

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie,
Campus Virchow-Klinikum Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Induktion von Zytokinese und Mitose bei Herzmuskelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Knaus

aus Karl-Marx-Stadt

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Dietz

2. Prof. Dr. med. K. C. Wollert

3. Prof. Dr. med. S. Dhein

Datum der Promotion: 27. März 2009

Stufen

Wie jede Blüte welkt und jede Jugend
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.

Es muß das Herz bei jedem Lebensrufe
Bereit zum Abschied sein und Neubeginne,
Um sich in Tapferkeit und ohne Trauern
in andre, neue Bindungen zu geben.

Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,
Der uns beschützt und der uns hilft zu leben.

Wir sollen heiter Raum um Raum durchschreiten,
An keinem wie an einer Heimat hängen,
Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,
Er will uns Stuf' um Stufe heben, weiten.

Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,
Nur wer bereit zu Aufbruch ist und Reise,
Mag lähmender Gewöhnung sich entrafen.

Es wird vielleicht auch noch die Todesstunde
Uns neuen Räumen jung entgegenschenden,
Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden,
Wohlan denn, Herz, nimm Abschied und gesunde!

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.2	Etablierte und potenzielle Therapiestrategien der Herzinsuffizienz	2
1.2.1	Konservative medikamentöse Therapie	2
1.2.2	Operative und apparative Therapie	4
1.2.3	Endogene Regeneration von Kardiomyozyten	5
1.2.4	Zelltransplantation	7
1.2.5	Transdifferenzierung	10
1.3	Zellzyklusregulation	11
1.3.1	Zellzyklusphasen	11
1.3.2	Zellzyklusfaktoren und Zellzyklusregulation in Kardiomyozyten	17
1.4	Problemstellung	18
2	Material	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien	21
2.3	Biologisches Material	23
2.4	Lösungen, Puffer und Medien	24
3	Methoden	28
3.1	Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus Rattenherzen	28
3.1.1	Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten	28
3.1.2	Adulte Kardiomyozyten des linken Ventrikels	29
3.1.3	Bestimmung der Lebendanzahl	30
3.2	Methoden der Proteinbiochemie	31
3.2.1	Methoden zur Proteinanalyse	31
3.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz	33
3.3	Statistische Analyse	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Immunzytologischer Nachweis von Herzmuskelzellen	34
4.2	Nachweis von Faktoren des präreplikativen Komplexes bei neonatalen und adulten Kardiomyozyten	35

4.3	Serumstimulation adulter Kardiomyozyten führt zu einer differenziellen Expression präreplikativer Faktoren	37
4.4	Die differenzielle Expression präreplikativer Faktoren induziert keinen Zellzykluswiedereintritt serumstimulierter, adulter Kardiomyozyten	39
4.5	Transfektion von Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren für E2F2, CDK4 und Zyklin D1	40
4.6	Etablierung immunzytochemischer Marker der Mitose und Zytokinese bei Herzmuskelzellen	42
4.7	Adenovirale Transfektion neonataler Kardiomyozyten mit E2F2, CDK4 oder Zyklin D1 führt zur Induktion von Mitose und Zytokinese	45
4.8	Adenovirale Ko-Transfektion adulter Kardiomyozyten mit E2F2, CDK4 und Zyklin D1 induziert Mitose	48
5	Diskussion und Ausblick	51
5.1	Entwicklungspotenzial von Herzmuskelzellen	51
5.2	Myokardiale Hypertrophie und Re-Expression von Zellzyklusfaktoren	53
5.3	Die Re-Programmierung des Zellzyklus von Kardiomyozyten ist möglich	55
5.4	Vergleich immunzytochemischer Nachweismöglichkeiten von Mitose und Zytokinese bei Herzmuskelzellen	58
6	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis	63

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zusammensetzung des präreplikativen Komplexes am Beispiel der Hefe	14
3.1	Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage	30
4.1	Reinheit kardiomyozytärer Primärkulturen	34
4.2	Faktoren des präreplikativen Komplexes im Zellextrakt neonataler Kardiomyozyten	36
4.3	Serumstimulation induziert Expression von Faktoren des präreplikativen Komplexes in adulten Kardiomyozyten	37
4.4	Immunzytochemischer Nachweis von MCM5 in serumstimulierten, adulten Kardiomyozyten	38
4.5	Fehlende S-Phase-Induktion in neonatalen und serumstimulierten, adulten Kardiomyozyten	39
4.6	Zellzyklusfaktoren und Zellzyklusregulation	40
4.7	Adenovirale Transfektion neonataler Kardiomyozyten führt zur Überexpression der jeweiligen cDNA auf Proteinebene	41
4.8	Immunzytochemische Marker des Zellzyklus am Beispiel proliferierender IMR90 Zellen	43
4.9	Ablauf von Mitose und Zytokinese am Beispiel proliferierender IMR90 Zellen . . .	44
4.10	Immunzytochemische Darstellung der Induktion von Zytokinese bei E2F2 adenoviral transfizierten, neonatalen Kardiomyozyten	45
4.11	Quantitative Auswertung der Induktion von Mitose und Zytokinese bei adenoviral transfizierten, neonatalen Kardiomyozyten	46
4.12	Quantitative Auswertung der Mitosephasen adenoviral transfizierter, neonataler Kardiomyozyten	47
4.13	Quantitative Auswertung der Induktion von Mitose bei adenoviral transfizierten, adulten Kardiomyozyten	48
4.14	Quantitative Auswertung der Mitosephasen adenoviral transfizierter, adulter Kardiomyozyten	49
4.15	Immunzytochemische Darstellung unterschiedlicher Mitosephasen adenoviral transfizierter, adulter Kardiomyozyten	50
5.1	Physiologische und pathophysiologische Entwicklungsmöglichkeiten von Kardiomyozyten	52

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
ATP	Adenosintri-phosphat
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cdc	cell division cycle (Zellteilungszyklus)
CDK	cyclin dependent kinase (cyclinabhängige Kinase)
CKI	CDK Inhibitor
cDNA	complementary DNA
DABCO	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiaminintetraacetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FAF-BSA	fatty acid free bovine serum albumin (fettsäurefreies Rinderserumalbumin)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
H2A	Histon 2A
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxydase (Meerrettich Peroxidase)
IGF	Insulin Growth Factor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LB	Luria-Bertani
MAP	mitogen activated kinase
MCM	minichromosome maintenance (Minichromosome-Erhaltung)
MOI	multiplicity of infection
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NP40	Nonident P40
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260nm
ORC	origin recognition complex
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered-saline (Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pfu	plaque forming unit (Plaques formende Einheit)
pRB	phosphoryliertes Retinoblastomprotein
pre RC	präreplikativer Komplex
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
Rb	Retinoblastomprotein
RC	Replikative Komplex
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	single stranded DNA (einsträngige DNA)
SV40	simian virus 44 (Simian Affenvirus 40)
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween 20
TE Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume, Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation, Welt-Gesundheits-Organisation
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
X-Gal	Galaktosidase

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

1.1 Klinischer Hintergrund

Die Herzinsuffizienz nimmt unter den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems beim Menschen aufgrund der mit ihr assoziierten Morbidität und Mortalität eine herausragende Stellung ein. In Deutschland sind bereits 2-3 Millionen Menschen erkrankt (Fischer et al. [2003]). Die kumulative Inzidenz beträgt unabhängig vom Lebensalter 20 % (Dawber et al. [1951], Mosterd et al. [1999]). Bei einer weiterhin ansteigenden Lebenserwartung der Bevölkerung, ist von einer Zunahme der Prävalenz in den nächsten Jahrzehnten auszugehen.

Das Herz ist als postmitotisches Organ schädigenden Einflüssen ohne Regenerationsmöglichkeit ausgesetzt. So verursacht die koronare Minderperfusion des Herzens bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) einen Sauerstoffmangel (Ischämie) mit nachfolgender Schädigung des Herzmuskelgewebes (Rumyantsev [1977]). Um den erlittenen Funktionsverlust an myokardialer Kontraktibilität auszugleichen, verfügt das Herz über verschiedene Kompensationsmöglichkeiten. Eine chronisch hämodynamische, myokardiale Überlastung wie bei anhaltender Myokardischämie, arterieller Hypertonie, Herzklappenerkrankungen und vielen Formen angeborener Herzerkrankungen beobachtet, führt zur Myokardhypertrophie. Sie ist der wichtigste Anpassungsmechanismus des Herzens, um die Kontraktibilität zu steigern und seine ursprüngliche Leistungsfähigkeit wiederherzustellen.

Die Myokardhypertrophie ist durch eine Größenzunahme der Herzmuskelzellen infolge erhöhter Proteinsynthese gekennzeichnet, der Anteil myofibrillärer Proteine am Gesamtprotein des Herzens steigt (Jane-Lise et al. [2000]). Wie die mechanische Mehrbelastung des Herzens in einen Wachstumsreiz der Kardiomyozyten umgewandelt wird, ist noch nicht ausreichend geklärt. Offensichtlich registrieren Herzmuskelzellen hämodynamische Belastungen und beantworten die erhöhte myokardiale Leistungsanforderung mit einer kompensatorischen Hypertrophie (Meghji et al. [1997]). Die kompensatorisch bedingte, zunächst nützliche physiologische Myokardhypertrophie geht jedoch im zeitlichen Verlauf in den pathologischen Prozess der Hypertrophie über. Histologisch ist dieser Wandel durch eine vermehrte interzelluläre Kollagensynthese gekennzeichnet,

die schließlich in eine Fibrosierung der Ventrikelwand mündet. Die damit einhergehende Versteifung des Myokards führt zu einer Erhöhung der Ventrikelwandspannung und zur Zunahme der Herzdruckbelastung. Daraus kann eine zunächst diastolische, später auch eine systolische Funktionsstörung des Herzmuskels resultieren. Betroffene Patienten klagen typischerweise über Dyspnoe, Flüssigkeitsretention in den peripheren Extremitäten und Müdigkeit. Klinisches Endbild der Myokardhypertrophie ist die ventrikuläre Dilatation mit Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz, die den Tod des Patienten durch letale Dysrhythmien oder Pumpversagen herbeiführt.

1.2 Etablierte und potenzielle Therapiestrategien der Herzinsuffizienz

1.2.1 Konservative medikamentöse Therapie

Die Therapie der Herzinsuffizienz ist im Wesentlichen medikamentös konservativer und symptomatischer Natur. Erstmals nutzte der Apotheker Sir William Withering im Jahr 1785 die positiv inotrope Wirkung des Digoxins im roten Fingerhut. Trotz der geringen therapeutischen Breite der Substanz und einer potenziell toxischen Wirkung erfolgte der Einsatz auf empirischer Basis relativ kritiklos. Erst nach Durchführung einer randomisierten Doppelblindstudie erfolgte eine Neubewertung des Stellenwertes von Digitalis in der Therapie der Herzinsuffizienz. Die DIG-Studie (Garg et al. [1997]) zeigte, dass Digitalis die Prognose herzinsuffizienter Patienten nicht verbessert. In einigen Fällen konnten aber unter der medikamentösen Therapie mit Digitalis eine Verbesserung der Symptomatik und eine Erhöhung der Leistungsfähigkeit beobachtet werden. Der Einsatz von Digitalis zur medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz ist seitdem rückläufig. Die Substanz findet zur Frequenzkontrolle tachykarder Herzrhythmusstörungen weiterhin Anwendung.

Die medikamentöse Behandlung der Herzinsuffizienz stützt sich heute im wesentlichen auf die Substanzklassen der β -Blocker, Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE-Hemmer), Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten (Sartane) und Diuretika (Hoppe and Erdmann [2001], Hunt [2001]). Die Medikation erfolgt stufenweise in Abhängigkeit vom klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz und bestehender Begleiterkrankungen. Die pathophysiologische Bedeutung einer Inaktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für die Behandlung der Herzinsuffizienz wurde Ende der 80er Jahre mit der SOLVD-Studie (Rogers et al. [1991]) erkannt. Seitdem sind ACE-Hemmer, die die Bildung von Angiotensin II verhindern, fester Bestandteil der etablierten Therapie bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (Flather et al. [2000]). Sartane, die die Wirkung von Angiotensin II am Rezeptor blockieren, finden ebenfalls Einzug in die Therapieschemata (McMurray et al. [2003]). Gegenüber den ACE-Hemmern bieten sie im Wesentlichen den Vorteil, dass die häufigste Nebenwirkung der ACE-Hemmer - trockener Reizhusten - nicht auftritt. 2007 wurde Aliskiren als erster Arzneistoff aus der Gruppe der oralen, direkten Reninhemmer zur Behandlung der arteriellen Hypertonie zugelassen (Jensen et al.

[2008]). Ein therapeutischer Nutzen des Medikaments in der Behandlung der Herzinsuffizienz ist anzunehmen, muss aber erst noch durch Studien nachgewiesen werden.

Betablocker galten in der Behandlung der Herzinsuffizienz wegen ihrer negativ inotropen Wirkung über viele Jahrzehnte als kontraindiziert. Erst die Erforschung der Auswirkungen einer Überaktivierung neurohumoraler Kompensationsmechanismen führte zu einem langsamen Umdenken. Erste Ergebnisse wurden von Swedberg et al. [1979] publiziert. Erst nach weiteren 20 Jahren wurde aus der einstigen Kontraindikation eine klare Indikation für den therapeutischen Einsatz von β -Blockern bei der Herzinsuffizienz. Mittlerweile ist die Gabe von Betablockern bei allen Schweregraden der Herzinsuffizienz durch mehrere randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studien gesichert (MERIT-HF: Fagerberg et al. [1999], CIBIS: Lechat et al. [1999]).

Diuretika stellen eine heterogene Gruppe von Arzneimitteln dar, deren Indikationen abgesehen von nephrologischen Krankheitsbildern vor allem die Therapie der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz sind. Die arterielle Hypertonie war lange Zeit Hauptursache für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Inzwischen hat - nicht zuletzt durch verbesserte Therapieoptionen der arteriellen Hypertonie - die KHK diesen Stellenwert übernommen. In der antihypertensiven, medikamentösen Kombinationstherapie sind Diuretika unverzichtbar und nach Empfehlung der amerikanischen Hypertonieliga Erstlinienmedikament (ALLHAT: Davis et al. [2002]). Die europäischen Richtlinien sehen ihren Einsatz differenzierter (ASCOT-BPLA: Dahlöf et al. [2005]). In der Therapie der Herzinsuffizienz sind Diuretika seit Langem etabliert und werden vor allem zur symptomatischen Behandlung bei manifester kardiopulmonaler Dekompensation eingesetzt. Diuretika konnten im Gegensatz zur Hypertonietherapie bisher nur in einer größeren, randomisierten, doppelblinden und placebokontrollierten Studie einen Überlebensvorteil für Herzinsuffizienz-Patienten zeigen (Pitt et al. [1996]).

Zusätzlich zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz mit β -Blocker und ACE-Hemmer kommt Eplerenon - ein selektiver Aldosteronantagonist - bei Patienten nach Herzinfarkt mit symptomatischer, linksventrikulärer Dysfunktion zum Einsatz. Die EPHEsus-Studie (Pitt et al. [2003]) konnte unter dieser Therapie eine Verringerung der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität nachweisen.

Alle etablierten Medikamente in der Therapie der Herzinsuffizienz zielen auf eine Reduktion der Herzarbeit durch Vor- und/oder Nachlastsenkung. Dabei kommt es infolge der Veränderung hämodynamischer Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck, Schlagvolumen und enddiastolischer Wandspannung zu einem reduzierten myokardialen Sauerstoffbedarf. Medikamente, die auf molekularbiologischer Ebene gezielt Faktoren des Zellzyklus adressieren und so kausal der Entstehung myokardialer Hypertrophie entgegenwirken, existieren noch nicht. Neben der cholesterinsenkenden Wirkung besitzt die Substanzklasse der Statine subzelluläre, pleiotrope Effekte, deren kardioprotektive Wirkungen in der Behandlung der KHK Anwendung finden (Landmesser et al. [2005]). Die Daten der CORONA-Studie (Kjekshus et al. [2007]) zeigten, dass die zusätzliche Gabe von Rosuvastatin zur Optimierung der Behandlung von Herzinsuffizienz nicht zu einer Verbesserung der Prognose für Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung führt. Allerdings konnte eine Senkung

kardiovaskulär bedingter Krankenhausaufenthalte durch Rosuvastatin nachgewiesen werden.

1.2.2 Operative und apparative Therapie

Revaskularisation und Aneurysmektomie

Die ischämisch bedingte systolische Herzinsuffizienz sollte - so vitales, ischämisches Myokard nachweisbar ist - mittels Koronarangioplastie oder arterio-venöser Bypassoperation revaskularisiert werden. Die Reperfusion des *hibernating* Myokards kann eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion erzielen und die Symptomatik der Patienten deutlich verbessern. Die perioperative Sterblichkeit liegt bei ca. 5 Prozent, die Langzeitüberlebensrate ist mit der der Herztransplantation vergleichbar. In nicht kontrollierten Studien konnte eine Aneurysmektomie bei Patienten mit ischämisch bedingter Herzinsuffizienz die Symptomatik verbessern (Athanasuleas et al. [2001]). Allerdings stehen prospektiv randomisierte Studien dazu noch aus.

Mitralklappenchirurgie

Bei Patienten mit schwerer linksventrikulärer Dysfunktion und hochgradiger, sekundärer Mitralklappeninsuffizienz kann eine Mitralklappenrekonstruktion klinisch Erleichterung bringen. Bei einem elektiv erfolgten Eingriff liegt die perioperative Letalität bei ca. 6 Prozent und die Einjahresüberlebensrate bei 85 Prozent (Romano and Bolling [2003], Gummert et al. [2003]).

Implantierbarer Defibrillator

Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt und hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion ($EF \leq 30\%$) profitieren von einem implantierbaren Cardioverter-Defibrillator (ICD). Dieses Patientenkollektiv zeichnet sich durch eine erhöhte Letalität aufgrund ventrikulärer Herzrhythmusstörungen aus, die durch den ICD detektiert, dokumentiert und mittels automatisierter Schockabgabe therapiert werden können. Die MADIT-II Studie zeigte eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit in der ICD-Gruppe (Moss et al. [2002]). Dieser protektive Effekt ließ sich jedoch nicht bei der nichtischämischen, dilatativen Kardiomyopathie nachweisen (Bansch et al. [2002], Kadish et al. [2004], Strickberger et al. [2003]). Nur die SCD-HeFT-Studie (Bardy et al. [2005]) zeigte sowohl bei ischämischer als auch nichtischämischer Herzinsuffizienz einen Überlebensvorteil bei Defibrillator implantierten Patienten. Studien die eine weiterführende Risikostratifizierung umschriebener Patientenkollektive erlauben liegen bisher nicht vor.

Schrittmacher

Bei Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion ($EF \leq 35\%$), Sinusrhythmus, Linksschenkelblock mit verbreitertem QRS-Komplex ($\geq 120ms$) und echokardiographischem Nachweis einer ventrikulären Asynchronie, die auch unter einer maximal optimierten, medikamentösen Therapie schwer

symptomatisch sind, ist eine Resynchronisationstherapie durch biventrikuläre Stimulation indiziert. Intra- und interventrikuläre Leitungsverzögerungen der elektrischen Erregung können durch die biventrikuläre Stimulation ausgeglichen werden und so die linksventrikuläre Hämodynamik und Arbeitseffizienz verbessern. Unter der Therapie verringert sich die Hospitalisationsrate und die Gesamtmortalität (Bradley et al. [2003], Cleland et al. [2005]). Zwischen einer alleinigen Resynchronisationstherapie und einem kombinierten biventrikulären Schrittmacher- und Defibrillatorgerät konnte kein signifikanter Unterschied in der Sterblichkeit nachgewiesen werden (Bristow et al. [2004]).

Herztransplantation

Ultima Ratio bei Patienten mit schwerster therapierefraktärer Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation. In den meisten Transplantationszentren sind Alter ≥ 60 Jahre, Drogen- oder Alkoholabusus, fehlende Compliance, schwere andere Grunderkrankungen und eine fixierte pulmonale Hypertonie Kontraindikationen für eine Transplantation. Die Fünfjahresüberlebensrate nach Herztransplantation liegt bei etwa 75 % (Taylor et al. [2005]). Besonders im ersten Jahr kann eine Abstoßungsreaktion auftreten. Die Langzeitprognose wird durch die Komplikationen der Immunsuppression wie Infektionen, arterielle Hypertonie, renale Dysfunktion, Malignome und Transplantatvaskulopathie limitiert. Ventrikuläre Assist-Systeme oder Kunstherzen können bei Myokarditis mit schwerer Pumpfunktionsstörung oder in Einzelfällen zur dauerhaften hämodynamischen Unterstützung eingesetzt werden. Typische Komplikationen dieser Intervention sind Infektionen, Blutungen und Thrombembolien. In 90 % der Fälle ist mithilfe mechanischer Unterstützungssysteme eine Überbrückung bis zur Herztransplantation erfolgreich. Bei einzelnen Patienten können Assist-Systeme nach ausreichender kardialer Stabilisierung explantiert werden.

1.2.3 Endogene Regeneration von Kardiomyozyten

Durch Ischämie geschädigte Herzmuskelzellen gehen durch Apoptose und Nekrose zu Grunde und werden durch Bindegewebszellen ersetzt. So entsteht - sofern der Patient das Akutereignis überlebt - im weiteren Verlauf afunktionelles Narbengewebe (Buja [2005]). Ziel der endogenen Regeneration ist es, verbleibende Kardiomyozyten im Narbengewebe oder dessen Grenzgebiet zum vitalen Myokard zur Proliferation anzuregen. Dadurch könnte die Anzahl kontraktile Einheiten erhöht und die Pumpkraft des Herzens verbessert werden. Im Gegensatz zu Herzmuskelzellen von Säugetieren sind Kardiomyozyten von Lurch (Brookes and Kumar [2002]) und Zebrafisch (Poss et al. [2002]) lebenslang zur Proliferation fähig. Geschädigtes Myokard dieser Spezies kann sich endogen regenerieren.

Während der Embryonalentwicklung findet auch im Säugetierherz hyperplastisches Kardiomyozytenwachstum statt. Im Allgemeinen schließen sich Zellteilung und myokardiale Zelldifferenzierung mit Ausbildung des kontraktile Apparates aus (Studzinski and Harrison [1999], Rumyantsev

[1977]). Bei embryonalen, funktionsfähigen Kardiomyozyten kommt es zu einer Demontage des kontraktiven Apparates, bevor die Zellteilung erfolgt. Nach erfolgreicher Zytokinese werden die Myofibrillen wieder aufgebaut (Ahuja et al. [2004]). Während der gesamten embryonalen Zytokinese befinden sich die teilenden Zellen in einem intaktem Zell-Zellkontakt, der die funktionelle Stabilität des myokardialen Gewebeverbandes gewährleistet.

Li et al. [1997] untersuchten die strukturellen Bedingungen für Zellteilungen am Zytoskelett postnataler Herzmuskelzellen. Bei einem nur teilweisen Abbau des kontraktiven Apparates der postnatalen Herzmuskelzelle konnte die Entstehung einer Teilungsfurche trotz der Ausbildung eines kontraktiven Aktin-Myosin-Rings nicht beobachtet werden. Unter anderem aus diesem Grund verlieren postnatale Kardiomyozyten die Fähigkeit zur Zellteilung (McGill and Brooks [1995]) und wachsen fortan hypertroph. Die Umstellung von hyperplastischem zu hypertrophem Wachstum ist mit der Herunterregulation positiver Zellzyklusfaktoren wie Zyklin A und CDK2 sowie mit einer verstärkten Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 verbunden (Pasumarthi and Field [2002]). Ein Wiedereintritt in den Zellzyklus und Induktion von Mitose konnte durch adenovirale Transfektion von Zyklin A2 *in vivo* durch Woo et al. [2006] und Chaudhry et al. [2004] nachgewiesen werden. Auch die Transfektion adulter Kardiomyozyten *in vitro* mit Zyklin B1-CDC2-Komplexen erzielte ähnliche Ergebnisse (Datwyler et al. [2003]). An transgenen Tiermodellen mit Überexpression von Zyklin D1 und D2 demonstrierten Soonpaa et al. [1997] und Pasumarthi et al. [2005] eine erhöhte DNA-Syntheserate und Kardiomyozytenzahl im Vergleich zu Wild-Typ-Tieren.

Die p38 vermittelte Phosphorylierung nachgelagerter Proteine ist am Zellzyklusaustritt und der Differenzierung von Kardiomyozyten beteiligt (Liang and Molkenin [2003]). Durch Stimulation mit dem angiogenetischen Wachstumsfaktor FGF1 bei gleichzeitiger Inhibition der MAP-Kinase p38 gelang Engel et al. [2005] erstmals der immunzytochemische und strukturelle Nachweis einer Zellteilung bei postmitotischen, differenzierten, adulten Kardiomyozyten *in vitro*.

Im Tiermodell korrelierte die Induktion von Zytokinese mit einer Verbesserung echokardiographischer Parameter. Bei 8-10 Wochen alten Ratten wurde mittels Ligation der linken Koronararterie ein Herzinfarkt induziert und eine kombinierte Therapie mit FGF1 und p38-Inhibitor über 4 Wochen eingeleitet. Da toxische Effekte von p38 Inhibitoren bekannt sind, wurde die kombinierte, medikamentöse Therapie auf 4 Wochen beschränkt. Die histologische und echokardiographische Untersuchung der behandelten Tiere erfolgte nach drei Monaten, um Langzeiteffekte der Therapie zu erfassen. Drei Monate nach Schädigung des Myokards kam es unter 4-wöchiger kombinierter Therapie zu einer Reduktion der myokardialen Narbenbildung und der ventrikulären Wandverdünnung sowie zu einer signifikanten Zunahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Die alleinige Inhibition der p38 MAP-Kinase zeigte keine echokardiographische Verbesserung nach myokardialer Schädigung trotz Induktion von Mitose in Kardiomyozyten (Engel et al. [2006]). Offensichtlich bedarf es der angiogenetischen Eigenschaften von FGF1, um einen klinischen Nutzen zu manifestieren.

