulin-like growth factor-I enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental heart failure. *J Clin Invest* 95: S. 619-627, 1995

Engel FB, Hauck L, Cardoso MC, Leonhardt H, Dietz R, von Harsdorf R: A mammalian myocardial cell-free system to study cell cycle reentry in terminally differentiated cardiomyocytes. *Circ Res* 85: S. 294-301, 1999

Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R: p21^{CIP1} controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 23: S. 555-565, 2003

Eppenberger-Eberhardt M, Flamme I, Kurer V, Eppenberger HM: Reexpression of alpha smooth muscle actin isoforms in cultured adult rat cardiomyocytes, *Dev Biol* 139: S. 269-278, 1990

Eppenberger-Eberhardt M, Messerli M, Eppenberger HM, Reinecke M: New occurrence of atrial natriuretic factor and storage in secretorally active granules in adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term culture. *J Mol Cell Cardiol* 25 (7): S. 753-757, 1993

Eppenberger-Eberhardt M, Aigner S, Donath MV, Kurer V, Walther P, Zuppiger C, Schaub MC, Eppenberger HM: IGF-I and bFGF differentially influence atrial natriuretic factor and alpha-smooth muscle actin expression in cultured atrial compared to ventricular adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: S. 2027-2039, 1997

- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL: Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: S. 726-731, 1995
- Fenteany G, Standaert RF, Reichard GA, Corey EJ, Schreiber SL: A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: S. 3358-3362, 1994
- Flanders KC, Winokur TS, Holder MG, Sporn MB: Hyperthermia induces expression of transforming growth factor-beta in rat cardiac cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 92: S. 404-410, 1993
- Florini JR, Ewton DZ: Induction of gene expression in muscle by the IGFs. *Growth Regul* 2: S. 23-29, 1992
- Floyd ZE, Trausch-Azar JS, Reinstein E, Ciechanover A, Schwartz AL: The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD. *J Biol Chem* 276(25): S. 22468-22475, 2001
- Fujita M, Ikemoto M, Kishishita M, Otani H, Nohara R, Tanaka T, Tamaki S, Yamazato A, Sasayama S: Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation* 94 (4): S. 610-613, 1996
- Fuller SJ, Mynett JR, Sugden PH: Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin – like growth factors. *Biochem J* 282: S. 85-90, 1992
- Garrett IR, Chen D, Gutierrez G, Zhoco M, Escobedo A, Rossini G, Harris SE, Gallwitz W, Kim KB, Hu S, Crews CM, Mundy GR: Selective Inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest* 111(11): S. 1771-1782, 2003
- Glickmann MH, Ciechanover A: The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction, *Physiol Rev* 82: S. 373-428, 2002
- Giasson BI, Bruening W, Durham HD, Mushynski WE: Activation of stress-activated protein kinases correlates with neurite outgrowth induced by proteasome inhibition in PC12 cells. *J Neurochem* 72: S. 1081-1087, 1999
- Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH: Protein degradation by the proteasome and dissection of its in vivo importance with synthetic inhibitors. *Mol Biol Rep* 24: S. 69-75, 1997

- Gosteli-Peter MA, Harder BA, Eppenberger HM, Zapf L, Schaub MC: Triiodothyronine induces overexpression of alpha-smooth muscle actin, restricts myofibrillar expansion and is permissive for the action of basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I in adult rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 98: S. 1737-1744, 1996
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G: Diversity and Selectivity of receptor – G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: S. 429-459, 1996
- Haupt Y, Maya R, Kazanietz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: S.296-299, 1997
- Harder BA, Hefti MA, Eppenberger HM, Schaub MC: Differential protein localization in sarcomeric and nonsarcomeric contractile structures of cultured cardiomyocytes. *J Struct Biol* 122: S. 162-175, 1998
- Harder BA, Schaub MC, Eppenberger HM, Eppenberger-Eberhardt M: Influence of fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor (IGF-I) on cytoskeletal and contractile structures and on atrial natriuretic factor (ANF) expression in adult rat ventricular cardiomyocytes in culture. *J Mol Cell Cardiol* 28:S. 19-31, 1996
- Hefti MA, Harder B, Eppenberger HM, Schaub MC: Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 29: S.2873-2892, 1997
- Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH: The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272: S. 25200-25209, 1997
- Hendil KB, Khan S, Tanaka K: Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem J* 332: S. 749-754, 1998
- Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, Lerman A: The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc Res* 61: S. 11-21, 2004
- Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: S. 425-479, 1998
- Hori M, Sato H, Kitakaze M, Iwai K, Takeda H, Inoue M, Kamada T: Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca²⁺ overload. *Circ Res* 75: S. 324-334, 1994
- Ichikawa K, Hashizume K: Thyroid hormone action in the cell. *Endocr J* 42: S. 131-140, 1995