Die Arbeit von Engel et al. [2006] zeigt einmal mehr, dass die alleinige Induktion von Zelltei-

lung für klinische Therapieansätze nicht ausreichend ist. Die Kombination kardioprotektiver, antiapoptotischer Faktoren wie dem Apoptose Repressor mit Caspasen-Rekrutierungsdomäne (ARC) (Donath et al. [2006]) oder angiogenetischer Wachstumsfaktoren mit der Induktion myokardialer Regeneration verspricht wirkungsvolle neue Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz.

1.2.4 Zelltransplantation

Zelltransplantationen haben sich in jüngerer Zeit zu einer potenziellen Therapieoption der Herzinsuffizienz entwickelt. Prinzipiell können Stammzellen oder kardiomyozytenähnliche Zellen wie Myoblasten oder fetale Herzmuskelzellen transplantiert werden. Stammzellen können in embryonale (ES), somatische und hämatopoetische Stammzellen sowie in lokale Progenitorzellen unterschieden werden.

ES stammen von der inneren Zellmasse eines Embryos im Blastozystenstadium ab. Sie sind durch eine unbeschränkte Teilungsfähigkeit *in vitro* charakterisiert. Diese Eigenschaft ermöglicht die Kultivierung einer großen Zellpopulation im Labor, eine Voraussetzung der Zelltransplantations-therapie. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und können sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren (Thomson et al. [1998]). Mit adulten Kardiomyozyten ko-kultivierte ES differenzieren zu funktionsfähigen Herzmuskelzellen (Gepstein [2002]), Heng et al. [2004]). Murine ES konnten *in vivo* im experimentellen Herzinfarktmodell geschädigtes Herzmuskelgewebe regenerieren. Die neu entstandenen aus ES-Zellen hervorgegangenen Kardiomyozyten integrierten sich in das Empfängermyokard und wiesen eine normale Zellarchitektur auf. Drei Wochen nach Injektion embryonaler Stammzellen in geschädigtes Myokard konnte echokardiographisch eine erhöhte linksventrikuläre Ejektionsfraktion nachgewiesen werden (Hodgson et al. [2004]).

Gegen eine klinischen Anwendung am Patienten spricht die Gewinnung embryonaler Stammzellen aus sogenannten überschüssigen Embryonen, die bei der In-vitro-Fertilisation anfallen. Aufgrund ethischer Bedenken ist die Gewinnung humaner ES in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten. Humane, embryonale Stammzelllinien, die vor dem 1. Mai 2007 im Ausland gewonnen wurden, dürfen nach Deutschland importiert und zu Forschungszwecken verwendet werden. Da Spenderzellen und Empfängerorganismus nicht identisch sind, könnten ES beim Empfänger eine immunologisch bedingte Abstoßungsreaktion hervorrufen. Weiterhin besteht die Gefahr der Tumorbildung, handelt es sich doch bei ES um undifferenzierte, zur unbegrenzten Teilung befähigte Zellen.

Autologe, somatische Stammzellen aus adulten Organgeweben umgehen die ethischen Probleme und die Gefahr einer immunogenen Abstoßung, die mit embryonalen Stammzellen assoziiert sind. Die durch Studien am Besten charakterisierten somatischen Stammzellen sind vom Knochenmark abstammende hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sowie mesenchymale Stammzellen (MSCs). HSCs besitzen eine hohe Plastizität, sind relativ einfach zu isolieren und werden seit Jahrzehnten therapeutisch bei leukämischen Erkrankungen eingesetzt. Sowohl HSCs als auch MSCs bestehen aus verschiedenen Zellpopulationen, die sich in ihrem Transdifferenzierungspotential unterschei-

den (Krause [2002]). Der Nachweis einer *in vitro* Differenzierung zu funktionellen Kardiomyozyten konnte bisher nur für mesenchymalen Stammzellen erbracht werden, indem eine murine Zelllinie des Knochenmarkstromas *in vitro* mit 5-Azacytidin stimuliert wurde (Heng et al. [2004]). Durch die Stimulation entstanden aus ehemals fibroblastenartig konfigurierten Zellen spontan kontrahierende Zellen, die auf kardiomyozytenspezifische Charakteristika hin analysiert wurden. Dabei ließen sich immunzytochemisch Myosin, Desmin und Aktinin sowie die Expression kardiomyozytenspezifischer Gene und Transkriptionsfaktoren nachweisen. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten ein typisches Aktionspotenzial für Kardiomyozyten (Makino et al. [1999]). Eine andere Möglichkeit der Differenzierung zu Kardiomyozyten *in vitro* besteht in der Ko-Kultivierung von MSCs mit Herzmuskelzellen. Bei diesem Differenzierungsprozess spielt die Zell-Zell-Interaktion, elektrische und/oder mechanische Stimulation sowie bisher nicht näher identifizierte Wachstumsfaktoren eine große Rolle (Fukuhara et al. [2003]). Durch Transduktion mesenchymaler Stammzellen mit Akt kodierenden Viren konnte im Tierversuch an der Ratte ein pathologisches Remodeling des linken Ventrikels nach Infarkt verhindert werden. Die linksventrikuläre Pumpfunktion dieser Tiere erholte sich nach Zelltransplantation vollständig und unterstreicht das große regenerative Potenzial mesenchymaler Stammzellen (Mangi et al. [2003]).

Bittner et al. [1999] zeigten zuerst die kardiomyogenen Eigenschaften von Stammzellen des Knochenmarks *in vivo*. Nach einer Knochenmarktransplantation konnten Y Chromosomen der Spenderzellen im Myokard einer an Herzinsuffizienz erkrankten weiblichen Maus nachgewiesen werden. Zirkulierende Knochenmarksstammzellen wurden vom erkrankten, regenerationsbedürftigen Herz rekrutiert, differenzierten zu Kardiomyozyten und integrierten sich in den Myokardverband. Im Rahmen eines myokardialen Ischämie-Reperfusion-Mausmodells transplantierten Jackson et al. [2001] vom Knochenmark abstammende LacZ markierte hämatopoetische Stammzellen. Die Herzen wurden 2 und 4 Wochen nach Transplantation immunhistologisch untersucht. Trotz niedriger Prävalenz ließen sich die von Spenderzellen abstammenden Kardiomyozyten im Perinfarktgebiet nachweisen. Orlic et al. [2001a] injizierten HSCs direkt myokardial in das Infarktgrenzgebiet und konnten nach 9 Tagen bei 40 % aller transplantierten Mäuse eine Regeneration des Herzmuskels feststellen. 70 % der ehemaligen Infarktfläche wurde durch neu entstandenes Myokard ersetzt. Die induzierte myokardiale Regeneration ließ sich auch durch eine höhere postinterventionelle Überlebenszeit und eine Verbesserung der Herzfunktion nachweisen. Andere Arbeitsgruppen wiesen zwar Spenderzellen im Herzmuskel nach, diese differenzierten aber nicht zu Kardiomyozyten und exprimierten weiterhin hämatopoetische Markerproteine (Nygren et al. [2004], Balsam et al. [2004], Murry et al. [2004]). Aufgrund der gegensätzlichen Studienlage ist der morphologische und physiologische Beitrag von HSCs zur myokardialen Regeneration weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion.

Neben der Injektion bietet auch die verstärkte Mobilisation endogener Stammzellen eine therapeutische Option, vorausgesetzt, dass die zirkulierenden Stammzellen sich im geschädigten Myokard ansiedeln und dort zu Kardiomyozyten differenzieren. Durch Stimulation mit Zytokinen wie dem Granulozyten stimulierenden Faktor (G-CSF) oder dem Stammzellfaktor (SCF) kommt es zu einer

verstärkten Ausschüttung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die periphere Blutzirkulation. Orlic et al. [2001b] injizierten systemisch G-CSG und SCF täglich für 5 Tage vor einem induziertem Myokardinfarkt und setzten diese Behandlung bis Tag 3 nach Infarkt fort. Nach 27 Tagen kam es zu einer deutlichen Reduktion des Infarktareals, die mit einer erhöhten LVEF und Überlebensrate der Mäuse einherging. Ähnlich konzipierte Versuche an Primaten führten nicht zu einer Verringerung der Infarktfläche, aber zu einer verbesserten Reperfusion des infarzierten Myokards (Norol et al. [2003]). Zirkulierende Stammzellen trugen hier zur Neubildung von Blutgefäßen, nicht jedoch zur myokardialen Regeneration bei.

Die Mehrzahl der *in vivo* Studien fokussieren auf die Regeneration eines regional durch Ischämie geschädigten Myokards. Herzinsuffizienz hat ihre Ursache aber nicht nur in der koronaren Herzerkrankung, sondern auch in angeborenen oder erworbenen Kardiomyopathien. Mit dem Doxorubicin induzierten Modell der Kardiomyopathie lässt sich die Rolle von Stammzellen auch bei anderen Formen der Herzinsuffizienz untersuchen. Doxorubicin führt über einen erhöhten oxidativen Stress zu gesteigerter Apoptoserate der Herzmuskelzellen und somit zu einer erworbenen Herzinsuffizienz (Kalyanaraman et al. [2002]). Die Injektion von unseparierten (Agbulut et al. [2003]) und mononukleären Knochenmarkszellen (Ishida et al. [2004]) sowie die frühzeitige Gabe von G-CSG (Tomita et al. [2004]) führten auch beim Doxorubicin geschädigten Myokard zu einer verbesserten linksventrikulären Pumpleistung und einer höheren Überlebensrate im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Das Herz galt bis vor Kurzem als postmitotisches, terminal differenziertes Organ. Die Arbeit von Anversa and Nadal-Ginard [2002] erschütterte dieses Dogma, indem unter physiologischen und pathologischen Bedingungen mitotische und zytokinetische Herzmuskelzellen im humanen Myokard nachgewiesen worden. Die zur Proliferation befähigten Zellen im Herzen sind als kardiale Progenitorzellen (CPCs) entweder permanent im Herzmuskelgewebe lokalisiert oder werden aus zirkulierenden Stammzellen des peripheren Blutsystems rekrutiert. CPCs sind Lin- und c-Kit positive Zellen, die Marker der Zellproliferation und Transkriptionsfaktoren wie GATA-4 und Nkx2.5 exprimieren. Diese Marker sind mit einem frühen Differenzierungsstadium von Kardiomyozyten assoziiert. CPCs zeigen *in vitro* die typischen Charakteristika von Stammzellen wie Selbsterneuerung, Klonogenität und Multipotenz. Zellkontraktionen konnten *in vitro* nicht beobachtet werden. Nach Injektion in das Infarkttrandgebiet bildeten CPCs neues vitales Myokard und neue Blutgefäße (Beltrami et al. [2003]). Bei Patienten mit Aortenstenose ließ sich im hypertrophierten im Vergleich zum gesunden Herzmuskel die 13-fache Anzahl kardialer Progenitorzellen nachweisen (Urbanek et al. [2003]). Analytierte Zellcluster exprimierten die Stammzellmarker Sca-1, c-Kit und MDR-1 sowie Marker der kardialen Differenzierung. Der Ursprung kardialer Progenitorzellen ist weiterhin unklar. Die hoffnungsvollen Befunde myokardialer Regeneration im Tiermodell führten zu ersten klinischen Studien. In der TOPCARE-AMI Studie erhielten Patienten randomisiert entweder eine intrakoronare Infusion endothelialer Progenitorzellen, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen ableiten oder unfraktionierter Knochenmarkszellen (Schachinger et al. [2004]). Bei beiden Patientenkollektiven war nach einem Jahr eine erhöhte LVEF, eine Abnahme des enddiastolischen

Volumens sowie eine reduzierte Infarktfläche zu beobachten.

Eine der ersten randomisierten, kontrollierten Studien führten Wollert et al. [2004] durch. 60 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher primärer angioplastischer Intervention erhielten randomisiert entweder eine intrakoronare Infusion autologer Knochenmarkszellen oder eine optimale, konservative medizinische Therapie. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die mit Stammzellen infundierten Patienten nach 6 Monaten eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpleistung.

Die MAGIC-Studie, bei der Infarktpatienten im Rahmen der Erstversorgung ein Koronarstent erhielten und anschließend mit G-CSF stimuliert wurden, musste aufgrund einer erhöhten In-Stent-Restenoserate abgebrochen werden (Kang et al. [2004]).

Trotz aller bemerkenswerter Fortschritte auf dem Gebiet der Stammzelltherapie müssen Langzeitwirkungen und mögliche Risiken noch besser erforscht werden. Erst dann kann sich die potenzielle Behandlungsmethode als neuer Bestandteil der Therapie der Herzinsuffizienz etablieren.

1.2.5 Transdifferenzierung

Der Prozess der Transdifferenzierung beschreibt die Transformation einer durch zellspezifische Charakteristika histologisch beschriebenen Zelllinie in eine andere. Fibroblasten und Endothelzellen könnten so im geschädigten Myokard zu Herzmuskelzellen transdifferenzieren und mit ihren zusätzlich bereitgestellten kontraktile Einheiten die linksventrikuläre Pumpkraft erhöhen.

Durch Expression einer myoblastenspezifischen cDNA in embryonalen Fibroblasten *in vitro* gelang Davis et al. [1987] deren Transdifferenzierung zu Myoblasten. Dieser Effekt beruht auf den dominanten Eigenschaften muskelspezifischer Determinierungsgene der MyoD-Familie. MyoD aktiviert auch in Nicht-Muskelzellen muskelspezifische Genexpressionsprogramme (Lattanzi et al. [1998], Tapscott [2005]). Myoblasten, die *in vitro* mit neonatalen Herzmuskelzellen ko-kultiviert wurden, transdifferenzierten zu Kardiomyozyten und integrierten sich auch elektrophysiologisch in den myokardialen Zellverband (Iijima et al. [2003]). Vom Skelettmuskel abstammende Stammzellen, die *in vivo* myokardial transplantiert wurden, zeigten im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten keine Transformation zu Kardiomyozyten (Reinecke et al. [2002]). Aus den transplantierten Zellen entstanden reife Skelettmuskelzellen, die sich elektromechanisch nicht an die sie umgebenden Herzmuskelzellen koppelten (Reinecke et al. [2000]).

Der Ansatz der Transdifferenzierung, der die Problematik der Verfügbarkeit von Spenderzellen, der immunologischen Abwehrreaktion sowie ethische Restriktionen elegant umgeht, konnte einen therapeutischen Nutzen bisher noch nicht in *in vivo* Modellen der Herzinsuffizienz nachweisen.

1.3 Zellzyklusregulation

1.3.1 Zellzyklusphasen

Alle proliferationsfähigen eukaryontischen Zellen durchlaufen einen Zyklus von Wachstum (G1-Phase), DNA-Verdopplung (S-Phase), erneutem Wachstum (G2-Phase) und Zellteilung (Mitose). Die Zeit zwischen zwei Zellteilungen wird als Interphase bezeichnet. Ruhende Zellen außerhalb des Zellzyklus befinden sich in der Go-Phase. Der Zellzyklusablauf unterliegt einer strengen Kontrolle, um eine fehlerfreie Zellteilung und die Entstehung zweier genetisch identischer Tochterzellen zu gewährleisten. An sogenannten *checkpoints* überprüft die Zelle, ob extra- und intrazelluläre Bedingungen ein weiteres Voranschreiten im Zyklus ermöglichen (Hartwell and Weinert [1989]). Ist dies nicht der Fall kann der Zellzyklus in jedem Stadium unterbrochen werden (Elledge [1996]), um eine Reparatur zu ermöglichen. Der Verlust dieser Kontrollpunkte führt zu genomischer Instabilität, die zur Entstehung wachstumsenthemmter, tumorer Zellen beitragen kann (Gorgoulis et al. [2005]).

Eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Zellzyklusprogression spielen die Zykline sowie deren Substrat, die zyklinabhängigen Kinasen (CDK), CDK-Inhibitoren (CKI) sowie die Tumorsuppressorgenprodukte p53 und phosphoryliertes Retinoblastomapocketprotein (pRb). Die CDK-Aktivität wird durch zellzyklusspezifische Expression der Bindungspartner (Morgan [1995]) sowie der Ubiquitin vermittelten Proteolyse von Zyklinen gesteuert (Koepp et al. [2001]). Zusätzlich kommt es durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten der CDKs (Solomon and Kaldis [1998]) sowie der Interaktion mit CKIs (Soos et al. [1998]) zu einer Beeinflussung des CDK-Aktivitätsniveaus. CDK Inhibitoren lassen sich der INK4- und der CIP/KIP-Familie zuordnen (Pei and Xiong [2005]). P21WAF1/CIP1, p27Kip1, p57KIP2 sind CIP/KIP-Faktoren, die in allen Zellzyklusphasen unspezifisch Zyklin/CDK-Komplexe inhibieren (Vidal and Koff [2000]). Die zur INK4-Familie gehörenden Faktoren p16INK4a sowie p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d blockieren spezifisch die Aktivität von CDK4 und CDK6 in der G1-Phase (McConnell et al. [1999]). Wie bei den CDKs erfolgt die Regulation der CKIs durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau.

G1-Phase

Die G1-Phase wird durch den *restriction point* (R) in zwei funktionell verschiedene Teile untergliedert. Dabei markiert R den eigentlichen Startpunkt des Zellzyklus. G1-pm repräsentiert das postmitotische Intervall, das von der Mitose bis zu R reicht. G1-ps steht für den Übergang der Zelle in die S-Phase, der von R bis zum Beginn der S-Phase charakterisiert ist. Progression durch G1-pm erfordert eine kontinuierliche Zellstimulation mit Mitogenen wie Serum, IGF sowie anderen Wachstumsfaktoren und ist mit einer hohen Proteinsyntheserate verbunden. Eine Unterbrechung des mitogenen Signals oder eine inhibierte Proteinsynthese führt zum Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus in die Go-Ruhephase (Zetterberg et al. [1995]). Wird der Restriktionspunkt R über-

schritten, kann der Zellzyklus unabhängig von Wachstumsfaktoren durchlaufen werden (Pardee [1989]). Die entscheidende Rolle am R-Kontrollpunkt spielt die Phosphorylierung des Retinoblastomapocketproteins. Hypophosphoryliertes Rb verhindert durch Bindung von E2F-Transkriptionsfaktoren deren transkriptionelle Aktivität und damit den Zelleintritt in die S-Phase (Chen et al. [1989], DeCaprio et al. [1989], Buchkovich et al. [1989], Mihara et al. [1989]). Rb-E2F Komplexe können durch Bindung Chromatin modifizierender Enzyme die Transkription von S-Phase Genen auch aktiv inhibieren (Zhang et al. [1999]). In der G1-pm-Phase erfolgt durch Zyklin D/CDK4/CDK6- und Zyklin E/CDK2-Komplexe die Phosphorylierung von Rb (Weinberg [1995]) und die dadurch bedingte Freisetzung von E2F, das im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor DP zur Aktivierung von S-Phase Genen führt (Dyson [1998]).

S-Phase

Die Replikation chromosomaler DNA in der S-Phase ist Voraussetzung für eine erfolgreiche mitotische Zellteilung. Bei Eukaryonten erfolgt die Begrenzung der Verdopplung des genetischen Materials auf eine DNA-Replikation pro Zellzyklus durch einen konservierten Mechanismus. Dieser Mechanismus wird als Lizenzierung der DNA Replikation bezeichnet. Das Replikonmodell nach Jakob postuliert zwei essenzielle Komponenten für die Initiierung der DNA-Synthese: Initiator und Replikator (Jacob and Brenner [1963]). Dabei fungiert der Initiator als Faktor, der eine spezifische DNA-Sequenz innerhalb des genetischen Materials erkennt. Diese spezifische Gensequenz ist der Replikator. Der Replikator überlappt den Ort des Replikationsursprungs (*origin of replication*).

Im Gegensatz zum kleineren, bakteriellen Genom benötigen die sehr viel größeren Chromosomen der Eukaryonten mehrere Replikatoren, um ihr genetisches Material zu verdoppeln. Dabei operiert ein einziger, konservierter Faktor als Initiator der multilokulären DNA-Replikation: der *origin recognition complex* (ORC) (Bell [2002]). Dieser Komplex besteht aus 6 Proteinen (ORC1 - ORC6), die ein Molekulargewicht von 52 bis 120 kD aufweisen. An Studien mit *Saccharomyces cerevisiae* konnten autonome Replikationssequenzen (ARS) als Replikatoren nachgewiesen werden (Bell [1995]). Replikatoren von multizellulären Eukaryonten sind bisher unzureichend definiert (Bielinsky and Gerbi [2001]). Jedoch wurde ORC trotz struktureller Unterschiede in allen Säugerzellszellen als konservierter Faktor der Initiierung der DNA-Replikation nachgewiesen (Dutta and Bell [1997], Gossen et al. [1995]).

Die Bindung des Initiators ORC an den Replikator ist der erste Schritt zur Bildung eines multifaktoriellen Komplexes: dem präreplikativen Komplex (pre RC) (Bell and Dutta [2002]). Neben ORC setzt sich der pre RC sequenziell aus Cdc6/Cdc18, cdt1 und dem *minichromosome maintenance protein* (MCM2-7)-Komplex zusammen (Takisawa et al. [2000]). Cdc6/Cdc18 und cdt1 sind notwendige Faktoren für die Beladung des Chromatins mit dem MCM-Komplex (Nishitani et al. [2000], Maiorano and Moreau [2000]). Beide Faktoren interagieren zwar miteinander, können aber unabhängig voneinander an Chromatin binden.

Die Zusammensetzung des pre RC erfolgt am Übergang von der Mitose- zur G1-Phase. Ist der

pre RC etabliert, bleibt er während der gesamten G1-Phase erhalten. Bei Eintritt in die S-Phase wird der pre RC auf charakteristische Art und Weise aktiviert. Eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung spielen CDKs sowie die Dbf4p abhängige Kinase (Dbf4p-dependent kinase/DDK). Das spezifische Substrat der CDKs am pre RC ist noch nicht bekannt. Jedoch verhindert die CDK abhängige Phosphorylierung von MCM-Proteinen eine Re-Replikation des genetischen Materials (Ishimi et al. [2000]). Eine weitere Absicherung gegen erneute DNA Replikation ist die schnelle Degradierung von Cdc6 durch CDKs am Beginn der S-Phase (Drury et al. [2000]). Cdc6 ist für die Beladung des Chromatins mit MCM-Proteinkomplexen zuständig (Perkins and Diffley [1998]), die als DNA-Helikase wirken (Chong et al. [2000]). Außerdem sind alle MCM-Untereinheiten an Elongation und Initiation der DNA Replikation beteiligt (Labib et al. [2000]).

Die katalytische Untereinheit von DDK Cdc7 und das Aktivatorprotein Dbf4 sind in Säugetierzellen konserviert und ihre Bindung an den pre RC notwendige Bedingung für den Beginn der S-Phase (Jiang et al. [1999], Kumagai et al. [1999], Pasero et al. [1999]). Ein mögliches Substrat der DDK ist MCM2 (Jiang et al. [1999]). DDK bewirkt eine Konformationsänderung des MCM-Komplexes, die möglicherweise zum Schmelzen der DNA beiträgt.

DDK-Cdc7 und CDKs sind außerdem verantwortlich für die Beladung des Chromatins mit Cdc45 (Jares and Blow [2000], Zou and Stillman [2000]). Cdc45 ist ein Schlüsselprotein bei der Umwandlung des pre RC zum Initiationskomplex und bewirkt an der DNA eine Entspiralisierung ihrer Struktur (Walter and Newport [2000], Mimura et al. [2000], Tercero et al. [2000]). Außerdem ist die Bindung von Cdc45 an die DNA Voraussetzung für deren Beladung mit den Replikationsproteinen DNA-Polymerase, Replikationsprotein A (RPA) und dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Aparicio et al. [1999], Zou and Stillman [2000]).

Neben der DNA-Replikation erfolgt in der S-Phase die Duplikation des Zentrosoms. Das Zentrosom spielt als Zellorganell eine wichtige Rolle bei der Organisation des mikrotubulären Zytoskeletts während der Mitose und wird deshalb auch als *microtubule organizing center* bezeichnet. Ein Zentrosom besteht aus zwei Zentriolen, die aus mit Filamenten verbundenen Mikrotubuli aufgebaut sind.

Die Abbildung 1.1 symbolisiert die Konstitution des präreplikativen Komplexes in Abhängigkeit von der CDK-Aktivität in den jeweiligen Zellzyklusphasen (Bielinsky and Gerbi [2001]).

Der *origin recognition complex* bindet an den Replikator ARS. In der G1-Phase ist die CDK1-Aktivität gering und ORC rekrutiert Cdc6. Cdc6 ist für die Beladung des Chromatins mit dem MCM-Komplex zuständig. Beim Übergang von der G1- zur S-Phase nimmt die Aktivität von CDK1 zu und der präreplikative Komplex wird durch Cdc7-Dbf4 aktiviert und strukturell verändert. Nach erfolgreicher DNA-Replikation verbleibt der postreplikative Komplex stabil bis zum Ende der mitotischen Teilung. Eine vorzeitige Zusammensetzung des Replikationskomplexes und eine damit einhergehende Re-Replikation des genetischen Materials werden durch eine hohe CDK1-Aktivität bis zum Beginn der nächsten G1-Phase verhindert.

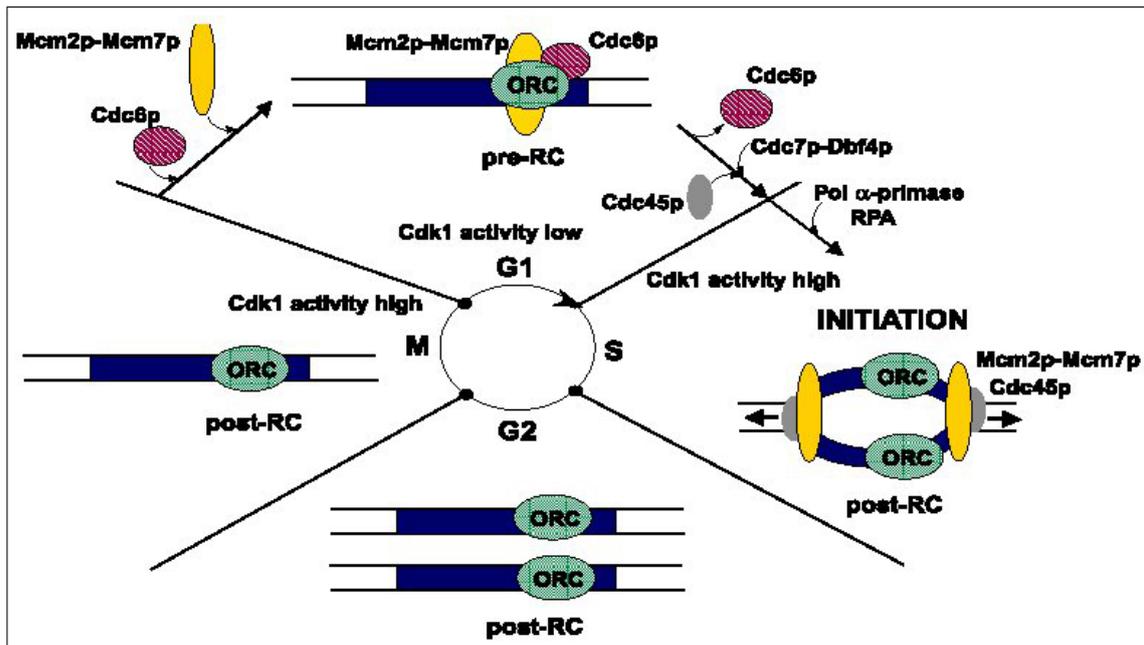


Abbildung 1.1: Zusammensetzung des präreplikativen Komplexes am Beispiel der Hefe.

G2-Phase

Die G2-Phase ist durch die Synthese mitotisch aktiver Enzyme und postreplikative Reparaturmechanismen charakterisiert. Der DNA-Gehalt verändert sich nicht. Auf Proteinebene kommt es während der gesamten G2-Phase zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zyklin A/CDK2-Aktivität, mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Kernmembranauflösung (Furuno et al. [1999]). Andere Kinasen wie *polo like kinases* (PLKs) werden zur Reifung der Spindelpole benötigt (Lane and Nigg [1996]). Aurora B ermöglicht durch Phosphorylierung von Histon H3 die Chromosomenkondensation (Hsu et al. [2000]).

Die Antephase beschreibt die späte G2-Phase, kurz vor der Chromosomenkondensation (Bullough and Johnson [1951]). In dieser Phase können Zellen bei Stress durch UV-Bestrahlung (Puck and Steffen [1963]), Hypothermie (Rieder [1981]) oder fehlerhafter Mikrotubulifunktion (Rieder and Cole [2000]) den Zellzyklusfortschritt Richtung Mitose am *nuclear envelope breakdown* (NEB)-Kontrollpunkt stoppen.

Wird der NEB-Kontrollpunkt aktiviert, werden Vorgänge der Prophase rückgängig gemacht und die Zelle in einem G2-Phase ähnlichen Zustand arretiert. Kennzeichnend für diesen Typ des Zellzyklusarrests sind hohe Zyklin B1/CDK1-Spiegel mit nur geringer Aktivität, da an der CDK1-Untereinheit die Aminosäuren Threonin 14 und Tyrosin 15 inhibitorisch phosphoryliert vorliegen (Hinchcliffe et al. [1999]).

Hat die Zelle den *point of no return* durchschritten, kann die Mitose nicht mehr aufgehalten werden, selbst wenn strukturell geschädigte DNA vorliegt (Mazia [1961]). Der *point of no return* definiert den eigentlichen Beginn der Mitose und liegt bei höher entwickelten Organismen in der späten Prophase (Rieder and Khodjakov [1997]). Dabei kommt es zu einer Aktivierung des *mitosis*

promoting factor (MPF). Der wichtigste Bestandteil des MPF ist der Zyklin B1/CDK1-Komplex, der in der G2-Phase zunächst inaktiv und im Zytosol lokalisiert ist (Ookata et al. [1992]). Die Aktivierung des Komplexes durch Phosphorylierung der *cytoplasmic retention sequence* (CRS) von Zyklin B1 in der späten Prophase und seine anschließende Akkumulation im Zellkern definiert molekularbiologisch den *point of no return* (Pines and Rieder [2001]).

Mitose

Die **Prophase** ist die erste Phase der Zellteilung in der sich Kernhülle und Nukleolus auflösen, die Chromosomen kondensieren und sich die Zentriole der Zentrosomen unter Ausbildung des Spindelapparates teilen. Aus depolymerisierten Mikrotubuli des Zytoskeletts wird eine Spindel aufgebaut, die sich sternförmig um die Zentriole anordnet. Jeweils ein Zentriolenpaar wandert auf die gegenüberliegende Seite des Zellkerns und definiert so die Spindelpole. Zwischen den Polen kommt es zur Ausbildung der zentralen Mitosespindel, die bei den späteren chromosomalen Verteilungsvorgängen eine Rolle spielt.

Der Beginn der Mitose - definiert als Durchschreiten des *point of no return* - kann je nach Zellart in der frühen oder späten Prophase liegen (Rieder and Khodjakov [1997]). Dabei wird der Hauptfaktor des MPF Zyklin B1/CDK1 durch *cdc25* phosphoryliert und aktiviert (Labbe et al. [1989]). Zwischen Zellkern und Zytoplasma besteht ein Gleichgewicht im Austausch von Zyklin B1/CDK1 durch Zellkernimport und -export (Yang et al. [1998]). Erst mit der Phosphorylierung von Zyklin B1 kommt es über ein nukleäres Proteinimportsignal zu einer Translokation von im Zytosol lokalisierten Zyklin B1/CDK1 in den Zellkern (Hagting et al. [1998]).

In der **Prometaphase** ist die Bewegung der kondensierten Chromosomen mikroskopisch erkennbar. Die Kernhülle zerfällt und die Spindelfasern dringen in den Kern ein. Am Zentromer, der primären Einschnürungsstelle des Metaphase-Chromosoms, entstehen Proteinkomplexe, die das Kinetochor bilden. Am Kinetochor setzen die Fasern des Spindelapparates an, um die Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Spindelpolen zu ziehen. Die Anheftung der Spindelfasern an das chromosomale Kinetochor wird durch den *kinetochore-attachment*-Kontrollpunkt überwacht. Nicht oder nur unvollständig angeheftete Kinetochore führen über eine signaltransduzierte Kaskade zu einer Verzögerung der Zellzyklusprogression. Die Signaltransduktion wird von den Proteinen BubR1 und Mad2, die sich an freie, unangeheftete Kinetochore binden, vermittelt. Dieser Mechanismus verhindert den vorzeitigen Abbau von Proteinen durch den *anaphase promoting complex* (APC), die für die Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität (Securin) und der Mitose-Phase (Zyklin B1) notwendig sind (Nasmyth et al. [2000], Wheatley et al. [1997]). Im Gegensatz dazu inhibiert der *kinetochore-attachment*-Kontrollpunkt nicht den APC vermittelten Abbau von Zyklin A (Hunt et al. [1992]). Der APC besteht aus einem großen Ubiquitin-Ligase-Komplex und ist während der Mitose- und frühen G1-Phase funktionell. Die Aktivierung des APC erfolgt durch Zyklin B1/CDK1, die Inhibierung durch *cdc20* (Morgan [1999]).

In der **Metaphase** werden die Chromosomen durch gleichmäßigen Zug des Spindelapparates in der Äquatorialebene der Zelle angeordnet. Der Spindelapparat besteht in der Metaphase aus der zentralen Mitosespindel und zwei Aster mit Astral-Mikrotubuli, die sich perizentriolär anordnen. Die Astral-Mikrotubuli sind mit dem Zellkortex assoziiert und legen die Zellteilungsebene fest. Die zentrale Mitosespindel besteht aus Kinetochor- und Polar-Mikrotubuli. Die Polar-Mikrotubuli weisen keinen chromosomalen Kontakt auf und stabilisieren die zentrale Mitosespindel. Die Kinetochor-Mikrotubuli liegen parallel zu den Polar-Mikrotubuli. Die Zugkräfte an den Chromosomen sind in beiden Polrichtungen gleich, sodass die Zwei-Chromatid-Chromosomen aus ihrer zentralen Position heraus langsam und gleichmäßig voneinander getrennt werden. Die Anaphase beginnt, wenn sich die Chromosomenpaare am Zentromer trennen und die beiden Tochterchromosomen zu den jeweiligen Polen wandern.

Der APC vermittelte Abbau von Securin ermöglicht in der **Anaphase** die Trennung jedes Chromosoms in zwei Tochterchromatiden (Nasmyth et al. [2000]). Die Ein-Chromatid-Chromosomen werden durch Verkürzung der Kinetochorfasern an den Zentromeren zu den entgegengesetzten Spindelpolen der Zelle transportiert. Gleichzeitig verlängern sich die Polfasern, wodurch sich die Pole voneinander entfernen. Die Anaphase wird funktionell in das Auseinanderrücken der Chromosomen (Anaphase I) und der Spindelpole (Anaphase II) unterteilt.

In der **Telophase** schreitet die durch den Spindelfaserapparat verursachte Bewegung der Tochterchromatiden zu den Polen weiter voran. Erreichen die Chromosomen die Spindelpole, erfolgt die vollständige Depolymerisation der sich verkürzenden Kinetochorfasern. Die Kernhülle und der Nukleolus werden neu gebildet, die Chromosomen decondensieren und der Spindelapparat löst sich auf. Diese Prozesse werden auf Proteinebene durch einen Abbau von Zyklin B begleitet.

Der Vorgang der Kernteilung innerhalb einer Zelle mit der Entstehung zweier genetisch identischer Zellkerne wird auch als **Karyogenese** bezeichnet. In proliferierenden Zellsystemen folgt der Karyogenese die Zytokinese und resultiert in zwei genetisch identischen Tochterzellen. Bleibt die Zytokinese nach erfolgter Karyogenese aus, liegt ein polyploider Chromosomensatz vor.

Der Prozess der **Zytokinese** ist durch die Einschnürung der Zellmembran in Höhe der Äquatorialebene gekennzeichnet und beginnt in der späten Telophase. Die Einschnürung der Zellmembran, die auch als Teilungsfurche bezeichnet wird, besteht aus einem Ring kontraktiver Aktin- und Myosinfasern, der sich soweit verengt, bis die Zellmembran fusioniert und sich die Tochterzellen voneinander trennen. Dabei entsteht zwischen den sich separierenden Tochterzellen am Ort der Zelltrennung eine komplexe Struktur, der *midbody*. Der an Mikrotubuli reiche *midbody* ist ein aus der Zellteilung resultierendes Produkt der zentralen Spindel. Nur der *midbody* steht bei Kardiomyozyten für den immunzytochemischen Nachweis der Zytokinese und der Entstehung zweier Tochterzellen. Da adulte Herzmuskelzellen einen hohen Anteil polyploider Zellen (Brodsky et al. [1980]) aufweisen, muss bei mitotischen Kardiomyozyten zwingend zwischen Karyogenese und Zytokinese unterschieden werden. Der *midbody* ist nur nach erfolgter Zytokinese immunzytochemisch nachweisbar. Karyogenese ohne Zytokinese führt nicht zur Ausbildung einer kontraktiven Teilungsfurche, nicht zur mechanischen Kompression und Durchtrennung der zentralen Spindel-

fasern und deshalb auch nicht zur Entstehung des *midbody*. Die Verdopplung und Aufteilung des genetischen Materials ist Voraussetzung für Karyogenese und Zytokinese. Für Kardiomyozyten und andere polyploiden Zellen gilt: Nach der Karyogenese folgt nicht zwingend eine Zellteilung, aber jeder Zellteilung muss eine Karyogenese vorangehen.

1.3.2 Zellzyklusfaktoren und Zellzyklusregulation in Kardiomyozyten

Die terminale Differenzierung von Kardiomyozyten ist im Allgemeinen mit einem Verlust von Zellzyklusaktivatoren wie CDK2, CDC2, Zyklin E, Zyklin A, Zyklin B und Markern der DNA-Replikation verbunden. Diese wachstumsregulierten Genprodukte werden von der E2F-Proteinfamilie kontrolliert (Black and Azizkhan-Clifford [1999]). Die Proteinfamilie besteht aus Transkriptionsfaktoren, die den G1/S-Phasenübergang eukaryonter Zellen steuern (Hauck and von Harsdorf [2005]).

E2F1, E2F2 und E2F3 können bei Überexpression eine S-Phasenprogression von Kardiomyozyten induzieren (von Harsdorf et al. [1999], Lukas et al. [1996]). Der G1/S-Phasenübergang allein führt jedoch nicht zu einem weiteren Durchlaufen des Zellzyklus. So zeigten Agah et al. [1997] und Kirshenbaum et al. [1996] einen adenoviral E2F1 vermittelten Zellzykluswiedereintritt an Kardiomyozyten, der jedoch an Apoptose gekoppelt ist. Eine verstärkte DNA-Synthese in Kardiomyozyten ohne Aktivierung von Apoptose konnten Ebel et al. [2005] durch adenovirale Überexpression von E2F2 und E2F4 nachweisen. E2F4 und E2F5 wirken als Transkriptionsrepressoren im Komplex mit Faktoren der Retinoblastoma-Proteinfamilie (pRb, p130, p107). Indem sie entsprechende Wachstumsgene unterdrücken, verbleiben Zellen in der G0/G1-Phase arretiert (Takahashi et al. [2000]). Weiterhin sind Mitglieder der E2F-Familie an der Apoptoseinduktion (Irwin et al. [2000]) und der Beibehaltung eines terminal differenzierten Zellstatus beteiligt. An Hand proliferierender, glatter Gefäßmuskelzellen konnte nachgewiesen werden, das fetale Schweineserum eine Hochregulation von E2F1 auf mRNA- und Proteinebene bewirkt. Die Transaktivierung des E2F1-Gens erfolgte durch Bindung von freien E2F1 an seinen Promotor (Fujita et al. [2002]). Weitere Studien belegen eine Regulierung der Zellzyklus abhängigen Expression von CDC6, MCM5 und MCM6 durch den Transkriptionsfaktor E2F1 anhand der embryonalen Fibroblastenzelllinie der Ratte REF52 (Ohtani et al. [1998]). Arbeiten, die die Regulierung von Faktoren des pre RC durch die E2F-Proteinfamilie an terminal differenzierten Kardiomyozyten untersuchen, liegen zur Zeit nicht vor.

Die Analyse zellulärer Signaltransduktionsmechanismen bei kardialer Hypertrophie zeigt, dass hypertrophe Stimuli zahlreiche *second messenger* Systeme aktivieren. Dabei handelt es sich um die Phospholipasen C, D und A2 sowie Ca^{2+} , PKC, Tyrosinkinase, Ras, Raf, MAP-Kinase und 90- und 70- kD Kinasen (Sadoshima et al. [1997]). Ebenso induzieren hypertrophe Stimuli verschiedene *immediate early* Gene (IE-Gene) wie c-fos, c-jun, c-myc und Egr-1 (Simpson et al. [1982]). Interessanterweise werden diese *second messenger* und IE-Gene auch durch mitogene Wachstumsreize aktiviert (Blenis [1993]).

Die engen Verknüpfungen zwischen Regulatoren des Zellzyklus mit der DNA-Replikation und hypertrophen Zellwachstum lassen eine Mitbeteiligung von Faktoren des pre RC an der Entstehung myokardialer Hypertrophie möglich erscheinen (Nozato et al. [2001], Tamamori-Adachi et al. [2002], Tamamori et al. [1998]).

1.4 Problemstellung

Im Rahmen der Dissertation soll untersucht werden, ob der Zellzyklusarrest adulter Kardiomyozyten reversibel ist. Durch *in vitro* Stimulation mit exogenen Zellzyklusfaktoren soll der Versuch unternommen werden, Zellteilung in Kardiomyozyten zu induzieren. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das immunzytologische Sichtbarmachen morphologisch charakteristischer Zellteilungsprozesse gerichtet. Da die Verdopplung des genetischen Materials eine wesentliche Voraussetzung für jede Zytokinese darstellt, soll erstmals die Rolle von Faktoren des pre RC bei Herzmuskelzellen untersucht werden.

Von besonderem klinischem Interesse ist dabei ein möglicher Zusammenhang zwischen DNA-Replikation und hypertrophen Zellwachstum. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die endogene Myokardregeneration als zukünftige, alternative Therapieoption in der Behandlung der Herzinsuffizienz zu etablieren.

Kapitel 2

Material

2.1 Geräte

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH, Vaculab S 3000
Autoradiographiefilm	Amersham Life Science, Hyperfilm ECL
Brutschrank Bakterien	Heraeus Instruments GmbH, Typ B6060
Brutschrank Säugerzellkulturen	Forma Scientific Incorporation, Modell 3862S/ N 36497-402
Cryo-Röhrchen	Nunc, 1.8ml
Deckgläser 12mm Durchmesser	Roth
Elektrophoresekammer	Bio Rad
Elektrophoresezubehör	Bio Rad
Entwicklungsgerät	Agfa, CURIX 60
Expositionskassetten	Kodak, X-Omatic
Gasdruckreduzierungsventil	Linde
Gasfilter	Roth
Gelgießvorrichtung	Amersham Pharmacia Biotech, Mighty Small Gel Casters
Geltrockner	Savant, Slab Gel Dryer SGD 2000
Injektionsspritzen	Braun
Hand-Homogenisator	Werkstätte Chemie und Photo
Heizblock	Techne, DRI-Block DB-2A
Kulturschalen	Greiner Labortechnik
Immunfluoreszenzmikroskop	Olympus BX 60 und IX 70
Phasenkontrastmikroskop	Leica, Invertmikroskop
Operationsbesteck	Roth
Perfusionsanlage	hauseigene Glasbläserei

pH-Meter	Beckmann F32 pH Meter
Photometer	Beckmann, DU 640
Pipetten	Eppendorf, Eppendorf Research
Pipettierhilfe	Roth, Pipetus-akku
PCR-Maschine	Eppendorf, Master Cycler Gradient
Rührer mit Heizplatte	Janke und Kunkel, IKAMAG RET
Schläuche und Verbinder	novodirect GmbH, Pharmed
Schlauchpumpe	ISMATEC, MV-Pumpsystem CA8
Schüttler	EB Edmund Bühler, WS-5
Ultraschall-Homogenisator	Bachhofer Sonoplus HD70
Spannungsgeber	Biometra, Power Pack P25
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, UVF6.12S
Sterilfilter	Schleicher und Schuell, FP 030/3
Überkopf-Drehmischer	novodirect GmbH, Mischer mit 33 rpm
Ventile	B.Braun Melsungen AG, Discofix
Waagen	Sartorius, Basic Typ BA 310S und BA 4100
Wasserbäder	Werkstätte Chemie und Photo, GFL 1002
Zählkammer nach Neubauer	Werkstätte Chemie und Photo
Tischzentrifugen (0.5-2ml)	Haraeus Instruments GmbH, Biofuge fresco
Standzentrifugen (bis 50ml)	Haraeus Instruments GmbH, Varifuge 3.0R
Großzentrifuge (bis 250ml)	Beckmann, Typ J2-HS

2.2 Chemikalien

Acrylamid	Bio-RAD
Ascorbinsäure	Sigma
Aqua bidest	Millipore
Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma
Gentamicin	Invitrogen
Penicillin	Sigma
Streptomycin	Sigma
Bacto-Agar	DIFCO
Bactotrypton	DIFCO
BSA	Sigma
FAF-BSA	Sigma
Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Linde
Cytosin β -O-Arabino-Furanosid	Sigma
dNTP	Roche Molecular Biochemicals
DAPI	Roche Molecular Biochemicals
EDTA	FLUKA
Formaldehyd	Sigma
FuGENE 6	Roche Molecular Biochemicals
Glucose	Sigma
Glutamin	GIBCO BRL
Glycin	Bio-RAD
Hefeextrakt	DIFCO
HEPES	Sigma
HOECHST	Molecular Probes
Insulin (vom Rind, Zinkkristalle)	GIBCO BRL
Insulin-Transferrin-Natriumselenit	Sigma
IPTG	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma
Kalziumchlorid	Sigma
Kreatinphosphat	Roche Molecular Biochemicals
L-Carnitin	Sigma
Magnesiumsulfat	Sigma
Molekulargewichtsmarker	Fermentas
N'N'-bis-methylen-acrylamid	Bio-RAD
Natriumchlorid	Sigma

Natriumhydrogenkarbonat	Serva
Natriumpyruvat	Boehringer Mannheim
Nonidet P40	Roche Molecular Biochemicals
NTP	Roche Molecular Biochemicals
Proteaseinhibitoren	Roche Molecular Biochemicals
Taurin	Sigma
Thymidin	Sigma
Trichloressigsäure	FLUKA
Triton-X 100	Sigma
Tween 20	Sigma
Western-Blot-Detektionsreagenz	Cell Signaling, Lumi GLO

Farbstoffe:

Bromphenolblau	Sigma
Phenolrot	Sigma
DAPI	Sigma
HOECHST	Sigma
Ponceou Rot	Sigma
Coomassie	Sigma
Phalloidin-TRITC	Sigma
Protein Assay Reagenz Kit	PIERCE

Trenn-und Trägermaterialien:

Filterpapier	Whatman
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech
PVDF-Membran	NEN
Siebgewebe, Gaze	neoLab

2.3 Biologisches Material

Antikörper:

Antikörper-spezifität	Klon/Kopplung	Spezies	Isotyp	Bezugsquelle
α Tubulin	Clone B-5-1-2	Maus	IgG1 monoklonal	Sigma
ORC4	Clone 17	Maus	IgG1 monoklonal	BD Biosciences
MCM2		Kaninchen	IgG1 polyklonal	BD Biosciences
MCM5		Kaninchen	IgG1 polyklonal	BD Biosciences
MCM6		Kaninchen	IgG1 polyklonal	BD Biosciences
MCM7/cdc47		Kaninchen	IgG1 polyklonal	BD Biosciences
BrdU	Clone B44	Maus	IgG1 monoklonal	Becton Dickinson
PiH3(Ser10)		Kaninchen	IgG polyklonal	Cell Signaling
cdc6	Clone 37F4	Maus	IgG2 monoklonal	Molecular Probes
MF20		Maus	IgG1 monoklonal	Dr. rer. nat. L. Hauck
Maus Ig	FITC/TRITC	Ziege	IgG (H+L)	Sigma
Kaninchen Ig	FITC/TRITC	Ziege	IgG (H+L)	Sigma
Kaninchen Ig	HRP	Esel	IgG (H+L)	Amersham
E2F2	H 120	Kaninchen	IgG1 polyklonal	Santa Cruz
cdk4	DCS156	Maus	IgG1 monoklonal	Cell Signaling
Zyklin D1	DSS6	Maus	IgG2 monoklonal	Cell Signaling
Aktin		Kaninchen	IgG polyklonal	Sigma

Enzyme und Enzyminhibitoren:

DNase I	Roche Molecular Biochemicals
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation
Pankreatin	Sigma

Tiere: Für die durchgeführten Arbeiten lag eine Tötungsanzeige bei der zuständigen Behörde vor. Die Tiere wurden von den Tierzuchtstellen Schönwalde und Charles River geliefert. Es handelte sich dabei um 4 bis 5 Tage alte neonatale und 10 bis 12 Wochen alte adulte Wistar Ratten.

In Vitro Zellkulturen: neonatale und adulte Kardiomyozyten der Ratte, HEC Zellen, IMR90 Zellen

2.4 Lösungen, Puffer und Medien

Die nachfolgenden Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem, pyrogenfreiem Wasser hergestellt, welches aus einer Milli Q-Anlage von Millipore entnommen wurde. Keimfreiheit wurde durch Sterilfiltration über ein Filtersystem von Millipore oder durch Autoklavieren erreicht.