- Ito H, Hirata Y, Adachi M, Tanaka M, Kioke A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M: Endothelin-1 is an autocrine/ paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92: S. 398-403, 1991
- Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F: Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69: S. 209-215, 1991
- Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F: Endothelin-1 ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 89: S. 2198-2203, 1994
- Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F: Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87: S. 1715-1721, 1993
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL: The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26S and 20S proteasomes: implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274: S. 3363-3371, 1999
- Kisselev AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8: S. 739-758, 2001
- Knowlton KU, Baracchini E, Ross RS, Harris AN, Henderson SA, Evans SM, Glembotski CC, Chien KR: Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *J Biol Chem* 266: S. 7759-7768, 1991
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S: A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: S. 635-644, 1999
- Ladenson PW, Bloch KD, Seidman JG: Modulation of atrial natriuretic factor by thyroid hormone: messenger ribonucleic acid and peptide levels in hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid rat atria and ventricles. *Endocrinology* 123: S. 652-657, 1988
- Ladoux A, Frelin C: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 195: S. 1005-1010, 1993

- Lawrence DA: Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int Suppl* 49: S.19-23, 1995
- Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR: Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263: S. 7352-7358, 1988
- Lee DH, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Cell Biol* 8: S. 397-403, 1998
- Li JM, Brooks G: Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 273: S. 1358-1367, 1997
- Lo RS, Massague J: Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nature Cell Biol* 1: S. 472-478, 1999
- Long CS, Ordahl CP, Simpson PC: Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest* 83: S. 1078-1082, 1989
- Long CS, Hartogensis WE, Simpson PC: Beta-adrenergic stimulation of cardiac non-myocytes augments the growth-promoting activity of non-myocyte conditioned medium. *J Mol Cell Cardiol* 25: S. 915-925, 1993
- Long CS: Autocrine and paracrine regulation of myocardial cell growth in vitro; the TGF-beta paradigm. *Trends Cardiovasc Med* 6: S. 217-226, 1996
- Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA: The activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 18: S. 839-845, 1998
- Marchal S, Cassar-Malek I, Magaud JP, Rouault JP, Wrutniak C, Cabello G: Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the camp pathway. *Exp Cell Res* 220: S. 1-10, 1995
- Martin XJ, Wynne DG, Glennon PE, Moorman AFM, Boheler KR: Regulation of expression of contractile proteins with cardiac hypertrophy and failure. *Mol Cell Biochem* 157: S. 181-189, 1996
- Massague J, Cheifetz S, Endo T: Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 83: S. 8206-8210, 1986

- Meiners S, Laule M, Rother W: Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circ* 105: S. 483-489, 2002
- Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K: Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 40: S. 2232-2241, 2006
- Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY: Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 273: S: 6373-6379, 1998
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC: Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: S. 14374-14379, 2002
- Mugita N, Honda Y, Nakamura H, Fujiwara T, Tanaka K, Omura S, Shimbara N, Ogawa M, Saya H, Nagao M: The involvement of proteasome in myogenic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Mol Med* 3: S. 127-137, 1999
- Muratani M, Tansey WP: How the Ubiquitin-Proteasome-System controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3): S. 192 – 201, 2003
- Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S Proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82, S. 965-980, 2002
- Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F: Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8 (2): S.58-65, 1998
- Olson EN: Regulation of muscle transcription by the MyoD family. *Circ Res* 72: S. 1-6, 1993
- Orlowsky M, Cardozo C, Michaud C: Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32: S. 1563-1572, 1993
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: S. 682-685, 1995

- Pahl HL: Activators and target genes of Rel/ NF κ B transcription factors. *Oncogene* 18: S. 6853-6866, 1999
- Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, Wolf RE, Huang J, Brand S, Elliott PJ, Lazarus D, McCormack T, Parent L, Stein R, Adams J, Grisham MB: Role of the proteasome and NF κ B in streptococcal wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: S.15671-15676, 1998
- Parker TG, Packer SE, Schneider MD: Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 85(2): S. 507-514, 1990
- Poizat C, Sartorelli V, Chung G, Kloner RA, Kedes L: Proteasome-mediated degradation of the coactivator p300 impairs cardiac transcription. *Mol Cell Biol* 20: S. 8643-8654, 2000
- Rawls A, Valdez MR, Zhang W, Richardson J, Klein WH, Olson EN: Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* 125(13): S. 2349-2358, 1998
- Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, Burmester JK, Sporn MB: Role of transforming growth factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrin action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest* 90: S. 2056-2062, 1992
- Rock KL, Goldberg AL: Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17: S.739-779, 1999
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: S. 761-771, 1994
- Rosenzweig A, Halazonetis TD, Seidman JG, Seidman CE: Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circ* 83: S. 1256-1265, 1991
- Rudd CE, Schneider H: Lymphocyte signalling: Cbl sets the threshold for autoimmunity. *Curr Biol* 10, S. 344-347, 2000
- Rupp H, Berger HJ, Pfeifer A, Werdan, K: Effect of positive inotropic agents on myosin isozyme population and mechanical activity of cultured rat heart myocytes. *Circ Res* 68: S. 1164-1173, 1991

- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y: Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long – term survival in heart failure. *Nature* 384: S. 353-355, 1996
- Sartorelli V, Hong NA, Bishopric NH, Kedes L: Myocardial activation of the human cardiac alpha-actin promoter by helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(9): S. 4047-4051, 1992
- Schaub MC, Hefti MA, Harder B, Eppenberger HM: Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 75: S.901-920, 1997
- Schlüter KD, Millar BC, McDermott BJ, Piper HM: Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 269: S. C 1347 – C1355, 1995
- Schlüter KD, Zhou XJ, Piper HM: Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF – beta in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 269: S. C1311-1316, 1995
- Simpson P: Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha-1 adrenergic receptor and induction of beating through an alpha-1 and beta-1 adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res* 56: S.884-894, 1985
- Simpson P, McGrath A, Savion S: Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 51: S. 787-801, 1982
- Song X, von Kampen J, Slaughter CA, DeMartino GN: Relative functions of the α - and β -subunits of the proteasome activator PA28. *J Biol Chem* 272: S. 27994-28000, 1997
- Sugden PH, Bogoyevitch MA: Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med* 6: S. 87-94, 1996
- Stangl K, Guenther C, Frank T, Lorenz M, Meiners S, Roepke T, Stelter L, Moobed M, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl V: Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem Biophys Res Comm* 291: S. 542-549, 2002
- Stangl V, Lorenz M, Meiners S, Ludwig A, Bartsch C, Moobed M, Vietzke A, Kinkel HT, Baumann G, Stangl K: Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 18: S. 272-279, 2004

- Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y: Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 191: S. 823-830, 1993
- Tamamori M, Ito H, Hiroe M, Terada Y, Marumo F, Ikeda MA: Essential roles for G1 cyclin-dependent kinase activity in development of cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 275: S. 2036-2040, 1998
- Thompson N, Bazoberry F, Speir EH, Cascells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB: Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1: S. 91-99, 1998
- Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S: Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem* 119: S. 572-575, 1996
- Turner JD, Rotwein P, Novakofski J, Bechtel PJ: Induction of mRNA for IGF-I und -II during growth hormone-stimulated muscle hypertrophy. *Am J Physiol* 255: S. E513-517, 1988
- Van Bilsen M, Chien KR: Growth and hypertrophy of the heart: Towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res* 27: S.1140-1149, 1993
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W: The 26S Proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: S. 1015-1068, 1999
- Vosberg P: The ubiquitin-proteasome system may be involved in the pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 66: S. 1-3, 2005
- Wang B, Ouyang J, Xia Z: Effects of triiodo-thyronine on angiotensin-induced cardiomyocyte hypertrophy: reversal of increased beta-myosin heavy chain expression. *Can J Physiol Pharmacol.* 84(8-9): S. 935-941, 2006
- Wang DL, Chen JJ, Shin NL, Kao YC, Hsu KH, Huang WY, Liew CC: Endothelin stimulates cardiac α - and β -myosin heavy chain gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 183(3): S. 1260-1265, 1992
- Waspel LE, Ordahl CP, Simpson PC: The cardiac beta-myosin heavy chain is induced selectively in alpha-1 adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85: S. 1206-1214, 1990
- White MF, Kahn CR: The insulin signalling system. *J Biol Chem* 269: S. 1-4, 1994

Wilkinson KD: Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11: S. 1245-1256, 1997

Wolf DH, Hilt W: The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal *Biochimica et Biophysica Acta* 1965: S. 19-31, 2004

Zavrski I, Krebbel H, Wildemann B, Heider U, Kaiser M, Possinger K, Sezer O: Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Commun* 333: S. 200-205, 2005

Zezula J, Casaccia-Bonnel P, Ezhevsky SA, Osterhout DJ, Levine JM, Dowdy SF, Chao MV, Koff A: p21^{CIP1} is required for the differentiation of oligodendrocytes independent of cell cycle withdrawal. *EMBO Rep* 2: S. 27-34, 2001

Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR: Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: S. 7391-7395, 1995

Zimmer HG, Irlbeck M, Kolbeck-Ruhmkorff CK: Response of the rat heart to catecholamines and thyroid hormones. *Mol Cell Biochem* 147: S. 105-114, 1995

10 Erklärung

„Ich, Pia Leykam, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Der Einfluss des Ubiquitin-Proteasom-Systems auf das Adaptationsverhalten neonataler Rattenkardiomyozyten‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“