Seren, Fertigmedien und Lösungen

0.1 % Poly-L-Lysin Lösung	Sigma
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml)	GIBCO BRL
0.2 % Xylazin-Lösung	Sanofi Ceva
10 % Ketamin-Lösung	Sanofi Ceva
Isofluran	Pharmacia Upjohn GmbH
0.4 % Trypan-Blau-Lösung	Sigma
35 % BSA-Lösung	Sigma
200 mM Glutamin	GIBCO BRL
DMEM/F12 Medium	GIBCO BRL
M199 + EARL's Salze	GIBCO BRL
PBS ²⁺ mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom KG
Pferdeserum	GIBCO BRL
Fetales Kalbsserum	PAA
Ziegenserum	Sigma
Heparin	Roche
Laminin (1 mg/dl)	Roche
Luminol und Peroxid	Cell Signalling
Eindeckelmedium ProLong Gold Antifade	Molecular Probes
Fixierungslösung:	3.7 % (v/v) Formaldehyd in PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Permeabilisierungspuffer:	0.1 % Triton-X 100 (v/v) in PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Blockingpuffer:	0.2 % (v/v) Tween 20 und 5 % (w/v) in PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Percoll Stock:	40.5ml Percoll, 4.5ml 10xPBS
Top Percoll:	18ml Percoll Stock, 22ml 1xPBS
Bottom Percoll:	26ml Percoll Stock, 14ml 1xPBS rot
PBS rot: 1 %	(w/v) Phenolrot in PBS

Kalziumchloridlösung:	100mM CaCl ₂
KHP Lösung A:	KHP, 1.7mM CaCl ₂
KHP Lösung B:	KHP, 0.1 % w/v FAF-BSA
KHP Lösung C:	KHP, 0.23 % w/v FAF-BSA, 0.04 Prozent w/v Kollagenase Typ II
KHP Lösung D:	KHP, 1 % w/v BSA
physiologische Kochsalzlösung:	0.9 % w/v NaCl in Aqua bidest

Acrylamid-Lösung:	Wasser	500 ml
	Acrylamid	146 g
	N'N'-bis-methylen-acrylamid	4 g

Polyacrylamidgel:		12 %	15 %
Trenngel:	Wasser	33.5 ml	23.5 ml
	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	25.0 ml	25.0 ml
	10 % SDS	1.0 ml	1.0 ml
	Acrylamid-Lösung	40 ml	50.0 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	500 µl	500 µl
	TEMED	50 µl	50 µl
Sammelgel:	Wasser		12.2 ml
	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8		5.0 ml
	10 % SDS		0.2 ml
	Acrylamid-Lösung		2.6 ml
	10 % Ammoniumpersulfat		100 µl
	TEMED		20 µl

Die Ammoniumpersulfatlösung wurde jeweils frisch angesetzt. Die Polyacrylamidgele wurden eine Minute nach Zugabe von TEMED gegossen und mit 1ml Wasser überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngeltes wurde das überstehende Wasser verworfen, das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und die Probenkämme eingesetzt.

SDS Probenpuffer:	Tris basisch, pH 6.8 DTT SDS Bromphenolblau Glycerin	50 mM 100 mM 2 % (w/v) 0.01 % (w/v) 10.0 % (w/v)
10xTBS:	Tris basisch, pH 7.6 NaCl	24.2 g 80 g
TE-Puffer:	Tris-HCl, pH 7.4 EDTA	10.0 mM 1.0 mM
Transferpuffer:	Glycin Tris basisch SDS Methanol	39 mM 48 mM 0.0375 % (w/v) 20 % (v/v)
Medium für neonatale Kardiomyzyten:	DMEM/F12-Medium Natrium-Pyruvat L-Glutamin Ascorbinsäure Insulin Transferrin Natriumselenit Penicillin Streptomycin BSA	3.0 mM 2.0 mM 0.1 mM 1.0 µg/ml 1.0 µg/ml 1.0 ng/ml 100 U/ml 100 µg/ml 0.21 % (v/v)
Medium für adulte Kardiomyzyten:	M199 mit EARL's Salzen BSA Insulin Kreatinin L-Carnitin Taurin Penicillin Streptomycin	0.2 % (w/v) 15 µg/ml 5.0 mM 2.0 µg/ml 5.0 mM 100 U/ml 100 µg/ml
Medium für Zellkultur:	DMEM/F12-Medium L-Glutamin Penicillin Streptomycin FCS	500 ml 2.0 mM 100 U/ml 100 µg/ml 10.0 %

Krebs-Henseleit-Puffer:	NaCl	127.0 mM
	KCl	4.6 mM
	NaHCO ₃	24.8 mM
	KH ₂ PO ₄	1.2 mM
	D-Glucose	8.3 mM
	Na-Pyruvat	2.0 mM
	Kreatinin	10.0 mM
	Taurin	20.0 mM
PBS:	Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4	10.14 mM
	KH ₂ PO ₄	1.76 mM
	KCl	2.7 mM
	NaCl	137 mM
Trypsin/EDTA-Lösung:	Trypsin	1.25 mg/dl
	EDTA	0.67 mM
	KCl	5.4 mM
	NaHCO ₃	4.2 mM
	Glucose	5 mM
	NaCl	137 mM
Verdauungspuffer:	HEPES-NaOH, pH 7.6	20 mM
	NaCl	130 mM
	KCl	3 mM
	NaH ₂ PO ₄	1 mM
	Glucose	4 mM
	DNase I	15 µg/ml
	Trypsin	1.5 mg/dl

Sterilfiltrierte Glucose, Trypsin und DNase I wurden direkt vor jedem Versuchsbeginn frisch zugesetzt.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus Rattenherzen

3.1.1 Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten

Die Präparation ventrikulärer neonataler Kardiomyozyten erfolgte leicht modifiziert nach der Methode von Simpson et al. [1982]. Vier bis fünf Tage alte Wistar-Ratten wurden mit einer chirurgischen Schere dekapitiert. Anschließend wurde der unter Spannung stehende Brustkorb eröffnet und das hervortretende Herz mit einer gebogenen Pinzette entnommen und in eiskalte ADS Lösung überführt. Nach einmaligem Waschen der Herzen mit eiskalter ADS Lösung wurden die Vorhöfe mit einem Skalpell abgetrennt und die verbleibenden Ventrikel nach erneutem Waschen mechanisch zerkleinert. Das zerkleinerte Herzgewebe wurde in einen sterilen Glaskolben mit zwei Rührfischen überführt. Ein Vorverdau des Herzgewebes erfolgte mit 25 ml vorgewärmter Enzymlösung im 37 °C Wasserbad bei 500 rpm für 5 min. Der Vorverdau dient der Entfernung von korpuskulären Blutbestandteilen aus dem zerkleinerten Herzmuskelgewebe. Nach dem Sedimentieren des Gewebes wurde der Überstand verworfen und der Verdau 8 bis 12 Mal wiederholt, bis sich das Herzmuskelgewebe vollständig auflöste. Der Kardiomyozyten enthaltende Überstand der jeweiligen Verdauungsschritte wurde auf 2.5 ml eiskaltes 10 % Pferdeserum gegeben, um den weiteren Verdau zu stoppen. Die so gewonnenen Zellen wurden zentrifugiert (4 min, 4 °C, 330 g), das Zellpellet in 8 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Zur Trennung neonataler Herzmuskelzellen von Nicht-Myozyten wie Erythrozyten und Fibroblasten wurden je 2 ml der PBS-Zellsuspension auf einen Percollgradienten geladen. Der Percollgradient bestand aus 4 ml Top-Percoll, der mit 3 ml Bottom-Percoll unterschichtet wurde. Der mit der Zellsuspension beladene Percollgradient wurde bei Raumtemperatur für 30 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste Schicht verworfen und die untere kardiomyozytenhaltige Schicht in ein neues Falcon Röhrchen überführt. Die so gewonnenen Kardiomyozyten wurden zweimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und in 10 ml neonatales Kardiomyozytenmedium resuspendiert. Mittels einer Neubauer-

Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Im Allgemeinen wurde eine Ausbeute von ca. 1 Millionen Kardiomyozyten pro neonatalen Rattenherz erzielt. Die Zellen wurden in mit 1 % Gelatine beschichteten Zellkulturträgern ausgesät. Dabei wurden für Proteinanalysen ca. 1.000.000 Zellen pro Zellkulturschale (d=6 cm) und für immunzytochemische Untersuchungen 200.000 Zellen pro well (d=12 mm) kultiviert. Um die Proliferation verbliebener Nicht-Kardiomyozyten zu hemmen, wurde dem Zellkulturmedium für 24 Stunden 100 mM Cytosin- β -O-Arabino-Furanosid zugesetzt.

3.1.2 Adulte Kardiomyozyten des linken Ventrikels

Adulte linksventrikuläre Kardiomyozyten wurden von 12 Wochen alten, ca. 250 g schweren männlichen Wistar-Ratten mit einer modifizierten Langendorff-Apparatur nach Powell et al. [1980] isoliert. Die Tiere wurden in einer Narkosekammer durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose (1 % v/v) bis zum Verlust des Stell- und Lidreflexes immobilisiert und anschließend durch intramuskuläre Injektion von Ketamin/Xylazin (130 μ g/20 μ g pro g Körpergewicht) anästhesiert. 10 Minuten nach intraperitonealer Verabreichung von Heparin (5 I.E. pro g Körpergewicht) wurde der Zwischenzeilenreflex getestet. Bei ausbleibender Reizantwort wurde die Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere eröffnet, das Zwerchfell und die Rippen von kaudal durchtrennt und das Brustbein nach kranial disloziert. Das so frei präparierte zugängliche Herz wurde manuell entnommen und in eiskalte physiologische Kochsalzlösung mit Heparin überführt. Das Herz wurde über die Aorta ascendens mit einem chirurgischen Nahtfaden an die Kanüle (K) der Langendorff-Perfusionapparatur gebunden und retrograd perfundiert. Die Verdauungen gelangten über die Aorta retrograd durch die Ostia aortae coronariae in beide Koronargefäße und verdauten das Muskelgewebe über die Kapillargefäße homogen. Durch den Sinus coronarius gelangten die Lösungen in den rechten Vorhof und verliessen das Herz über die obere und untere Hohlvene. Entscheidend für das Gelingen der Perfusion sind ein luftfreies System, um Luftembolien mit nachfolgender Gewebeeinfärbung zu vermeiden sowie die Positionierung der Perfusionskanülenöffnung (K) oberhalb der Aortenklappe. Das Herz wurde 3 min mit 1.7 mM CaCl₂ /Krebs-Henseleit-Puffer (Lösung A) perfundiert, um verbliebenes Blut aus den Koronargefäßen und dem Myokard zu entfernen. Danach wurde das Herz bis zum Herzstillstand mit 0.1 % (w/v) FAF-BSA/KHP (Lösung B) perfundiert. Dabei erfolgt eine kalziumabhängige Dissoziation der myokardialen Desmosomstrukturen, eine Voraussetzung für das Herauslösen einzelner Herzmuskelzellen aus dem myokardialen Gewebeverband. Der eigentliche enzymatische Verdau erfolgte mit 0.04 % Kollagenase Typ II/0.23 % FAF-BSA/KHP (Lösung C) zirkulär im Bypassverfahren. Alle Lösungen wurden im Wasserbad auf 38 °C erwärmt und kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Die Pumpe arbeitete mit einer Durchflussrate von 11 ml/min. Nach erfolgtem Verdau wurde das Herz von der Kanüle entfernt und nach Separation der Vorhöfe und des rechten Ventrikels mit einem Skalpell vorsichtig zerkleinert. Zur besseren Auftrennung der Zellen aus dem myokardialen Gewebeverband wurde das zerkleinerte Herzmuskelgewebe in den mit Lösung C gefüllten Trichter (T) überführt und für 10 min invers begast. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Siebgewebe (Maschenweite: 200 μ m) filtriert und

bei Raumtemperatur für 3 min bei 38 g zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Lösung B erfolgte eine langsame Erhöhung der Kalziumkonzentration (0.25, 0.5, 1 mM) und ein erneuter Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur. Die in 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommenen Herzmuskelzellen wurden auf Laminin beschichtete Zellkulturgefäße ausplattiert. Zwei Stunden nach Aussaat der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel mit 0.01 % (v/v) Gentamycin/Medium.

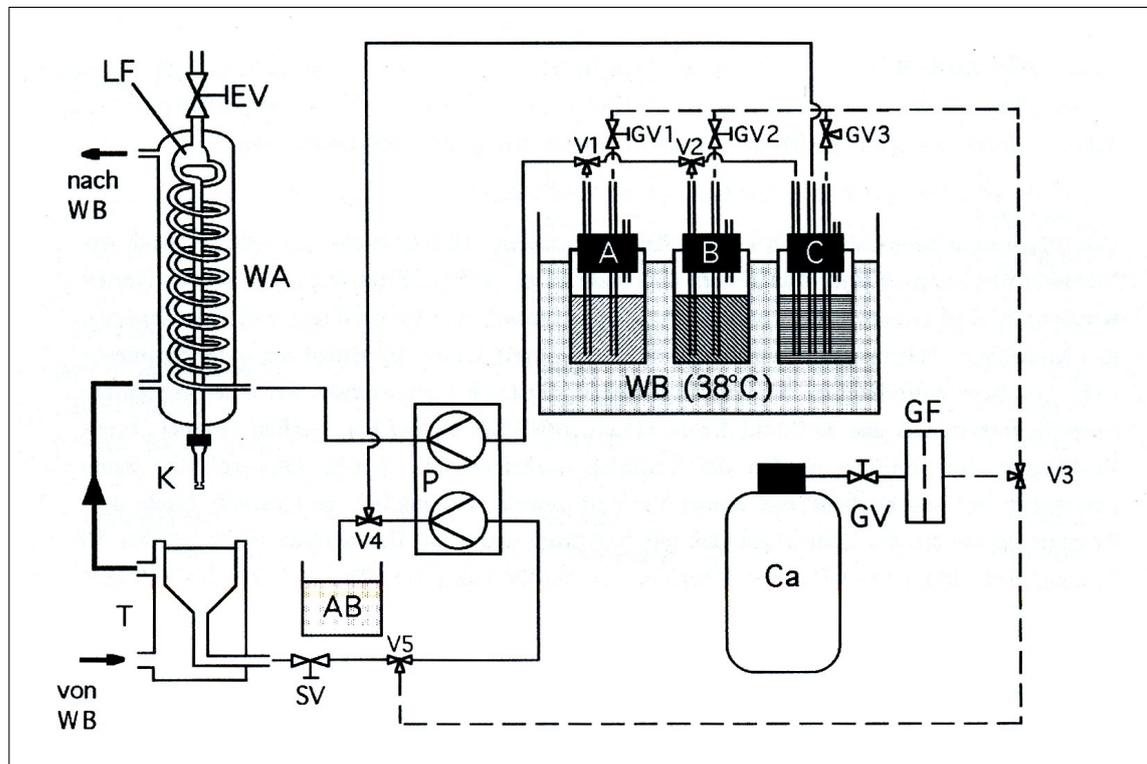


Abbildung 3.1: Ein Rattenherz wurde an die Kanüle (**K**) der Perfusionsanlage befestigt und nacheinander mit den Lösungen A (**A**: 1.7 mM CaCl_2/KHP , 3 min), B (**B**: 0.1 % FAF-BSA/KHP, 5 min) und C (**C**: 0.04 % Kollagenase Typ II/0.23 % FAF-BSA/KHP, 30 min zirkulär gepumpt) perfundiert. Die Lösungen wurden ständig mit Carbogen begast und auf 38 °C temperiert. **AB**: Abfallbehälter; **Ca**: Carbogen; **EV**: Entgasungsventil; **GF**: Gasfilter; **GV**: Gasreglerventil; **P**: Schlauchpumpe; **SV**: Sperrventil; **T**: Trichter; **V**: Ventil; **WA**: Wärmeaustauscher; **WB**: Wasserbad; —: Gaszufuhr; Pumpschläuche für Wasser und Lösung A, B und C

3.1.3 Bestimmung der Lebendanzahl

Eine Teilprobe der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit 0.4 % (w/v) Trypan-Blau-Lösung versetzt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Gegensatz zu vitalen Zellen nehmen Zellen mit geschädigter Zytoplasmamembran den Farbstoff auf und werden blau angefärbt. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden nicht blau gefärbte Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mithilfe eines Invertmikroskopes gezählt. Durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor ergibt sich die Anzahl vitaler Zellen pro ml Zellsuspendat.

3.2 Methoden der Proteinbiochemie

3.2.1 Methoden zur Proteinanalyse

Präparation von zytoplasmatischen Zellextrakten

Kultivierte Zellen wurden vom Medium befreit und einmalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit SDS Probenpuffer, dem vor Benutzung DTT frisch zugesetzt wurde. Die Zellen wurden unmittelbar nach Zugabe von SDS Probenpuffer mittels eines Zellschabers vom Kulturgefäß entfernt und in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Probe wurde für 10-15 Sekunden sonifiziert, um die Viskosität zu verringern und die Zellyse zu komplettieren. Anschließend wurden die Proteine in 20 μ l Aliquots für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Aufbewahrung des zytoplasmatischen Zellextrakts erfolgte bei -80 °C.

Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten

Der Proteingehalt des zytoplasmatischen Zellextraktes wurde mit dem Bicinchonininsäure (BCA) Testverfahren der Firma Pierce nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Proteine bilden mit Cu^{2+} Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden (Smith and Klenk [1985]). Die Konzentration des Farbkomplexes kann spektrometrisch bei 560 nm gemessen werden und verhält sich proportional zur Anzahl der Kupferionen und somit zur Proteinmenge. Die Zellextrakte wurden mit modifiziertem SDS Probenpuffer verdünnt, so dass ihre Absorptionswerte im linearen Bereich der mit BSA- Fraktion V erstellten Standardkurve lagen. Die Protein- als auch die Standardbestimmung erfolgte dreifach in 96er Mikrotiterplatten. Pro Reaktionsgefäß wurde zu 10 μ l verdünnter Probe 200 μ l BCA-Reagenz zugefügt. Beim Leerwert wurde die Probe durch 10 μ l modifizierten SDS Probenpuffer ersetzt. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, für 30 Sekunden in einem automatisierten Mikrotiterplatten-Lesegerät geschüttelt und die Absorption bei 560 nm gemessen. Unter Bezugnahme auf die gemessenen BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte vertikal mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [1970]. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Probenpuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und in mindestens 10 μ l SDS Probenpuffer aufgenommen. Nach einer Proteindenaturierung bei 100 °C für 3 min wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Spülen der Geltaschen wurden die Proteinproben sowie ein Molekulargewichtsstandard (Marker) aufgetragen. Als Trennmedium wurden in Abhängigkeit des zu analysierenden Proteins homogene

10-15 prozentige Polyacrylamidgele verwendet. Das Molekulargewicht des Proteins in kDa wurde durch den Vergleich seiner elektrophoretischen Mobilität mit der eines Standardproteins mit bekanntem Molekulargewicht bestimmt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 Volt und 20 mA.

Standard-Coomassie-Färbung

Die Gele wurden für 10 min bei Raumtemperatur in 20 % Trichloressigsäure fixiert, zweimal mit Aqua bidest gewaschen und 60 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit 20 % Methanol/10 % Eisessig. Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier getrocknet.

Western-Blot-Analyse

Für den elektrophoretischen Proteintransfer vom SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran wurde ein halbtrockenes Verfahren angewandt. Dabei wurden Filterpapiere entsprechend der Größe der Graphitelektroden in Transferpuffer getränkt. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene hydrophobe PVDF-Membran wurde für 90 s in Methanol inkubiert, mit Aqua bidest gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer gelagert. Membran und Gel wurden zwischen die getränkten Filterpapiere gelegt und zu einem Blot-Stapel mit direktem Kontakt zu zwei horizontalen Graphitplatten-Elektroden zusammengesetzt. Der Proteintransfer aus dem Gel in Richtung der Anode auf die PVDF-Membran erfolgte bei 150 mA für 90 min. Als Kontrolle diente ein Farbstoff markierter Molekulargewichtsstandard.

Chemolumineszenz-Detektionsverfahren

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation der Membran in 0.1 % Tween20/TBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Blotmembran mit 0.1 % Tween20/TBS für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit mono- oder polyklonalen Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C unter langsamem Schütteln. Ungebundene Primärantikörper wurden durch erneutes, mehrmaliges Waschen der Membran mit 0.1 % Tween20/TBS entfernt. In Abhängigkeit von der Herkunft des Primärantikörpers wurden als sekundäre Antikörper Schaf-anti Maus IgG-HRP oder Esel-anti Kaninchen IgG-HRP verwendet. Dazu wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt in 0.1 % Tween20/TBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen für jeweils 5 min erfolgte die Immundetektion mittels verstärkter Chemolumineszenz. Dabei wird unter alkalischen Bedingungen das zyklische Diazylhydrazid Luminolin in Gegenwart des Reaktionsverstärkers Phenol durch die *horseradish peroxidase* oxidiert. Nach der Oxidation befindet sich Luminolin in einem energetisch angeregten Zustand, aus dem es unter Lichtemission in den Grundzustand zurückkehrt. Die dabei emittierte elektromagnetische

Strahlung kann mit einem autoradiographischen Film detektiert werden. Zur Durchführung wurde Western-Blot-Detektionsreagenzlösung für 60 s auf die feuchte Membran gegeben, die Substratlösung verworfen und die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Expositionszeit des Filmes richtete sich nach der Quantität des untersuchten Proteins und lag zwischen 20 s und 10 min. Die Filmentwicklung erfolgte in einem automatischen Entwicklungsgerät. Das Molekulargewicht der detektierten Proteine wurde durch einen gefärbten Molekulargewichtsmarker bestimmt.

3.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Fixierung und Permeabilisierung

Der Nachweis von exprimierten Zellzyklusproteinen *in vitro* erfolgte durch immunzytochemische Analysen. Dazu wurden neonatale und adulte Kardiomyozyten auf Glasplättchen kultiviert und gegebenenfalls stimuliert. Zum Entfernen von Zelldetritus wurden die Zellkulturträger mit 37 °C warmem Medium und PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Inkubation in 3.7 % Formaldehyd für 8 min. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellmembranen mit 0.1 % Triton-X100 permeabilisiert, um ein Diffundieren der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Die fixierten und permeabilisierten Kulturen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit 0.2 % Tween20/5 % BSA (w/v)/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Färbung und lichtmikroskopische Analyse

Primäre Antikörper wurden in 0.2 % Tween20/5 % BSA (w/v)/PBS 1:50 verdünnt und die Proben über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 0.1 % NP40/PBS wurden erneut unspezifische Bindungsstellen mit 0.2 % Tween20/5 % BSA (w/v)/PBS blockiert (45 min, Raumtemperatur). Mit TRITC oder FITC markierte sekundäre Antikörper gegen Maus oder Kaninchen wurden in Verdünnung 1:125 für 90 min bei Raumtemperatur auf die Proben gegeben. Anschließend wurden die Präparate zur Reduzierung des Fluoreszenzhintergrundes 6-mal für jeweils 5 min mit 0.1 % NP40/PBS gewaschen. Nach einmaligem kurzem Spülen der Proben mit Aqua bidest erfolgte ihre Konservierung auf einem Objektträger mit DAPI haltigem Eindeckmedium. Die immunzytochemische Analyse der gefärbten Proben wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss und mittels digital gespeicherter Bilder vorgenommen.

3.3 Statistische Analyse

Alle Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der StatView-Software.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Immunzytologischer Nachweis von Herzmuskelzellen

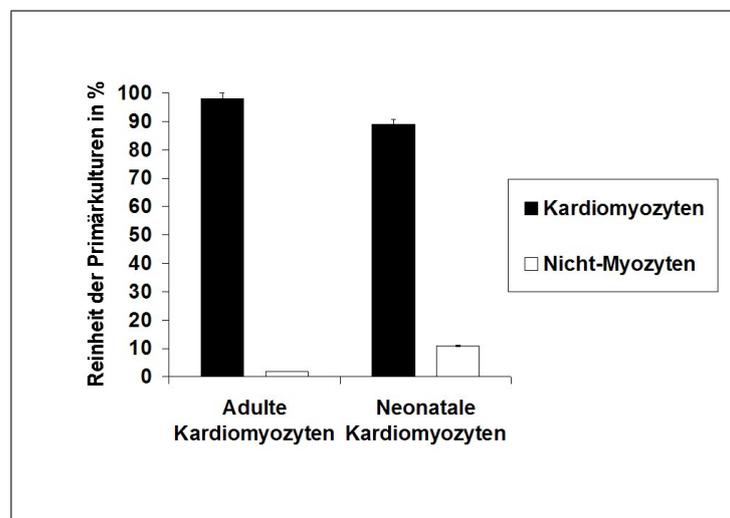


Abbildung 4.1: Immunzytochemische Bestimmung der Reinheit adulter und neonataler, primärer Kardiomyozytenkulturen.

Bei der Präparation kardiomyozytärer Primärkulturen werden neben Herzmuskelzellen auch weitere zelluläre Bestandteile des Herzens wie Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten freigesetzt. Deshalb muss für die Untersuchung von Mitose und Zellteilung an Herzmuskelzellen ein sicherer immunzytologischer Nachweis des Zelltyps gewährleistet sein. Durch Aufreinigen der isolierten, neonatalen Herzmuskelzellen über einen Percollgradienten und anschließende Aussaat der Zellen in serumarmen, Cytosin- β -O-Arabino-Furanosid supplementierten Zellkulturmedium konnte eine Reinheit von 88.5 % erzielt werden. Die Reinheit adulter Kardiomyozytenkulturen lag bei durchschnittlich 98 %. Der Nachweis von neonatalen und adulten Kardiomyozyten in der Zellkultur wurde mittels Immunzytologie geführt. Zum Einsatz kamen die kardiomyozytenspezifischen Antikörper MF20 und Phalloidin-TRITC.

4.2 Nachweis von Faktoren des präreplikativen Komplexes bei neonatalen und adulten Kardiomyozyten

Die Expression der Faktoren des präreplikativen Komplexes stellt eine notwendige Voraussetzung zur Einleitung der S-Phase dar. Keiner der Einzelfaktoren des pre RC ist dabei redundant. Fehlt nur ein einziger Faktor des pre RC kann die S-Phase nicht induziert werden (Newlon [1997]). Proliferierende Zellen weisen deshalb alle Bestandteile des pre RC auf. Von besonderem Interesse ist deshalb die Frage, wie terminal differenzierte Herzmuskelzellen mit diesen für den Progress des Zellzyklus essenziellen Faktoren ausgestattet sind. Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben über das Vorhandensein von Faktoren des präreplikativen Komplexes in Herzmuskelzellen.

Da sich die Mehrzahl der kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Epitope des Menschen oder der Maus richtet, wurde zunächst im Western Blot (WB) getestet, welche Antikörper im Tiermodell Ratte anwendbar sind. Als Positivkontrolle diente dabei der Ganzzellextrakt kultivierter, kardialer Fibroblasten der Ratte.

Die Tabelle gibt Auskunft über die getesteten Antikörper:

Anti-körper	Spezies,Klon	Masse in kD	Hersteller	Nachweis im WB
CDC6	Maus, monoklonal	62	Upstate	negativ
CDC6	Maus, monoklonal	62	CalBioChem	negativ
CDC6	Maus, monoklonal	62	Oncogene	negativ
CDC45	Kaninchen, polyklonal	64	Ohtani	negativ
CDC47	Maus, monoklonal	85	Neomarker	positiv
ORC1	Maus, monoklonal	120	Neomarker	negativ
ORC2	Maus, monoklonal	72	PharMingen	negativ
ORC2	Kaninchen, polyklonal	72	PharMingen	negativ
ORC3	Kaninchen, polyklonal	78	München	negativ
ORC4	Maus, monoklonal	45	Transduction Lab	positiv
ORC5	Kaninchen, polyklonal	52	PharMingen	negativ
MCM2	Kaninchen, polyklonal	125	PharMingen	positiv
MCM3	Kaninchen, polyklonal	105	PharMingen	negativ
MCM4	Kaninchen, polyklonal	97	PharMingen	negativ
MCM5	Kaninchen, polyklonal	90	PharMingen	positiv
MCM6	Kaninchen, polyklonal	105	PharMingen	positiv
MCM7	Kaninchen, polyklonal	85	PharMingen	negativ

Nur die Faktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7/cdc47 konnten durch Antikörper in proliferierenden Zellkulturen der Ratte nachgewiesen werden.

Mittels Western Blot wurde das Vorliegen dieser Faktoren auf Proteinebene im Ganzzellextrakt unstimulierten neonatalen und adulten Herzmuskelzellen der Ratte untersucht. Die Ganzzellextrakte wurden unmittelbar nach der Gewinnung der Primärkulturen durch Sonifizierung der Zellpellets gewonnen.

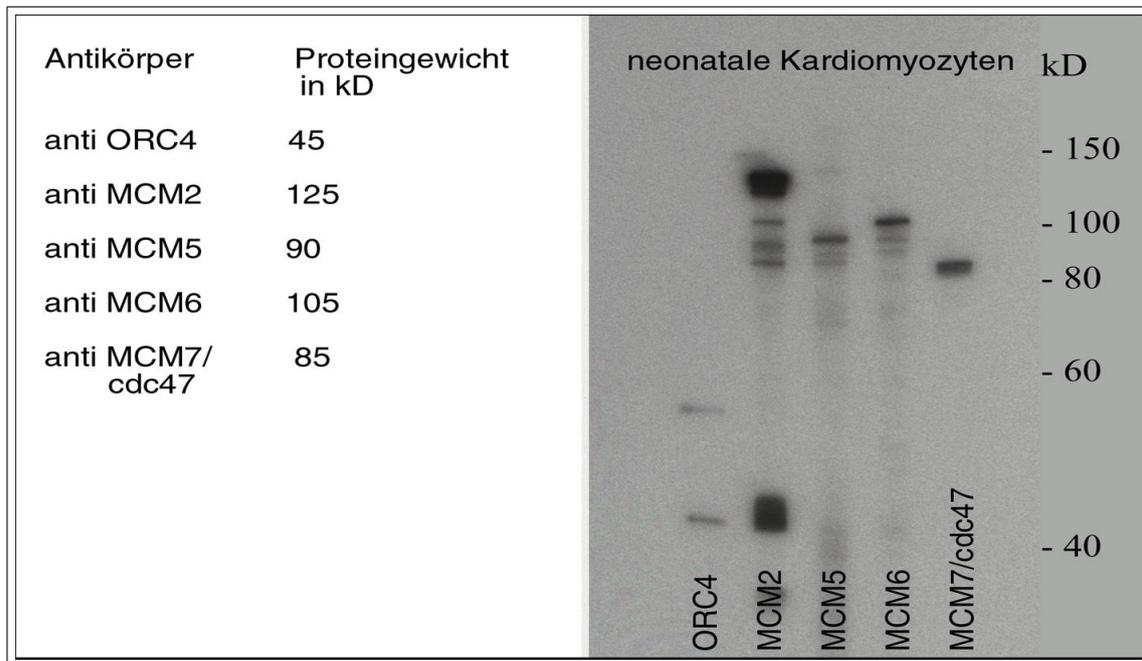


Abbildung 4.2: Nachweis der präreplikativen Faktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7/cdc47 im Ganzzellextrakt unstimulierter, 5 Tage alter, neonataler Herzmuskelzellen auf Proteinebene

Während im Ganzzellextrakt unstimulierter, 5 Tage alter, neonataler Herzmuskelzellen und in der Positivkontrolle die Faktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7 auf Proteinebene nachweisbar sind, gelang dieser Nachweis im Ganzzellextrakt 12 Wochen alter, adulter Herzmuskelzellen nicht.

4.3 Serumstimulation adulter Kardiomyozyten führt zu einer differenziellen Expression präreplikativer Faktoren

12 Wochen alte Kardiomyozyten der Ratte wurden für 16 Stunden mit 20 % fetalem Kälberserum stimuliert, um zu untersuchen, ob die seruminduzierte Hypertrophie adulter Herzmuskelzellen *in vitro* zur Re-Expression präreplikativer Faktoren und einem G-1/S-Phase-Übertritt führt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Ganzzellextrakte bezüglich der Expression der Präreplikationsfaktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7 auf Proteinebene sowie mittels Immunzytochemie.

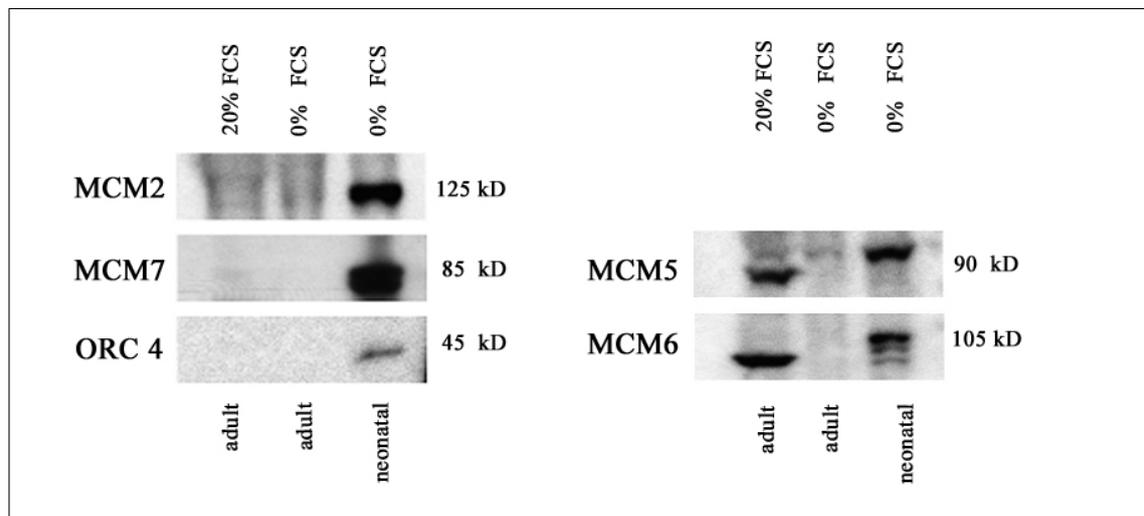


Abbildung 4.3: Nachweis der präreplikativen Faktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7 im Ganzzellextrakt unstimulierter, 5 Tage alter, neonataler Herzmuskelzellen auf Proteinebene. Unstimulierte, adulte Kardiomyozyten exprimieren keine der untersuchten Replikationsfaktoren. Adulte Herzmuskelzellen, die mit 20 % FCS stimuliert wurden, exprimieren ein Subset präreplikativer Faktoren bestehend aus MCM5 und MCM6.

Im Western Blot konnte bei serumstimulierten, adulten Herzmuskelzellen eine partielle Re-Expression der Faktoren MCM5 und MCM6 nachgewiesen werden. MCM2, MCM7 und ORC4 ließen sich weder mittels Western Blot noch immunzytochemisch bei serumstimulierten, adulten Kardiomyozyten nachweisen.

Serumstimulierte, adulte Kardiomyozyten *in vitro* verhalten sich also wie proliferierende Zellsysteme mit einer Aktivierung des Zellzyklus. Allerdings exprimieren infolge Serumstimulation hypertrophierte Kardiomyozyten nur ein Subset der für die DNA-Replikation notwendigen Präreplikationsfaktoren. Der Nachweis der im Western Blot detektierten Präreplikationsfaktoren gelang auch auf immunzytochemischer Ebene.

Die Abbildung 5.4 zeigt exemplarisch den immunzytochemischen Nachweis des Präreplikationsfaktors MCM5 bei unstimulierten, neonatalen und serumstimulierten, adulten Kardiomyozyten. In serumfrei kultivierten, adulten Herzmuskelzellen lässt sich MCM5 weder immunzytochemisch noch auf Proteinebene mittels Western Blot nachweisen. Die Stimulation adulter Kardiomyozy-

ten mit Serum führt zur Expression des Präreplikationsfaktors MCM5 und zur Hypertrophie. Eine kausale Verknüpfung der myokardialen Hypertrophie mit der Expression von Faktoren des pre RC erscheint denkbar.

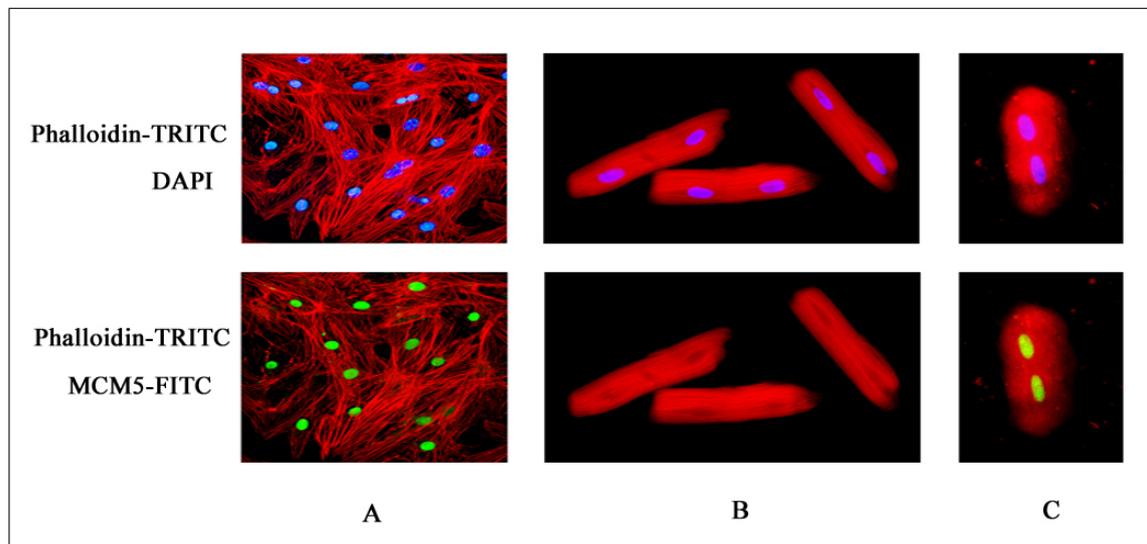


Abbildung 4.4: **A:** Neonatale Kardiomyozyten in serumfreiem Kulturmedium. Zum Nachweis der Herzmuskelzellen wurde ein TRITC markierter Aktin-spezifischer Phalloidinantikörper verwendet. Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt. Der Präreplikationsfaktor MCM5 wurde mit einem FITC markierten, polyklonalen und spezifischen Antikörper dargestellt. MCM5 lässt sich in serumfrei kultivierten, neonatalen Kardiomyozyten intranukleär immunzytochemisch nachweisen. **B:** Zur Darstellung kommen binukleäre, adulte Kardiomyozyten ohne Serumstimulation. Sichtbar ist die Querstreifung der myokontraktiven Filamente. Weder auf Proteinebene noch immunzytochemisch gelingt der Nachweis von MCM5 bei Kardiomyozyten in serumfreiem Medium. **C:** Hypertrophierter, adulter Kardiomyozyt nach 16 h Stimulation mit 20 % FCS. Im Vergleich zu unstimulierten Kardiomyozyten fallen eine Größenzunahme und die Abnahme der quergestreifter Filamente auf. Intranukleär gelingt der immunzytochemische Nachweis von MCM5.

4.4 Die differenzielle Expression präreplikativer Faktoren induziert keinen Zellzykluswiedereintritt serumstimulierter, adulter Kardiomyozyten

In einem nächsten Schritt wurde immunzytochemisch untersucht, ob bei unstimulierten, neonatalen und serumstimulierten, adulten Herzmuskelzellen ein G1-/S-Phasen-Übergang stattfindet. Als immunzytochemischer Marker der S-Phase diente BrdU, das als Nukleotidanalogon in die replizierte DNA eingebaut wird (Avivi et al. [1994]). Die immunzytochemische Darstellung FITC markierter BrdU-Antikörper beweist DNA-Replikation und somit S-Phase.

Erwartungsgemäß ließ sich bei mit 20 % FCS stimulierten, adulten Kardiomyozyten keine S-Phase nachweisen. Zur DNA-Replikation ist die Expression aller nicht redundanter Präreplikationsfaktoren notwendig. Im Vergleich zu unstimulierten, neonatalen Herzmuskelzellen exprimieren serumstimulierte, adulte Kardiomyozyten aber nur ein Subset dieser Faktoren. Interessanterweise konnte auch bei neonatalen Herzmuskelzellen kein Übergang in die S-Phase immunzytologisch festgestellt werden, obwohl diese Zellen ein vollständigeres Profil an Präreplikationsfaktoren exprimieren als serumstimulierte, adulte Kardiomyozyten. Ob neonatale Kardiomyozyten über alle zur DNA-Replikation notwendigen Faktoren verfügen oder ob andere Mechanismen einen G1-/S-Phase-Übergang inhibieren, kann aufgrund einer eingeschränkten Auswahl geeigneter spezifischer Antikörper gegen Faktoren des pre RC nicht abschließend beantwortet werden.

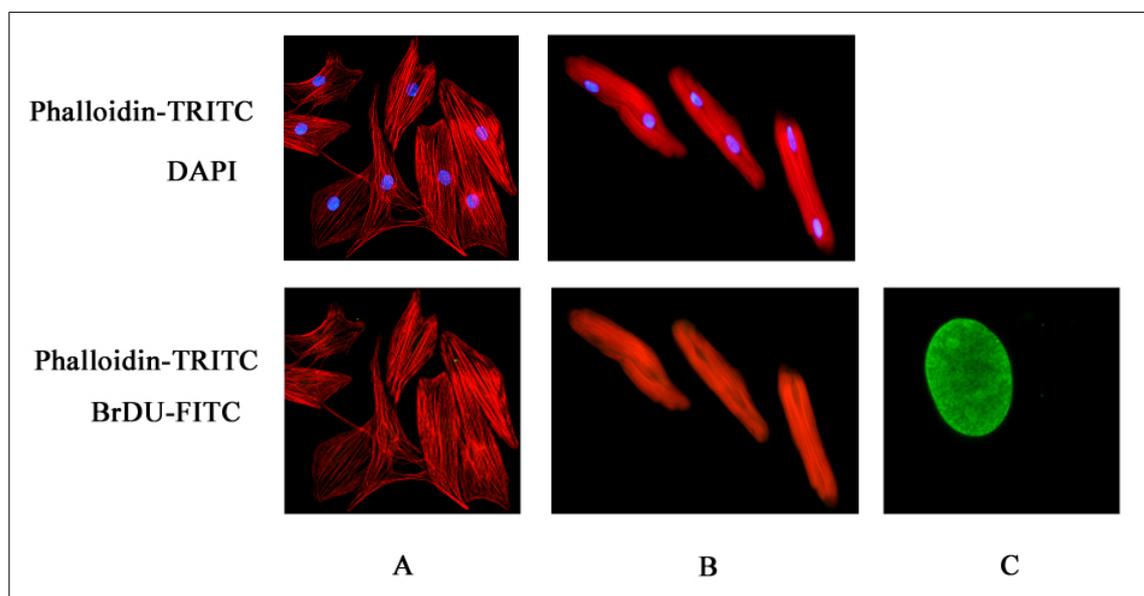


Abbildung 4.5: **A:** Neonatale Kardiomyozyten ohne Serumstimulation. Zum Nachweis der Herzmuskelzellen wurde ein TRITC markierter Aktin-spezifischer Phalloidinantikörper verwendet. Die DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Kein Nachweis des FITC markierten S-Phase-Markers BrdU. **B:** Binukleäre, adulte Kardiomyozyten mit 20 % FCS Serumstimulation. Kein S-Phase-Nachweis. **C:** Positivkontrolle kardialer Fibroblasten. Immunzytochemischer Nachweis FITC markierter BrdU-Antikörper im Zellkern eines Fibroblasten und damit Nachweis von S-Phase in der Positivkontrolle.

4.5 Transfektion von Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren für E2F2, CDK4 und Zyklin D1

Um den Effekt einer Überexpression der Zellzyklusfaktoren E2F2, CDK4 und Zyklin D1 auf den Zellzyklus in neonatalen und adulten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden rekombinante, humane Adenoviren des Serotyps V eingesetzt. Zur Überexpression gelangte die humane cDNA für die Zellzyklusfaktoren E2F2, CDK4 und Zyklin D1. Als Kontrolle für mögliche Effekte durch Zellkulturinfektionen oder andere Genüberexpression diente das adenovirale Konstrukt ad-Luc, welches Luciferase-cDNA überexprimiert. Alle adenoviralen Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. L. Hauck zur Verfügung gestellt.

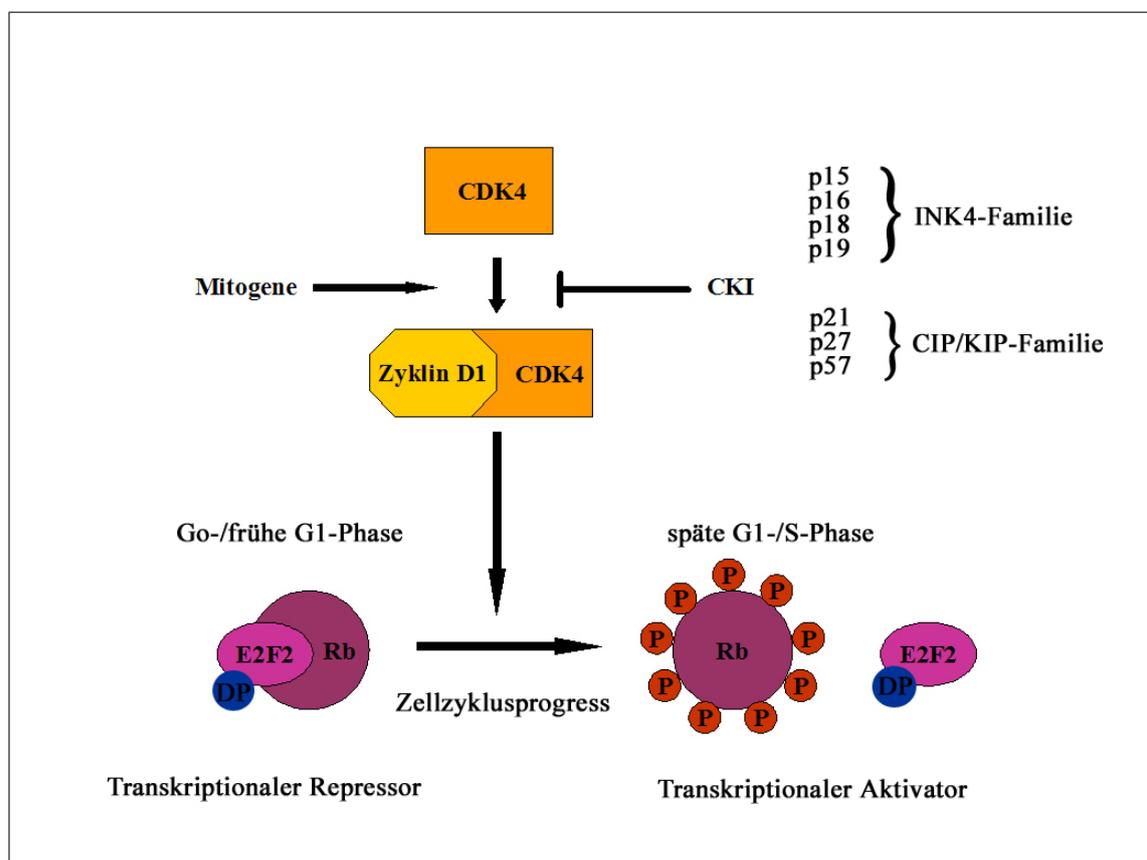


Abbildung 4.6: Zyklin D1 und CDK4 bilden zusammen einen aktivierten Komplex, der das Retinoblastoma-Pocketprotein phosphoryliert. Dieser Prozess kann durch inhibitorische Zellzyklusfaktoren wie z. B. p21 und p16 blockiert werden. Phosphoryliertes Retinoblastoma-Pocketprotein führt über Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F2 zum Zellzyklusprogress.

Die Fähigkeit der adenoviralen Konstrukte, das Proteinprodukt der jeweiligen cDNA in neonatalen Herzmuskelzellen überzuexprimieren, wurde auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Fünf Tage alte, neonatale Kardiomyozyten wurden mit jeweils 10 MOI ad-E2F2, ad-CDK4 und ad-Zyklin D1 transfiziert und für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Dort

erfolgte der Nachweis der bezeichneten Proteine mit spezifischen Antikörpern. Die Verifizierung gleicher aufgeladener Proteinmengen erfolgte über den Nachweis von Aktin. Die Transfektion fünf Tage alter, neonataler Herzmuskelzellen mit einem 10-fachen Überschuss infektiöser Viruspartikel im Verhältnis zur Anzahl der zu transfizierenden Zellen führte zu einer deutlichen Steigerung der jeweiligen Proteinexpression. Eine Kontrolltransfektion neonataler Kardiomyozyten mit 10 MOI ad-Luc erhöhte die Proteinexpression von E2F2, CDK4 oder Zyklin D1 nicht. Prozedural bedingte Effekte auf die Überexpression der untersuchten Zellzyklusfaktoren konnten somit ausgeschlossen werden. In den nicht transfizierten, unbehandelten neonatalen Herzmuskelzellen konnten nur geringste Proteinmengen der positiv regulierenden Zellzyklusfaktoren nachgewiesen werden.

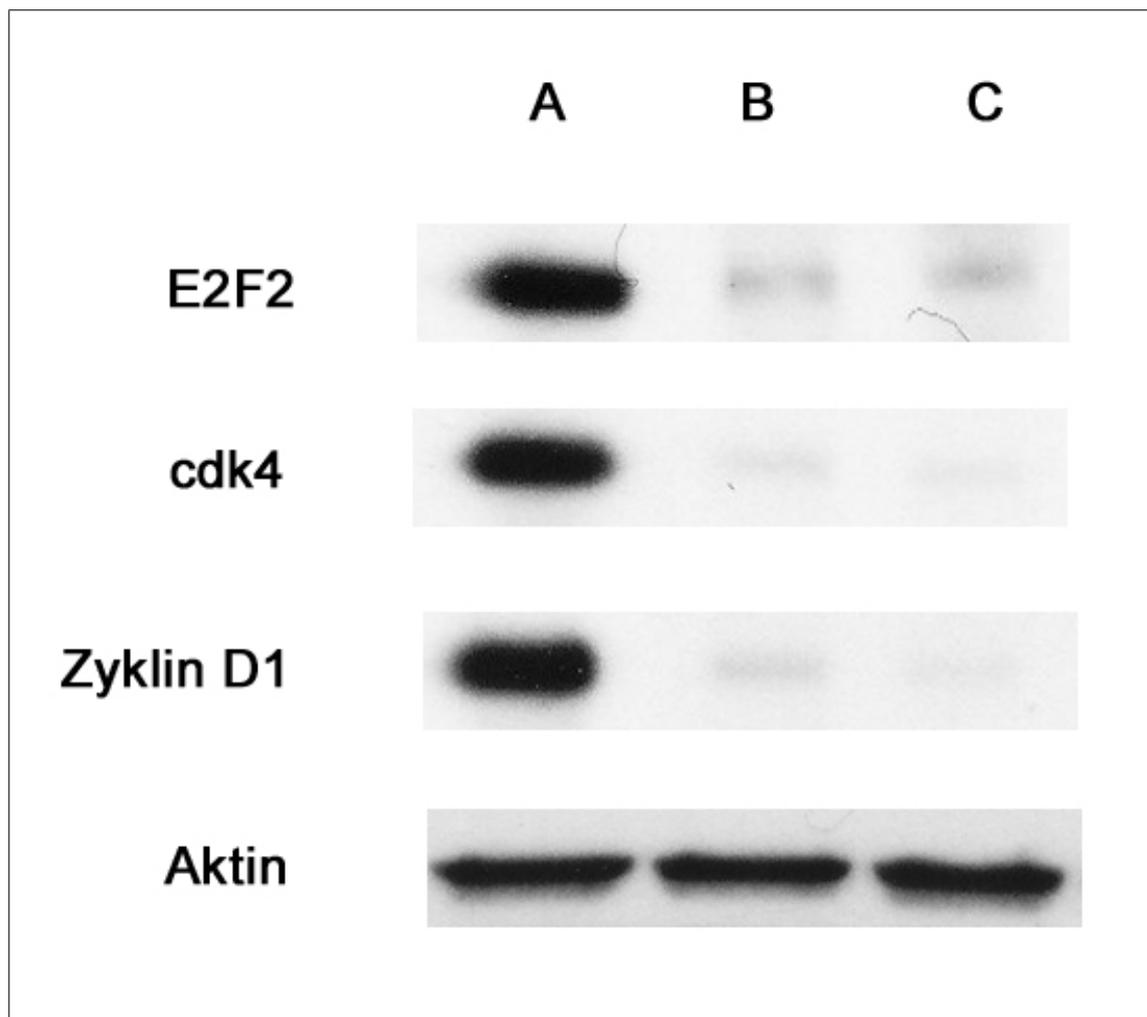


Abbildung 4.7: **A:** Transfektion fünf Tage alter, neonataler Kardiomyozyten mit jeweils 10 MOI ad-E2F2, ad-CDK4 und ad-Zyklin D1. **B:** Kontrolltransfektion der neonatalen Kardiomyozyten mit 10 MOI ad-Luc. **C:** Nicht transfizierte, unbehandelte neonatale Herzmuskelzellen.

4.6 Etablierung immunzytochemischer Marker der Mitose und Zytokinese bei Herzmuskelzellen

Die immunzytochemische Darstellung von Zellteilungsvorgängen bedarf der Kombination geeigneter immunzytochemischer Marker. Im Gegensatz zu proliferierenden Zellen, ist der Vorgang der Mitose bei Herzmuskelzellen nicht mit Zytokinese gleichzusetzen. Herzmuskelzellen sind potenziell polyploide Zellen (Kellerman et al. [1992]), weil ihre Mitose nicht regelhaft durch Zytokinese, sondern auch durch eine Zellkernverdopplung abgeschlossen werden kann. Die Karyogenese ist eine Sonderform der Mitose, die auch als Endomitose bezeichnet wird. Durch eine Verdopplung der Chromatiden ohne nachfolgende Zellteilung entstehen polyploide Zellen. Sie enthalten ein Vielfaches des bei mononukleären Zellen diploiden Chromosomensatzes. Die vervielfachte Erbgutmenge vergrößert die Leistungsfähigkeit der Zelle für die RNA- und Proteinsynthese, zum Beispiel im Rahmen der myokardialen Hypertrophie.

Erst die zusätzliche Darstellung des Spindelfaserapparates durch Antikörper gegen alpha-Tubulin (Brinkley [1997]) ermöglicht die Unterscheidung zwischen mitotischen und zytokinetischen Kardiomyozyten. Alpha-Tubulin ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts. Während der Mitose kommt es zur Ausbildung des immunzytologisch nachweisbaren und morphologisch charakteristischen Spindelfaserapparates. Die mechanische Durchtrennung der aus alpha-Tubulin bestehenden Spindelfasern des Spindelfaserapparates durch die Teilungsfurche in der späten Telophase ist der alleinige immunzytologische Beweis für eine erfolgte Zytokinese. Dabei bildet sich zwischen den neu entstandenen Tochterzellen eine charakteristische Lücke, der sogenannte *mid-body* (Julian et al. [1993]).

Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (Serin-10) wurden eingesetzt, um mitotische Zellen zu identifizieren. Die Phosphorylierung von Histon H3 (PiH3) an den Aminosäuren Serin-10, Serin-28 und Threonin-11 korreliert eng mit der Chromosomenkondensation während der Mitose und Meiose (Preuss et al. [2003]). PiH3 ist von der frühen Prophase bis zur späten Telophase immunzytologisch detektierbar. Der Antikörper ist somit geeignet, mitotische Herzmuskelzellen zu identifizieren und die Kondensation der Chromosomen sowie ihre intrazelluläre Lokalisation in den jeweiligen Mitosephasen sichtbar zu machen.

Weitere geeignete immunzytochemische Marker des Zellzyklus sind BrdU für die S-Phase und cdc6. Cdc6 wird in allen Zellen außerhalb der Go-Phase nukleär exprimiert und dient dem Nachweis im Zellzyklus befindlicher Zellen.

Die Abbildung 5.8 zeigt den immunzytochemischen Nachweis geeigneter Mitosemarker wie phosphoryliertes Histon H3, cdc6, BrdU und alpha-Tubulin am Beispiel der proliferierenden IMR90-Zelllinie.

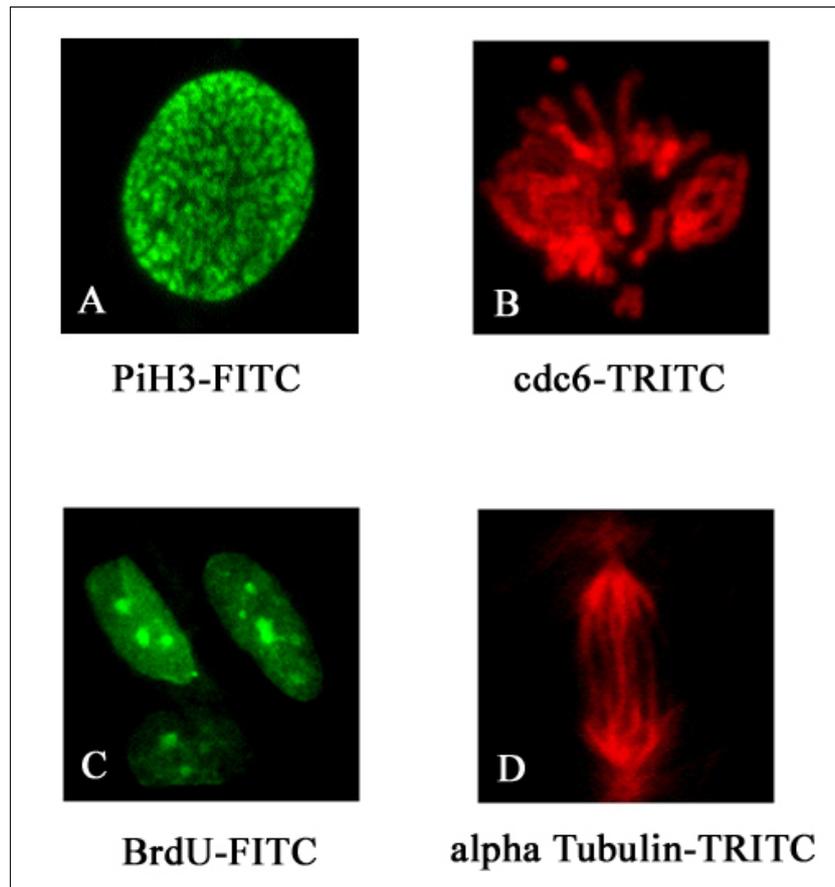


Abbildung 4.8: **A:** FITC markierte Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3. **B:** TRITC markierte Antikörper gegen chromosomal gebundenes cdc6. **C:** FITC markierte Antikörper gegen BrdU. **D:** TRITC markierte Antikörper gegen alpha-Tubulin.

Die immunzytochemische Eignung der Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 und alpha-Tubulin zum Nachweis der Mitosephasen wurde anhand der proliferierenden Zelllinie IMR90 geprüft. Die in der Prophase kondensiert vorliegenden Chromosomen wurden durch FITC markierte Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 immunzytologisch dargestellt. TRITC markiertes alpha-Tubulin diente zur Darstellung des Zytoskeletts und des Spindelapparates, der in der Prophase jedoch noch nicht vollständig ausgebildet ist. Die Anordnung der kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene findet in der Metaphase statt. In dieser Phase gelingt auch die immunzytochemische Darstellung des Spindelfaserapparates mittels TRITC markierter Antikörpern gegen alpha-Tubulin. Die Kernspindelfasern setzen am chromosomalen Zentromer an und führen in der Anaphase zu einer Auftrennung der Tochterchromatiden und ihrer Dislokation zu den jeweils entgegengesetzten Zellpolen. In proliferierenden Zellsystemen, wie der hier verwendeten Zelllinie IMR90, bildet sich in der Telophase die Teilungsfurche aus, die die Zelle im Bereich der Äquatorialebene einschnürt. Erst die Fusionierung der Zellmembran nach mechanischer Durchtrennung der Spindelfasern durch die Teilungsfurche führt zur Entstehung zweier genetisch identischer Tochterzellen. Ein zytokinetischer Abschluss der Mitose ist deshalb erst durch den immunzytochemischen Nachweis des *midbody* bewiesen.

In der Abbildung 5.9 ist der immunzytochemische Ablauf der Mitose und Zytokinese am Beispiel proliferierender IMR90-Zellen dargestellt.

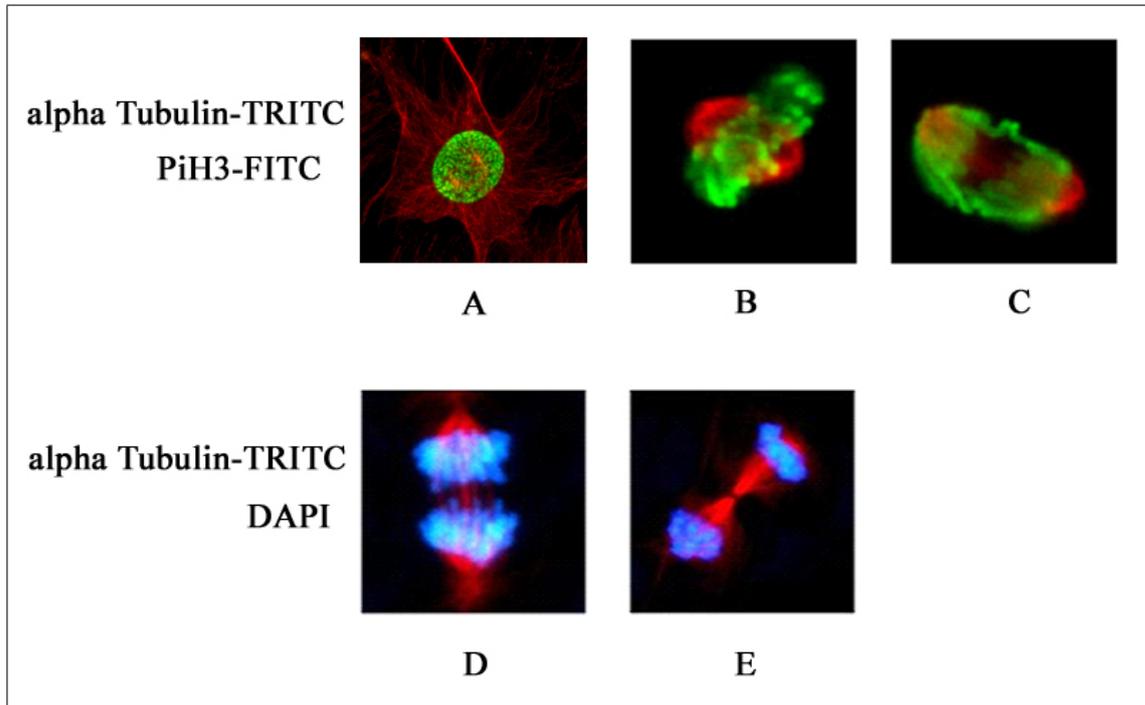


Abbildung 4.9: **A-C:** FITC markierte Antikörper gegen PiH3 und TRITC markierte Antikörper gegen alpha-Tubulin. **D-E:** Färbung der Chromosomen mit DAPI und TRITC markierte Antikörper gegen alpha-Tubulin.

A: Prophase, **B:** Metaphase, **C:** Anaphase, **D:** Telophase, **E:** Zytokinese

4.7 Adenovirale Transfektion neonataler Kardiomyozyten mit E2F2, CDK4 oder Zyklin D1 führt zur Induktion von Mitose und Zytokinese

Zum Nachweis des Zellzykluswiedereintritts wurden fünf Tage alte, neonatale Kardiomyozyten der Ratte mit den adenoviralen Konstrukten E2F2, CDK4 und Zyklin D1 transfiziert und anschließend für 72 Stunden in Medium mit 10 % Pferdeserum kultiviert. Herzmuskelzellen mit Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 wurden als mitotisch gewertet. Die immunzytochemische Darstellung des charakteristischen *midbody* diente als Beweis einer erfolgten Zytokinese.

Die Pfeile in Abbildung 5.10 weisen auf die charakteristische Lücke im Spindelapparat, die durch mechanische Durchtrennung der Spindelfasern durch die Teilungsfurche erzeugt wurde. In der Abbildung sind zwei mit E2F2 adenoviral transfizierte, neonatale Kardiomyozyten nach erfolgter Zytokinese dargestellt. Jeder der Tochterzellen verfügt über einen Zellkern mit genetisch identischem Material. Während die Chromosomen während der Mitose in kondensierter Form vorliegen, kommt es nach der Zytokinese zu einer Dekondensation der DNA, die mit einem Übertritt der Zelle in die Interphase verbunden ist.

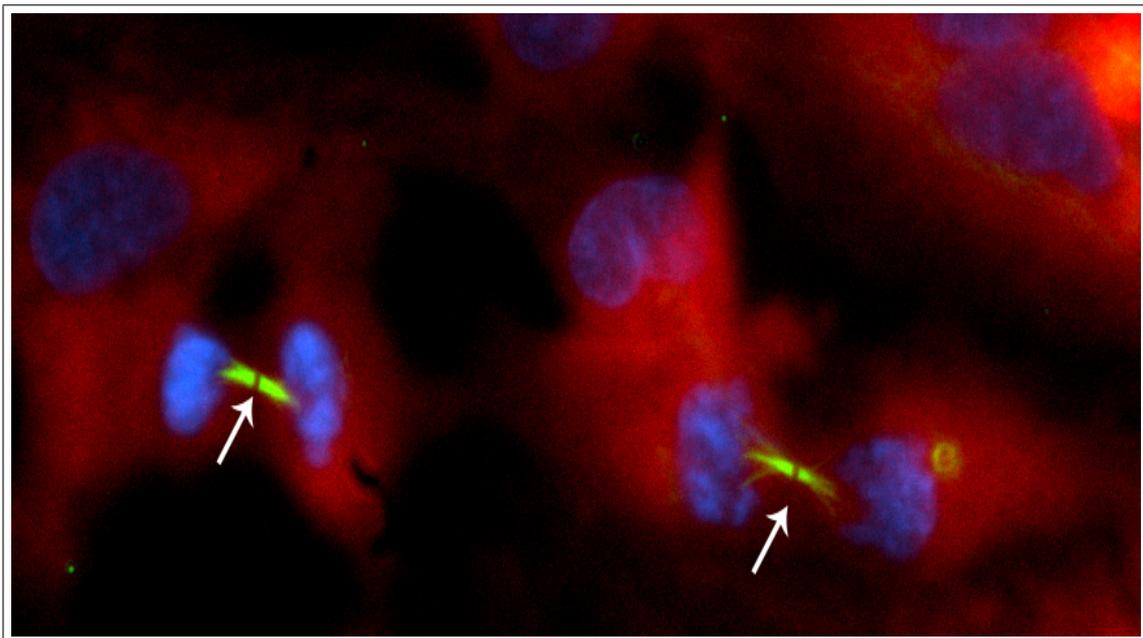


Abbildung 4.10: Fünf Tage alte, neonatale Kardiomyozyten der Ratte wurden mit 10 MOI E2F2 adenoviral transfiziert und anschließend für 72 Stunden in Medium mit 10 % Pferdeserum kultiviert. 72 Stunden nach Transfektion wurden indirekte immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. MF20-TRITC wurde als kardiomyozytenspezifischer Marker eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Spindelapparat mit dem *midbody* wurde mittels alpha-Tubulin-FITC dargestellt.

Die quantitative Auswertung der durch adenovirale Transfektion der Zellzyklusfaktoren E2F2, CDK4 und Zyklin D1 induzierten Mitosen und Zytokinesen ist in den Abbildungen 5.11 und 5.12 dargestellt.

Während in der Kontrolle weder mitotische noch zytokinetische Kardiomyozyten identifiziert werden konnten, gelang in 9 % aller mit E2F2 adenoviral transfizierten, neonatalen Kardiomyozyten der immunzytochemische Nachweis von Mitose. Mitose konnte ebenfalls in adenoviral mit Zyklin D1 (10 %) und CDK4 (8 %) transfizierten, neonatalen Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. Kein immunzytochemischer Nachweis von Mitose gelang hingegen bei unbehandelten, nicht transfizierten sowie bei β -Gal adenoviral kontrolltransfizierten, neonatalen Herzmuskelzellen.

Von allen PiH3 positiven, neonatalen Kardiomyozyten befanden sich 75.5 % in der Prophase, 15.5 % in der Metaphase und 7.7 % in der Ana- oder Telophase. Der Nachweis von Zytokinese bei adenoviral transfizierten, neonatalen Kardiomyozyten gelang in 1.3 % aller in Mitose befindlichen Kardiomyozyten.

Im Gegensatz zu adenoviral transfizierten, adulten Herzmuskelzellen war die Transfektion neonataler Herzmuskelzellen mit nur einem Zellzyklusfaktor ausreichend, um Mitose und Zytokinese zu induzieren. Eine adenovirale Ko-Transfektion der Zellzyklusfaktoren E2F2, CDK4 und Zyklin D1 führte im Vergleich zur Transfektion mit Einzelfaktoren zu keiner Erhöhung der Mitose- und Zytokineserate.

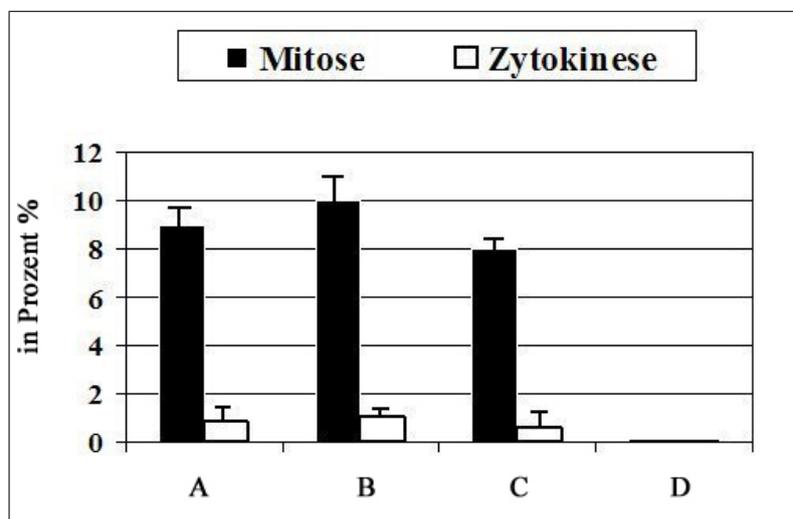


Abbildung 4.11: Fünf Tage alte, neonatale Kardiomyozyten der Ratte wurden mit je 10 MOI E2F2 (A), Zyklin D1 (B), CDK4 (C) oder β -Gal (Kontrolle) (D) in Gegenwart von 10 % Pferdeserum adenoviral transfiziert.

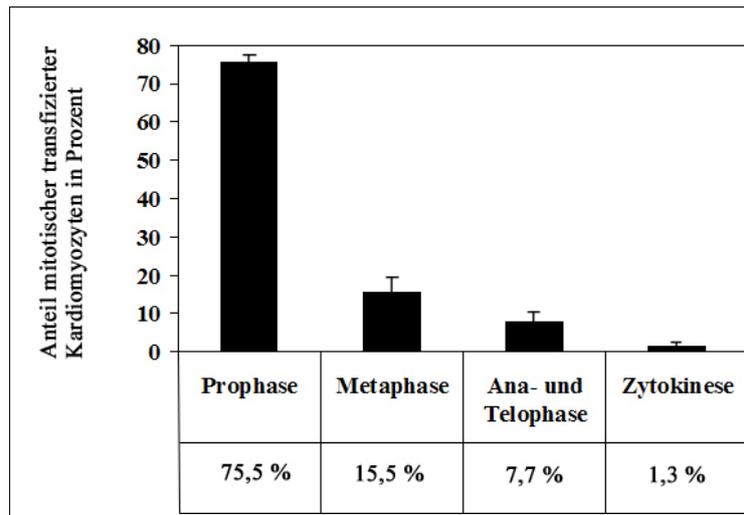


Abbildung 4.12: Von allen adenoviral transfizierten, mitotischen, neonatalen Kardiomyozyten befanden sich drei Viertel in der Prophase. Spätere Mitosephasen wie Meta-, Ana- und Telophase wurden seltener beobachtet. Zytokinese konnte in 1.3 % aller mitotischen, neonatalen Herzmuskelzellen nachgewiesen werden.

4.8 Adenovirale Ko-Transfektion adulter Kardiomyozyten mit E2F2, CDK4 und Zyklin D1 induziert Mitose

Bei postmitotischen, adulten Kardiomyozyten besteht ein Ungleichgewicht zwischen inhibitorischen und aktivierenden Zellzyklusfaktoren zugunsten der Inhibitoren. Durch externe Substitution aktivierender Zellzyklusfaktoren kann dieses Ungleichgewicht geändert und ein Wiedereintritt terminal differenzierter Herzmuskelzellen in den Zellzyklus erzwungen werden (von Harsdorf et al. [1999]).

Durch adenovirale Dreifachtransfektion adulter Kardiomyozyten *in vitro* mit je 5 MOI E2F2, CDK4 und Zyklin D1 konnte in 3 % aller transfizierten Herzmuskelzellen Mitose induziert werden. In nicht transfizierten und in mit dem Kontrollvirus β -Gal transfizierten Herzmuskelzellen konnten immunzytochemisch keine Mitosen nachgewiesen werden. Die Induktion von Mitose gelang nur mittels Dreifachtransfektion adulter Kardiomyozyten mit ad E2F2, ad CDK4 und ad Zyklin D1. Die adenovirale Transfektion mit dem Kontrollvirus β -Gal sowie mit einem oder zwei Zellzyklusfaktoren führte nicht zu Mitoseinduktion. Zytokinesen ließen sich weder in der Kontrolle noch in dreifach-, zweifach- oder einfach-adenoviral transfizierten, adulten Herzmuskelzellen nachweisen. Unter den adenoviral dreifachtransfizierten, adulten Herzmuskelzellen waren 3 % PiH3 positiv, also mitotisch. Von den adenoviral transfizierten, PiH3 positiven, adulten Kardiomyozyten befanden sich 92.5 % in der Prophase, 4.7 % in Metaphase und 2.8 % in Ana- oder Telophase.

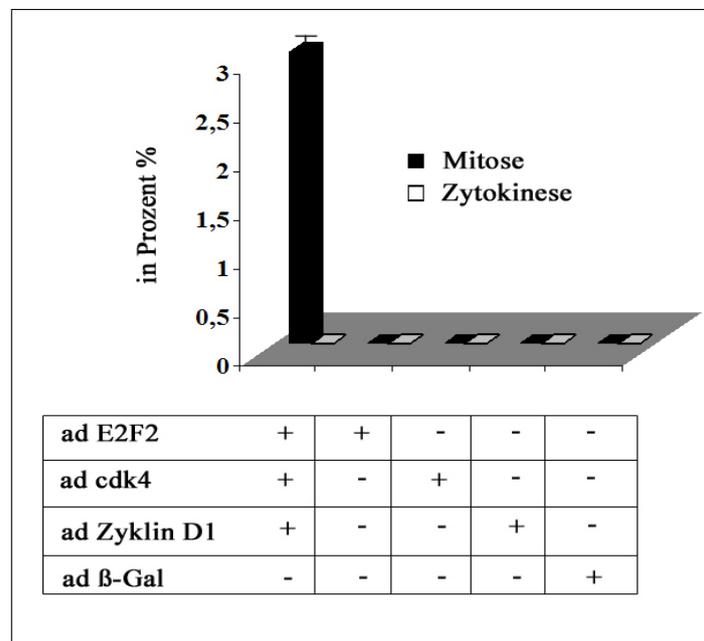


Abbildung 4.13: 12 Wochen alte, adulte Kardiomyozyten der Ratte wurden alleine und kombiniert mit E2F2, Zyklin D1 und CDK4 in Gegenwart von 10 % Pferdeserum adenoviral transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden indirekte immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Herzmuskelzellen mit Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 wurden als mitotisch gewertet. Die immunzytochemische Darstellung des *midbody* diente als Beweis für eine erfolgte Zytokinese.

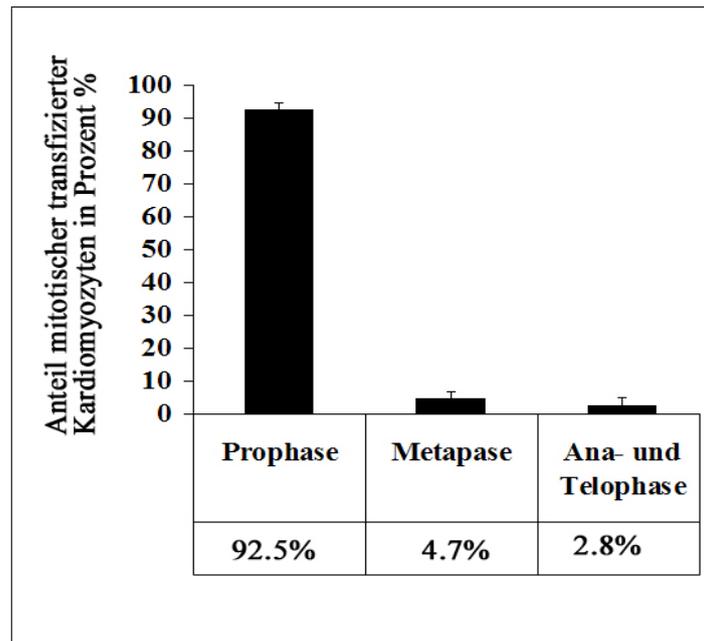


Abbildung 4.14: Die überwiegende Mehrheit aller adenoviral transfizierten, mitotischen, adulten Kardiomyozyten befand sich in der Prophase. Spätere Mitosephasen wie Meta-, Ana- und Telophase wurden sehr viel seltener beobachtet. Zytokinesen konnten immunzytochemisch nicht nachgewiesen werden.

Die Abbildung 5.15 zeigt mit E2F2, CDK4 sowie Zyklin D1 adenoviral ko-transfizierte, adulte Kardiomyozyten in unterschiedlichen Mitosephasen.

Im Bild A kommt ein binukleärer, adulter Kardiomyozyt in der Prophase zur Darstellung. In beiden Zellkernen sind deutlich, die kondensierten Chromosomen anhand des immunzytochemischen PiH3-Signals zu identifizieren. In der Metaphase kommt es zur Anordnung der kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene. Bei binukleären Kardiomyozyten wird die Äquatorialebene von der intrazellulären Position der Zentriolen eines jeden Nuklei bestimmt. Die Darstellung des Spindelapparates erfolgt durch Antikörper gegen alpha-Tubulin. Unter Serumstimulation kommt es zu einer Dedifferenzierung der adenoviral transfizierten Kardiomyozyten. Deutlich ist in der lichtmikroskopischen Darstellung (Bild D) die Auflösung des kontraktilem Apparates und der Verlust der für adulte Kardiomyozyten typischen stäbchenförmigen Zellmorphie erkennbar. Eine späte Mitosephase ist im Bild F wiedergegeben. Zur Darstellung kommt ein adenoviral transfizierter, stäbchenförmiger, adulter Kardiomyozyt mit erhaltenem kontraktilem Apparat. Ein Teil der kondensierten Chromosomen erscheint dislokalisiert und hat den Kontakt mit den Spindelfasern des Spindelapparates verloren. Eine geordnete äquivalente Aufteilung der Chromosomen zu den entgegengesetzten Zellpolen sowie ein zytokinetischer Abschluss der Mitose ist unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Interessanterweise befanden sich bei polyploiden Herzmuskelzellen alle Nuklei gleichzeitig innerhalb der gleichen Mitosephase. Auffallend ist ebenfalls eine Häufung mitotischer Kardiomyozyten in der Prophase, während spätere Mitosephasen wie Ana- und Telophase sehr viel seltener beobachtet werden konnten.

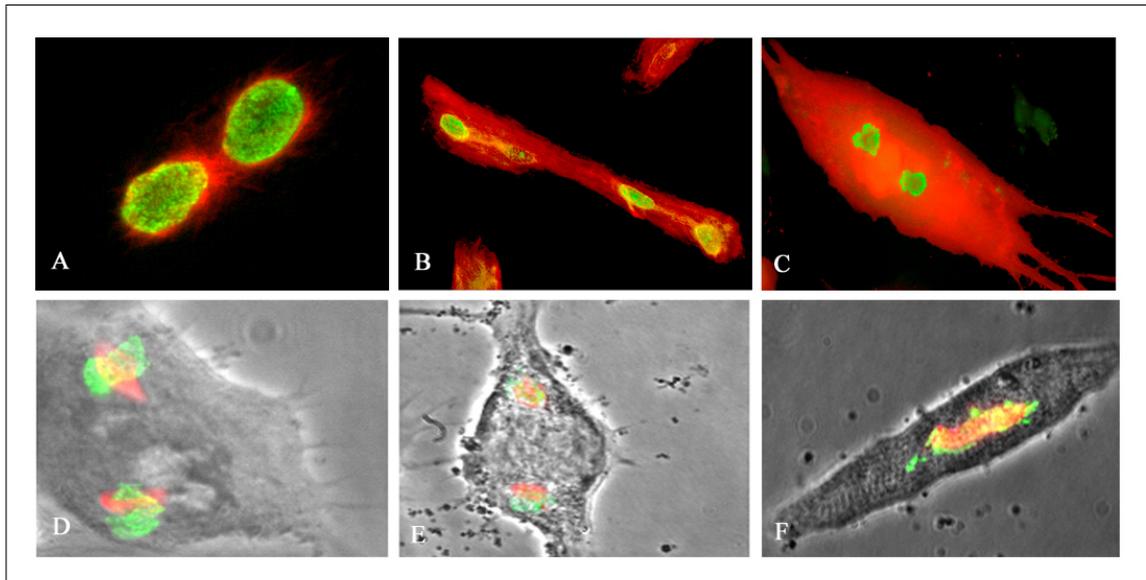


Abbildung 4.15: **A-F**: Immunzytochemische Darstellung mit E2F2, CDK4 und Zyklin D1 adenoviral dreifach transfizierter, adulter Kardiomyozyten. **A-C**: TRITC markierte Antikörper gegen kardiomyozytenspezifisches MF20 und FITC markierte Antikörper gegen PiH3. **D-F**: Kombinierte lichtmikroskopische und immunzytochemische Aufnahmen. TRITC markierte Antikörper gegen das Spindelfaserprotein alpha-Tubulin und FITC markierte Antikörper gegen PiH3. **A**: Binukleärer, adulter Kardiomyozyt in Prophase. **B**: Tetranukleärer, adulter Kardiomyozyt in Prophase. **C-E**: Metaphasen binukleärer, adulter Kardiomyozyten. **F**: Ana-/Telophase eines mononukleären, stäbchenförmigen, adulter Kardiomyozyten.

Kapitel 5

Diskussion und Ausblick

5.1 Entwicklungspotenzial von Herzmuskelzellen

Kardiomyozyten verfügen über eine große Bandbreite von Entwicklungsmöglichkeiten, die einer entwicklungsgeschichtlichen und physiologischen Ordnung folgen. Dieses Entwicklungspotential verleiht dem Organ Herz eine bemerkenswert große Plastizität und befähigt es, auf geänderte Arbeitsanforderungen zu reagieren (Hill and Olson [2008]).

Proliferation und Differenzierung sind zwei verschiedene Aspekte des Zellwachstums. Im Gegensatz zum Skelettmuskel, wo Differenzierung und Proliferation sich gegenseitig ausschließende Prozesse darstellen, sind embryonale Herzmuskelzellen trotz Differenzierung zur Zellteilung befähigt (Hirschy et al. [2006]). Trotz der Zellteilung differenzierter embryonaler Herzmuskelzellen ist das Herz in der Lage, seiner physiologisch notwendigen Pumpfunktion effektiv nachzukommen. Zytokinese und myofibrilläre Kontraktion sind jedoch hochdynamische Prozesse, die nicht zur gleichen Zeit innerhalb einer einzelnen Herzmuskelzelle vollzogen werden können. Zudem sind Herzmuskelzellen durch eine besonders gut organisierte Zytoarchitektur charakterisiert. Die meisten Zellarten demontieren und reorganisieren ihr Zytoskelett vor dem Mitoseeintritt. Dabei sind Mikrotubuli am Aufbau des entstehenden Spindelapparats, Aktin und Myosin an der Synthese des kontraktilen Rings beteiligt (Nigg [2001]). Den Vorgang der Zellteilung bei embryonalen Kardiomyozyten untersuchten Ahuja et al. [2004]. Sie zeigten, dass vor der Zellteilung eine Demontage der Myofibrillen stattfindet, die sich nach der Zytokinese wieder zu funktionsfähigen Einheiten reorganisieren. Interessanterweise blieb der Zell-Zell-Kontakt auch während der Zytokinese intakt, sodass eine physiologische Anordnung der Herzmuskelzelle im kontraktilen Gewebeverband gewährleistet ist.

Postnatal verlieren Kardiomyozyten rasch die Fähigkeit zur Zellteilung und beantworten fortan Wachstumsreize mit hypertrophem Zellwachstum. Die weitere Zunahme der Herzmasse nach der Geburt ist durch eine bis zu 40-fache Zunahme des Zellvolumens präexistenzieller Kardiomyozyten verursacht (Oparil et al. [1984]). Die Umstellung von Zellproliferation zu hypertrophem Wachstum erfolgt postnatal Spezies spezifisch, bei der Ratte um den 4. postnatalen Tag. In den

ersten drei postnatalen Tagen konnten Li et al. [1996] eine Zunahme der Herzmuskelzellzahl *in vitro* um 60 % beobachten. Ab dem 4. postnatalen Tag blieb die Zellzahl mit Beendigung des proliferativen Wachstums konstant. Die Binukleation der Kardiomyozyten setzt mit hypertrophem Wachstum ein und bildet einen frühen morphologischen Marker der myokardialen Hypertrophie. Die Beendigung des proliferativen und der Beginn des hypertrophen Wachstums sind sowohl zeitlich als auch strukturell eng miteinander verbunden. Postnatale Kardiomyozyten weisen die Besonderheit auf, die Fähigkeit zur Zytokinese zu verlieren, bevor sie sich endgültig vom Zellzyklus zurückziehen. Der temporäre Verbleib postnataler Kardiomyozyten im Zellzyklus und ihr Eintritt in die Mitose ohne abschließende Zytokinese führt zur Zellkernteilung mit dem charakteristischem morphologischem Merkmal binukleärer Herzmuskelzellen. Nach den ersten drei postnatalen Wochen weisen immerhin 85-90 % aller Kardiomyozyten der Ratte eine Binukleation auf (Li et al. [1997]).

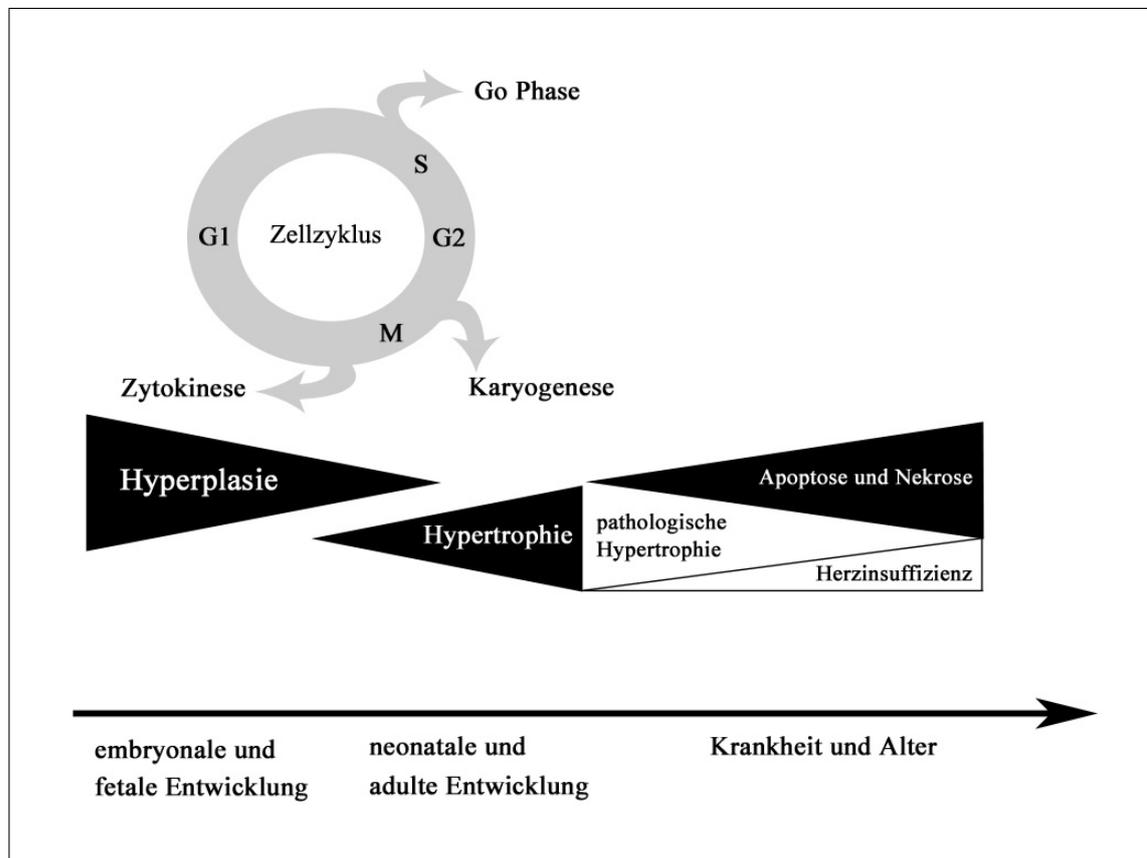


Abbildung 5.1: Die Entwicklung von Herzmuskelzellen folgt einer zeitlichen und physiologischen Ordnung. Die molekularbiologischen und dadurch bedingten histologischen Veränderungen sind mit Ausnahme der Nekrose umkehrbar.

Postnatal kommt es zu einer physiologischen myokardialen Arbeitshypertrophie infolge veränderter Druckverhältnisse im Lungen- und Körperkreislauf (Sansoucie and Cavaliere [1997]). Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist die zelluläre Antwort auf eine Zunahme der myokardialen Arbeitsbelastung. Sie wird durch endo-, para- und autokrine Faktoren wie Angiotensin II, Katecholamine, Schilddrüsenhormone oder IGF vermittelt, die membrangebundene Rezeptoren aktivieren

(Hunter and Chien [1999]).

Das Herz besitzt während der gesamten Lebensspanne die Fähigkeit zur physiologischen Hypertrophie. Die erhöhte Leistungsfähigkeit des Sportlerherzens erklärt sich u. a. durch ein hypertrophes Wachstum der linksventrikulären Herzmuskelwand (Atchley and Douglas [2007]). Im Gegensatz zur physiologischen Arbeitshypertrophie kommt es bei der kompensatorischen Hypertrophie zum Versuch des Myokards, ein Organversagen auszugleichen. Der Übergang von gelungener kompensatorischer Hypertrophie in eine maladaptive Hypertrophie ist dabei fließend und von einer Überlastung der kompensatorischen Kapazität des Myokards gekennzeichnet (Selvetella et al. [2004]). Myokardiale Hypertrophie ist stimulusabhängig und deshalb unter geeigneter Pharmakotherapie prinzipiell rückbildungsfähig.

Ein Untergang adulter Herzmuskelzellen wird beim Altern und bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz beobachtet. Dabei werden Nekrose und Apoptose voneinander unterschieden. Beide Prozesse können gleichzeitig im Myokard erfolgen. Während beim nekrotischen Zelltod mit der Schädigung des Sarkolemmes der *point of no return* erreicht wird, kann in die apoptotische Signalkaskade bis zur Aktivierung von Effektor-kaspasen auf vielfältige Art eingegriffen und somit der apoptotische Zelltod verhindert werden. Apoptotische Veränderungen im Zytosol von Herzmuskelzellen sind reversibel, solange der Zellkern funktionell intakt ist. Als Auslöser apoptotischer Signalkaskaden konnten mechanische Dehnung, Stickstoffmonoxid, Ischämie und Reperfusion sowie reaktive Sauerstoffspezies identifiziert werden (Kunapuli et al. [2006]).

Ein durch maladaptive Hypertrophie, Nekrose und Apoptose geschädigtes Herz ist unfähig, den Endorganen ausreichend Blut und Sauerstoff zuzuführen. Es besteht ein Missverhältnis zwischen der Förderleistung des Herzens und dem Bedarf des Organismus mit dem klinischen Bild der Herzinsuffizienz. Die Herzinsuffizienz ist somit die gemeinsame klinische Endstrecke ganz unterschiedlicher primärer kardiovaskulärer Grunderkrankungen.

5.2 Myokardiale Hypertrophie und Re-Expression von Zellzyklusfaktoren

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Faktoren des präreplikativen Komplex in neonatalen und adulten Herzmuskelzellen der Ratte *in vitro* untersucht. Proteine der MCM-Familie fungieren als essenzielle Komponenten des pre RC, die im Zellkern während der G1-Phase akkumulieren und zur Etablierung des G1/S-Phase-Überganges benötigt werden (Labib et al. [2000]). Herzmuskelzellen sind während der Embryonalzeit bis zum vierten postnatalen Tag teilungsfähig (Ahuja et al. [2004]). Entwicklungsgeschichtlich ist die Expression von Faktoren des pre RC in dieser Phase also notwendig. Postnatal verlieren Kardiomyozyten die Fähigkeit zur Zytokinese. Adulte Herzmuskelzellen sind ohne geeignete externe Stimulation mit Zellzyklusfaktoren nicht zur Zellteilung befähigt. Deshalb konnten bei unstimulierten, adulten Kardiomyozyten keine Faktoren des pre RC nachgewiesen werden. Obwohl die Faktoren ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7 bei un-

stimulierten, neonatalen Kardiomyozyten auf Proteinebene nachgewiesen wurden, konnten weder S-Phase noch Zytokinese induziert werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Für eine erfolgreiche Initiierung der DNA Replikation ist die Expression aller Faktoren des pre RC notwendig, kein einziger Faktor ist redundant (Newlon [1997]). In den durchgeführten Experimenten stand nur eine Auswahl geeigneter spezifischer Antikörper gegen Faktoren des pre RC zur Verfügung. Allein der Initiator der multilokulären DNA-Replikation, der *origin recognition complex*, besteht aus insgesamt 6 Untereinheiten. Nur gegen die ORC4-Untereinheit lag für die hier durchgeführten Arbeiten ein geeigneter Antikörper vor. Es ist also denkbar, dass nicht alle Faktoren des präreplikativen Komplex in unstimulierten, neonatalen Herzmuskelzellen auf Proteinebene vorliegen. Ungeklärt ist auch die Frage, ob unterschiedliche Proteine des pre RC die gleiche Extraktibilität aufweisen oder sich aufgrund schlechter Lösbarkeit oder Instabilität einer Nachweisbarkeit im Western Blot entziehen.

Thome et al. [2000] untersuchten ORC Untereinheiten im menschlichen, nicht proliferierenden Gewebe mittels Northern- und Western Blot. So gelang der myokardiale Nachweis von ORC2-6 auf mRNA- und Proteinebene. ORC1 war im Herz mit keinem der genannten Verfahren nachweisbar. Andere nicht proliferierende Gewebe wie Pankreas und Milz zeigten zwar ORC-Untereinheiten auf mRNA-Ebene, jedoch nicht auf Proteinebene. Diese Diskrepanz kann durch posttranskriptionale Expressionskontrolle, aber auch durch unterschiedliche Proteinextraktibilität in verschiedenen Geweben erklärt werden. Interessanterweise wiesen einige ORC-Untereinheiten eine größere Bindungsaffinität zu unbekanntem zellulären Polypeptiden auf als zu komplementären ORC-Untereinheiten. Die Autoren postulieren, dass die unbekanntem Polypeptide ebenfalls zur DNA Replikation beitragen könnten. Diese Annahme setzt einen viel größeren Proteinkomplex in somatischen, humanen Zellen voraus als bisher von den insgesamt 6 ORC-Untereinheiten in *Drosophila* und *Xenopus* bekannt. Alternativ könnten diese Proteine ORC-Untereinheiten mit anderer Funktion als der der DNA-Replikation rekrutieren. So ist bei *Drosophila* die Untereinheit ORC3 (Latho) entscheidend bei Lernprozessen sowie an der Regulation funktionaler synaptischer Plastizität beteiligt (Rohrbough et al. [1999]).

Seit Längerem sind molekulare Verbindungen zwischen myokardialer Hypertrophie und der Aktivierung von Zellzyklusfaktoren bekannt. Vara et al. [2003] zeigten im hypertrophiertem Myokard eine E2F vermittelte Teilaktivierung der Zellzyklusmaschinerie mit G1/S-Phasenübergang. Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Rolle von Zyklin D im Rahmen der linksventrikulären Hypertrophie und postulierten eine CDK4 und CDK6 vermittelte partielle Zellzyklusaktivierung (Busk [2003], Tamamori-Adachi et al. [2002]). Neben der Expression Zellzyklus-aktivierender Proteine wurde im Rahmen der myokardialen Hypertrophie eine Herunterregulation inhibitorischer Faktoren wie p21 und p27 beschrieben (Brooks et al. [1998], Engel et al. [2003]).

Die Re-Expression von Zytokinese assoziierten Proteinen während der kardialen Hypertrophie wurden durch Ahuja et al. [2007] untersucht. Kongruent zur erhaltenen Teilungsfähigkeit embryonaler Herzmuskelzellen ließen sich im hypertrophierten Herzmuskelgewebe Regulatoren von Proteinen des Aktomyosin-Rings wie RhoA, cdc42 und RacI sowie ihre Effektoren ROCK I, II und

p-cofilin nachweisen. Die Expression dieser Proteine wird innerhalb der ersten postnatalen Woche herabreguliert und spielt beim adulten, nicht hypertrophierten Kardiomyozyten keine Rolle mehr. Der Autor konnte in zwei voneinander unabhängigen Tiermodellen für myokardiale Hypertrophie als auch bei *in vitro* induzierter Hypertrophie von Herzmuskelzellen der Ratte eine erneute Expression dieser mit Zytokinese assoziierten Proteine nachweisen. Zytokinese regulierende Proteine werden also nicht nur während der embryonalen Entwicklungsphase in Herzmuskelzellen sondern auch im Rahmen myokardialer Hypertrophie exprimiert. Die Hochregulation zytokinetischer und karyogenetischer Marker ist jedoch bei Kardiomyozyten nicht ausreichend für das vollständige Durchlaufen der Mitosephase.

Adulte Kardiomyozyten reagieren auf den Wachstumsreiz Serumstimulation mit einer Teilaktivierung der Zellzyklusmaschinerie sowie Hypertrophie, aber nicht mit Zellteilung. Bei serumstimulierten, hypertrophierten, adulten Herzmuskelzellen ließ sich eine differentielle Expression der Präreplikationsfaktoren MCM5 und MCM6 auf Proteinebene nachweisen. Ob der hier erstmals beobachtete Zusammenhang zwischen Expression von Faktoren des pre RC und myokardialer Hypertrophie in kausaler Verbindung steht, bleibt vorerst unbeantwortet. Die differentielle Expression von präreplikativen Faktoren in terminal differenzierten Zellen deutet jedoch darauf hin, dass der pre RC neben der DNA-Replikation auch an anderen molekularen Steuerungsvorgängen beteiligt sein könnte.

5.3 Die Re-Programmierung des Zellzyklus von Kardiomyozyten ist möglich

Die Fähigkeit des Säugetierherzens, sich nach einer Schädigung selbst zu regenerieren ist begrenzt. Die Ursache liegt in der limitierten Teilungsfähigkeit adulter Herzmuskelzellen. Trotz des Nachweises kardial lokalisierter sowie peripher zirkulierender Stammzellen ist die myokardiale Regenerationsfähigkeit unzureichend. Tatsächlich konnten Beltrami et al. [2001] in weniger als 0.01 % der Kardiomyozyten nach Herzinfarkt eine intrinsische Zellteilung nachweisen. Verletztes Myokard wird durch Narbengewebe ersetzt, eine Funktionsverschlechterung des Organs ist die Folge (Buja [2005]).

Durchflusszytometrische Untersuchungen von Li et al. [1998] ergaben, dass 85 % aller Zellkerne adulter Kardiomyozyten der Ratte in Go/G1- und die restlichen Zellkerne in G2/M-Phasen des Zellzyklus arretiert sind. Galt früher ein Ausscheiden terminal differenzierter Herzmuskelzellen aus dem Zellzyklus in die Go-Phase als irreversibel, finden sich seit einigen Jahren zunehmend Hinweise für eine mögliche Reprogrammierung durch Modifizierung kardiomyozytärer Zellzyklusfaktoren (Bicknell et al. [2007]). Molekulare Ziele für Eingriffe am Zellzyklus von Herzmuskelzellen sind Zyklin-CDK-Komplexe, Regulatoren der Transkriptionsfaktoren (E2F-Familie, Retinoblastoma-Pocket-Proteine) und andere Schlüsselfaktoren der Signaltransduktion (p38). Zellzyklusstudien können *in vitro* an fetalen, neonatalen oder adulten Kardiomyozyten durch adeno-

viralen Gentransfer oder *in vivo* am transgenen Mausmodell mittels kardiomyozytenspezifischer Überexpression bzw. Knock-out relevanter Zellzyklusproteine erfolgen. Armstrong et al. [2000] postulierten, dass die Abwesenheit einer dreidimensionalen Matrix in primären Kardiomyozytenkulturen zu einer verringerten Ansprechbarkeit gegenüber exogenen Wachstumsfaktoren führt. Weitere Limitationen von *in vitro* Studien stellen Verunreinigungen der Primärkulturen mit schnell proliferierenden Nicht-Kardiomyozyten sowie methodische Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Primärkulturen selbst dar. Beim transgenen Tiermodell muss der kardiale Phänotyp sorgfältig einem primären oder sekundären Effekt der genetischen Manipulation zugeordnet werden. Dies fällt besonders bei Knock-out-Tieren nicht immer leicht, da alle Zellen, die ein bestimmtes Gen exprimieren betroffen sind (Pasumarthi and Field [2002]).

Da die Mehrheit der adulten Herzmuskelzellen im Go/G1-Phasenübergang des Zellzyklus arretiert ist (Li et al. [1998]), stellen G1-Phasenproteine wie der Zyklin D1-CDK4-Komplex ein attraktives Ziel für Manipulationen an der kardiomyozytären Zellzyklusmaschinerie dar. Wie auf Proteinebene in Abbildung 5.6 demonstriert, ist die endogene Expression der D-Typ-Zykline bei adulten Kardiomyozyten stark reduziert. Soonpaa et al. [1997] und Pasumarthi et al. [2005] etablierten ein transgenes Mausmodell, in dem Zyklin D1 unter dem kardiomyozytenspezifischen Promoter alpha-MHC überexprimiert wurde. Im Vergleich zum Wildtyp wurde eine Zunahme der Herzgröße, des Zellkernvolumens, der Zellkernanzahl und der DNA-Synthese nachgewiesen. Während die Überexpression von Zyklin D1 mit Anreicherung des Proteins im Nukleus keinen Effekt auf die Expression anderer endogener D-Typ-Zykline zeigte, war die Expression von CDK4 und PCNA erhöht. Nach Verletzung des Myokards durch Kauterisation zeigten transgene Tiere überraschenderweise eine Abnahme der DNA-Synthese im geschädigten Myokard, die mit einer reduzierten nukleären Lokalisation von Zyklin D1 einherging (Pasumarthi et al. [2005]). Die Expression des Transgens und seine subzelluläre Lokalisation sind entscheidend für die Transgenwirkung auf dem Zellzyklus. Überexpression von Zyklin D1 *in vivo* resultierte also in einer partiellen Re-Aktivierung des Zellzyklus mit DNA-Synthese und Karyogenese (Soonpaa et al. [1997]), Zytokinese hingegen wurde nicht nachgewiesen. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen sind die Ergebnisse von Li et al. [1998] und Tamamori et al. [1998], die eine verstärkte Expression von Zyklin-CDK4-Komplexen bei der myokardialen Hypertrophie nachweisen konnten. Die Auswirkungen einer Ko-Expression von nukleär lokalisierten Zyklin D1 und CDK4 wurden *in vitro* und *in vivo* durch die Arbeitsgruppe Tamamori-Adachi et al. [2003] untersucht. Bei neonatalen Herzmuskelzellen konnte unter Ko-Expression von Zyklin D1 und CDK4 eine transiente Re-Aktivierung des Zellzyklus mit maximal zwei zusätzlichen, kompletten Zellzyklusdurchläufen inklusive Zytokinese beobachtet werden. Die zeitliche Begrenzung des Zellzykluswiedereintritts begründen die Autoren mit einer Akkumulation des CDK-Inhibitors p27 und der damit verbundenen Supprimierung der CDK2-Aktivität (Tamamori-Adachi et al. [2004]). Die nukleäre Ko-Expression von Zyklin D1 und CDK4 *in vivo* ging ebenfalls mit einem Zellzykluswiedereintritt und dem Nachweis von DNA-Synthese einher. Allerdings konnte im Gegensatz zu neonatalen Kardiomyozyten keine Zellteilung dokumentiert werden (Tamamori-Adachi et al. [2003]). Die hohe endogene Expressi-

on von p27 in adulten Herzmuskelzellen kann die Unterschiede bei der Induktion von Zytokinese durch nukleäre Ko-Transfektion von Zyklin D1 und CDK4 zwischen neonatalen und adulten Herzmuskelzellen *in vitro* erklären.

Auch in der vorliegenden Arbeit finden sich in adenoviral E2F2 transfizierten neonatalen und adulten Herzmuskelzellen Mitosemarker (PiH3). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Arbeit von Ebel et al. [2005], die außer der E2F2 vermittelten S-Phase- und Mitoseinduktion, eine Zunahme von binukleären Herzmuskelzellen sowie eine verstärkte Expression von Zyklin B1 auf mRNA-Ebene beobachteten. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Ebel et al. [2005] gelang hier der immunzytochemische Nachweis von Zytokinese in neonatalen Kardiomyozyten, die im Vergleich zu adulten Herzmuskelzellen eine geringere Expression des CDK-Inhibitors p27 aufweisen (Tamamori-Adachi et al. [2004]). Eine weitere Erklärung für die ausbleibende Zytokinese mitotischer, transfizierter, adulter Herzmuskelzellen liefert die entwicklungsgeschichtlich differenzielle Expression wichtiger zytokinetischer Proteine (Ahuja et al. [2007]). Da die Aktivität von Regulatoren der Proteine des Aktomyosin-Rings wie RhoA, cdc42 und Rac1 sowie ihrer Effektoren ROCK I, II und p-cofilin in Kardiomyozyten kontinuierlich postnatal abnimmt, ist dem adulten im Gegensatz zum embryonalen Kardiomyozyt der zytokinetische Abschluss induzierter Mitosen verwehrt. Zwar kommt es im Rahmen der myokardialen Hypertrophie zur Re-Expression zytokinetisch relevanter Proteine, Zytokinesen hypertrophierter Herzmuskelzellen konnten allerdings nicht registriert werden. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Untersuchungsansatz handelt es sich um eine vergleichbare Situation: Durch die Kultivierung der adulten Herzmuskelzellen in 10 % FCS lag ein hypertropher Wachstumsreiz vor, der zur Expression zytokinetischer Proteine führt. Durch adenovirale Ko-Transfektion der adulten Kardiomyozyten mit E2F2, CDK4 und Zyklin D1 gelang die Rückführung der Zellen in den Zellzyklus und die Induktion von Mitose. Trotz der Expression mitotischer und zytokinetischer Marker blieben alle transfizierten adulten Herzmuskelzellen in der Mitosephase arretiert.

Wie von Li et al. [1997] und Ahuja et al. [2004] beschrieben, geht einer erfolgreichen Zellteilung bei Herzmuskelzellen der Abbau des myokontraktilen Apparates voraus. Die Dedifferenzierung wird *in vitro* von einem Verlust der für Herzmuskelzellen typischen stäbchenförmigen Morphe begleitet. Erst der Abbau des myokontraktilen Apparats schafft die notwendige Voraussetzung in der Zytoarchitektur der Zelle, sodass der Aktomyosin-Ring das Zytoplasma teilt und zwei Tochterzellen entstehen können. Erfolgt dieser Abbau nur unvollständig, resultiert keine Zell- sondern Kernteilung.

Colpain-1 reguliert die Digestion von Myofibrillen in einer entwicklungsgeschichtlich abhängigen Art und Weise (Ahuja et al. [2007]). Während Colpain-1 bei embryonalen Herzmuskelzellen den Abbau von Myofibrillen und ihre proteasomale Degradation vor Beginn der Zytokinese ermöglicht, wird dieses Schlüsselprotein postnatal vermindert exprimiert. Auch Cullin-3, eine Ubiquitin-E3-Ligase, die für die Substratspezifität des Ubiquitin-Proteasom-Degradation-Systems verantwortlich ist, liegt in aktivierter Form nur während der Embryonalzeit vor. In proliferierenden Zellsystemen reguliert Cullin-3 die Ubiquitination von Zyklin E, kontrolliert Zelltyp spezifisch die S-Phase

(Singer et al. [1999]), entfernt Aurora B von mitotischen Chromosomen und koordiniert so den mitotischen Progress sowie die Zytokinese (Sumara et al. [2007]). Beim adulten Kardiomyozyt besteht eine Deregulation der Aktivierung der Ubiquitin abhängigen Proteolyse, die ebenfalls zum Ausbleiben der Zytokinese beiträgt (Ahuja et al. [2007]).

Bei Studien zum Zellzyklus von Kardiomyozyten bleibt auch in Zukunft die Frage relevant, in welcher Größenordnung Mitose und Zytokinese induziert werden können. Ist die durch Modifizierung des Zellzyklus hervorgerufene endogene Proliferation der Herzmuskelzellen gering, resultiert daraus ein limitierter klinisch-therapeutischer Nutzen der molekularen Intervention.

5.4 Vergleich immunzytochemischer Nachweismöglichkeiten von Mitose und Zytokinese bei Herzmuskelzellen

Der Nachweis reprogrammierter Kardiomyozyten im Zellzyklus kann mittels verschiedener Methoden erfolgen (Bicknell et al. [2007]). Dabei gilt bei Herzmuskelzellen der Grundsatz, dass DNA-Synthese nicht in Genomduplikation, Genomduplikation nicht in Karyogenese und Karyogenese nicht in Zytokinese resultieren muss (Pasumarthi and Field [2002]). Der experimentelle Nachweis spezifischer Phasen des Zellzyklus bedarf eines auf die Beweisführung orientierten, differenzierten Methodeneinsatz. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Immunzytochemie. Mittels geeigneter spezifischer Antikörper können subzelluläre Lokalisationen von Proteinen und intrazelluläre Prozesse sichtbar gemacht werden. Die Methode ist sowohl *in vitro* bei primären Herzmuskelzellkulturen als auch *in vivo* bei myokardialen Gewebeschnitten anwendbar. Die Manipulation an molekularen Zielen der Zellzyklusmaschinerie führt, soweit sie nicht unter der Kontrolle eines kardiomyozytenspezifischen Promotors erfolgt, auch zur Aktivierung des Zellzyklus bei proliferationsfähigen Nicht-Kardiomyozyten. Um so wichtiger ist die immunzytochemische Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten durch die Verwendung von Antikörpern gegen kardiomyozytenspezifische Proteine wie *Myosin Heavy Chain* (MF20), Troponin T und I oder sarkomerischem Aktin.

Aktin ist ein hochkonserviertes Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen als Bestandteil des Zytoskeletts vorkommt. Am Beispiel des Aktins wird erkennbar, dass allein die immunzytochemische Färbung mit Phalloidin als Nachweis einer kardiomyozytären Originalität nicht ausreicht. Erst die intrazelluläre, typisch quer gestreifte Anordnung der Aktin-Myosin-Troponin-Komplexe unterscheidet Herzmuskelzellen von Fibroblasten. Adulte Herzmuskelzellen *in vitro* sind aufgrund der doppelten Lichtbrechung ihrer Myofibrillen sowie ihrer typisch stäbchenförmigen Morphe auch im Phasenkontrastmikroskop ohne weitere Färbung darstellbar.

Neben der Kardiomyozytenspezifität ist der Nachweis der jeweiligen Zellzyklusphase von größter Bedeutung. Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das als Proliferationsmarker immunzytochemische Verwendung findet und in allen Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-, M-Phase) nachweisbar ist (Gerdes et al. [1984]). Die Expression von Ki-67 erfolgt auf niedrigem Niveau auch in nicht proliferieren-

den, außerhalb des Zellzyklus ruhenden Zellen, da das Protein eng mit der ribosomalen RNA-Transkription assoziiert ist (Bullwinkel et al. [2006]). Ki-67 ist außerdem in Zellen nachweisbar, die im G1/S- bzw. G2/M-Phasenübergang arretiert sind (van Oijen [1998]). Der immunzytochemische Nachweis von Ki-67 ermöglicht eher eine Beurteilung des Potenzials zur Zellteilung als eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Zellzyklusphase. Als Marker für Zytokinese ist Ki-67 ungeeignet.

Bromdesoxyuridin (BrdU), ein chemisches Analogon des Nucleosids Desoxythymidin, wird in proliferierenden Zellen während der S-Phase in die DNA eingebaut. Spezifische Antikörper gegen BrdU werden eingesetzt, um DNA-Synthese immunzytochemisch nachzuweisen (Gratzner [1982]). Für die Bindung des Antikörpers an BrdU ist eine Denaturierung der DNA notwendig, die üblicherweise durch Applikation von Säure oder Hitze erfolgt (Beisker et al. [1987]). BrdU-Inkorporation ereignet sich nicht nur während der S-Phase sondern auch bei DNA-Reparaturvorgängen sowie im Rahmen myokardialer Hypertrophie (Dolbeare [1996]). Die BrdU-Konzentration im Zellkulturmedium bzw. Serum beeinflusst die Zellzyklusaktivität, denn durch BrdU-Einbau in die DNA verringert sich nachweislich die Fähigkeit proliferierender Zellen zur Zellteilung. Konzentrationen von nur 30 μM führen nach Ablauf einer DNA-Replikation bereits zum Wachstumsstillstand, 400 μM zum G2-Arrest (Rabinovitch [1983]). Die BrdU-Inkorporation kann mittels Immunzytochemie oder Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Die Durchflusszytometrie ist auch ein geeignetes Verfahren, um Go/G1-, S- und G2/M-Zellpopulationen zu unterscheiden. Dazu wird DNA mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol oder Propidiumiodid gefärbt. Die emittierte Fluoreszenz des Farbstoffs, der stöchiometrisch an die DNA bindet, ist proportional zur Menge der zellulären DNA. Zellen in G2- oder M-Phase weisen den doppelten DNA Gehalt einer Zelle in Go- oder G1-Phase auf. Zellen in der S-Phase zeigen einen DNA-Gehalt, der zwischen dem der Go/G1- und G2/M-Zellpopulation liegt (Krishan [1975]).

Neben BrdU findet auch *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) als S-Phase-Marker immunzytochemische Verwendung. Außerhalb der S-Phase ist PCNA auch in G2/M-Phase-Zellen nachweisbar (Kurki et al. [1986]). PCNA ist Bestandteil der DNA-Replikationsgabel und wird zur DNA-Synthese und -reparatur benötigt. Mit p21 und Zyklin D1 bildet PCNA Komplexe, die die DNA-Replikation inhibieren können (Zhang et al. [1993], Xiong et al. [1992]).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde phosphoryliertes Histon H3 (Ser10) als Mitosemarker verwendet. Histon H3 kann aminoterminal am Serin-10, Serin-28 und Threonin-11 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung am Serin-10 ist funktionell mit der Chromosomenkondensation eng verbunden und immunzytochemisch ab der späten G2-Phase nachweisbar (Wei et al. [1998]). Die Dephosphorylierung und damit die Abnahme des immunzytochemischen Signals von Histon H3 (Ser10) beginnt in der Anaphase und ist noch vor der Chromosomendekondensation in der Telophase abgeschlossen. Phosphoryliertes Histon H3 (Ser10) ist, wenn auch in geringerem Maße, in Interphasezellen nachweisbar (Hendzel et al. [1997]).

Da das immunzytochemische Signal von PiH3 chromosomal lokalisiert auftritt, konnte in der vorliegenden Arbeit durch die intrazelluläre Anordnung der kondensierten Chromosomen eine exakte

Zuordnung der mitotischen Herzmuskelzellen zu Pro-, Meta-, Ana- und Telophase vorgenommen werden. Phosphoryliertes Histon H3 (Ser10) ist ein geeigneter Mitosemarker bei neonatalen und adulten Kardiomyozyten. Phosphorylierung des Histons H3 am Serin-28 erfolgt im Gegensatz zur Phosphorylierung am Serin-10 exklusiv während der Mitose und nicht in der Interphase (Goto et al. [1999]). Immunzytochemisch kann phosphoryliertes Histon H3 (Ser28) in allen Mitosestadien nachgewiesen werden, auch wenn das Signal zur Ana- und Telophase hin abfällt. Als Mitosemarker erscheint PiH3 (Ser28) dem PiH3 (Ser10) überlegen. Allerdings beeinflusst die Dauer der Zellfixierung die Detektion von PiH3 (Ser28) (Hirata et al. [2004]).

Der immunzytochemische Nachweis von Zytokinese, ist mit PiH3 allein nicht zu führen. Ein geeigneter Zytokinesemarker liegt mit alpha-Tubulin vor, das den Spindelfaserapparat während der Mitose und insbesondere den *midbody* als strukturelles Äquivalent der Zytokinese visualisiert. Der immunzytochemische strukturelle Nachweis des Spindelapparats und des genetischen Materials erlaubt durch die Kombination eines mitotischen (PiH3) und zytokinetischen (alpha-Tubulin) Markers eindeutige Aussagen über das Vorliegen von Mitose und Zytokinese bei Herzmuskelzellen. Dieser immunzytologische Goldstandard zum Nachweis von Mitosen und Zytokinesen weist andererseits beträchtliche Limitationen auf: Die immunzytochemische Untersuchung an fixierten Zellen liefert eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Fixation. Aussagen über das weitere Schicksal mitotisch fixierter Kardiomyozyten lassen sich nicht treffen. Der gewünschte gleichzeitige Einsatz unterschiedlicher, spezifischer Antikörper innerhalb einer Zelle gegen ein kardiomyozytenspezifisches Antigen, gegen exprimierte Transgenprodukte sowie gegen mitotische und zytokinetische Markerproteine ist methodisch begrenzt.

In Zukunft könnte die Konstruktion und Verwendung adenoviraler Vektoren mit kardiomyozytenspezifischem Promotor und multiplen, fluoreszierenden Expressionsprodukten immunzytochemische Untersuchungen an mitotischen Herzmuskelzellen vereinfachen.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Adulte Herzmuskelzellen sind Zellen, die ihre endogene Fähigkeit zur Zellteilung postnatal verloren haben. Wichtige Voraussetzung der mitotischen Teilung ist eine vorangegangene DNA-Replikation. Der präreplikative Komplex spielt bei der Initiierung der DNA-Synthese eine entscheidende Rolle. Da DNA-Replikation und hypertrophes Zellwachstum frühe Signalwege auf molekularer Ebene teilen, ist anzunehmen, dass der präreplikative Komplex nicht nur Bestandteil DNA-Replikations-relevanter, sondern auch Hypertrophie-assoziiierter Signalwege ist.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals Faktoren des präreplikativen Komplex bei Herzmuskelzellen. In proliferierenden Zellen sind die Faktoren des pre RC ORC4, MCM2, MCM5, MCM6 und cdc47/MCM7 im Western Blot detektierbar. Auch neonatale Kardiomyozyten weisen diese Faktoren am 5. postnatalen Tag auf. In adulten Kardiomyozyten gelang unter basalen Bedingungen kein Nachweis.

Zur Beantwortung der Frage, ob Faktoren des präreplikativen Komplex am postulierten gemeinsamen zellulären Signalweg von DNA-Replikation und Hypertrophie beteiligt sind, wurden adulte Kardiomyozyten mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Anschließend wurde ein Ganzzellextrakt der stimulierten Zellen gewonnen. Interessanterweise wiesen die stimulierten, adulten Kardiomyozyten ein differenzielles Proteinexpressionsmuster auf. Im Gegensatz zu unstimulierten, adulten Kardiomyozyten gelang bei den mit Wachstumsfaktoren stimulierten Zellen der Nachweis von MCM5 und MCM6 im Western Blot, MCM2, cdc47/MCM7 und ORC4 konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Terminal differenzierte Kardiomyozyten antworten demnach auf den Wachstumsstimulus Serum mit einer teilweisen Aktivierung des präreplikativen Komplex. Sie verhalten sich zunächst wie proliferierende Zellen auf dem Weg zur S-Phase, ohne jedoch DNA-Synthese oder Zytokinese einzuleiten.

Regeneration von postmitotischem Myokard kann durch Rekrutierung und Differenzierung von Vorläuferzellen oder durch Induktion von Zytokinese in morphologisch und funktionell ausdifferenzierten Kardiomyozyten erzielt werden. Im Rahmen der Dissertation wurde die Hypothese untersucht, ob Stimulation isolierter Herzmuskelzellen der Ratte mit exogen zugeführten Zellzyklusfaktoren Mitose und Zytokinese induzieren kann.

5 Tage alte, neonatale Kardiomyozyten und 12 Wochen alte, adulte Kardiomyozyten der Ratte wurden mit E2F2, Zyklin D1 und CDK4 in Gegenwart von 10 % Pferdeserum adenoviral transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion erfolgten indirekte immunzytochemische Untersuchungen. Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 wurden benutzt, um mitotische Kardiomyozyten zu identifizieren. Die zusätzliche Darstellung des Spindelfaserapparats durch Antikörper gegen alpha-Tubulin ermöglichte die Unterscheidung zwischen mitotischen und zytokinetischen Herzmuskelzellen. Nur im Rahmen der Zellteilung kommt es zu einer mechanischen Durchtrennung des Spindelfaserapparats durch den sich einschnürenden kontraktile Ring und damit zur Entstehung des für die Zytokinese charakteristischen *midbody*. 9 % der adenoviral mit E2F2, CDK4 oder Zyklin D1 transfizierten, neonatalen Zellen wiesen ein positives PiH3 Signal auf. Zytokinesen konnten in 1.3 % der adenoviral transfizierten, neonatalen Kardiomyozyten beobachtet werden. Interessanterweise führte die alleinige adenovirale Transfektion adulter Herzmuskelzellen mit E2F2 nicht zum Wiedereintritt in den Zellzyklus. Die Ko-Expression von E2F2 mit Zyklin D1 und CDK4 in adulten Kardiomyozyten resultierte in 3 % Mitose, ohne Nachweis von Zytokinese. Die vorliegende Arbeit beweist, dass terminal differenzierte Herzmuskelzellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus befähigt sind und liefert neue Ansätze für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur endogenen Myokardregeneration.

Literaturverzeichnis

- Agah R, Kirshenbaum L, Abdellatif M, et al. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *The Journal of clinical investigation* 1997;100(11):2722–2728. 1.3.2
- Agbulut O, Menot M, Li Z, et al. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 2003; 58(2):451–459. 1.2.4
- Ahuja P, Perriard E, Pedrazzini T, et al. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Experimental cell research* 2007;313(6):1270–1283. 5.2, 5.3
- Ahuja P, Perriard E, Perriard J, et al. Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *Journal of Cell Science* 2004;117(5):3295–3306. 1.2.3, 5.1, 5.2, 5.3
- Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002; 415(6868):240–243. 1.2.4
- Aparicio O, Stout A, Bell S. Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(16):9130–9135. 1.3.1
- Armstrong M, Lee D, Armstrong P. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Developmental Dynamics* 2000;219(2):226–236. 5.3
- Atchley A, Douglas P. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. *Cardiology Clinics* 2007;25(3):371–382. 5.1
- Athanasuleas C, Stanley AJ, Buckberg G, et al. Surgical anterior ventricular endocardial restoration (SAVER) in the dilated remodeled ventricle after anterior myocardial infarction. RESTORE group. Reconstructive Endoventricular Surgery, returning Torsion Original Radius Elliptical Shape to the LV. *Journal of the American College of Cardiology* 2001;73(5):1199–1209. 1.2.2
- Avivi C, Rosen O, Goldstein R. New chromogens for alkaline phosphatase histochemistry: salmon and magenta phosphate are useful for single- and double-label immunohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 1994;42(4):551–554. 4.4

- Balsam L, Wagers A, Christensen J, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668–673. 1.2.4
- Bansch D, Antz M, Boczor S, et al. Primary prevention of sudden cardiac death in idiopathic dilated cardiomyopathy: the Cardiomyopathy Trial (CAT). *Circulation* 2002;105(12):1453–1458. 1.2.2
- Bardy G, Lee K, Mark D, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine* 2005;352(3):225–237. 1.2.2
- Beisker W, Dolbeare F, Gray J. An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometrie* 1987;8(2):235–239. 5.4
- Bell S. Eukaryotic replicators and associated protein complexes. *Current Opinion of Genetic Development* 1995;5(2):162–167. 1.3.1
- Bell S. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes and Development* 2002;16(6):659–672. 1.3.1
- Bell S, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* 2002; 71:333–374. 1.3.1
- Beltrami A, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763–776. 1.2.4
- Beltrami A, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2001;344(23):1750–1757. 5.3
- Bicknell K, Coxon C, Brooks G. Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007;42(4):706–721. 5.3, 5.4
- Bielinsky A, Gerbi S. Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *Journal of Cell Science* 2001;114:643–651. 1.3.1
- Bittner R, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and Embryology* 1999; 199(5):391–396. 1.2.4
- Black A, Azizkhan-Clifford J. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 1999;237(2):281–302. 1.3.2
- Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(13):5889–5892. 1.3.2

- Bradley D, Bradley E, Baughman K, et al. Cardiac resynchronization and death from progressive heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of American Medical Association* 2003;289(6):730–740. 1.2.2
- Brinkley W. Microtubules: a brief historical perspective. *Journal of structural biology* 1997; 118(2):84–86. 4.6
- Bristow M, Saxon L, Boehmer J, et al. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *The New England Journal of Medicine* 2004;350(21):2140–2150. 1.2.2
- Brockes J, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002;3(8):566–574. 1.2.3
- Brodsky W, Arefyeva A, Uryvaeva I. Mitotic polyploidization of mouse heart myocytes during the first postnatal week. *Cell and tissue research* 1980;210(1):133–134. 1.3.1
- Brooks G, Poolman R, Li J. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovascular Research* 1998;39(2):301–311. 5.2
- Buchkovich K, Duffy L, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989;58(6):1097–1105. 1.3.1
- Buja M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology* 2005;14(4):170–175. 1.2.3, 5.3
- Bullough W, Johnson M. The energy relations of mitotic activity in adult mouse epidermis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of Biological character* 1951;138(893):562–575. 1.3.1
- Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 206(3):624–635. 5.4
- Busk P. Cyclin D in left ventricle hypertrophy. *Cell Cycle* 2003;2(2):91–95. 5.2
- Chaudhry H, Dashoush N, Tang H, et al. Cyclin A2 mediates cardiomyocyte mitosis in the post-mitotic myocardium. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(34):35858–35866. 1.2.3
- Chen P, Scully P, Shew J, et al. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989;58(6):1193–1198. 1.3.1
- Chong J, Hayashi M, Simon M, et al. A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(4):1530–1535. 1.3.1

- Cleland J, Daubert J, Erdmann E, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *The New England Journal of Medicine* 2005;352(15):1539–1549. 1.2.2
- Dahlöf B, Sever P, Poulter N, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366(9489):895–906. 1.2.1
- Datwyler D, Magyar J, Weikert C, et al. Reactivation of the mitosis-promoting factor in postmitotic cardiomyocytes. *Cells, tissues, organs* 2003;175(2):61–71. 1.2.3
- Davis B, Cutler J, Gordon D, et al. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Journal of American Medical Association* 2002;288(23):2981–2997. 1.2.1
- Davis R, Weintraub H, Lassar A. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987;51(6):987–1000. 1.2.5
- Dawber T, Meadors G, Moore Fj. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *American Journal of Public Health* 1951;41(3):279–281. 1.1
- DeCaprio J, Ludlow J, Lynch D, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989;58(6):1085–95. 1.3.1
- Dolbear F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. *The Histochemical Journal* 1996;28(8):531–575. 5.4
- Donath S, Li P, Willenbockel C, et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006;113(9):1203–1212. 1.2.3
- Drury L, Perkins G, Diffley J. The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Current Biology* 2000;10(5):231–240. 1.3.1
- Dutta A, Bell S. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1997;13:293–332. 1.3.1
- Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes and Development* 1998;12(15):2245–2262. 1.3.1

- Ebelt H, Hufnagel N, Neuhaus P, et al. Divergent siblings: E2F2 and E2F4 but not E2F1 and E2F3 induce DNA synthesis in cardiomyocytes without activation of apoptosis. *Circulation Research* 2005;96(5):509–517. 1.3.2, 5.3
- Elledge S. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274(5293):1664–1672. 1.3.1
- Engel F, Hauck L, Boehm M, et al. p21CIP1 Controls Proliferating Cell Nuclear Antigen Level in Adult Cardiomyocytes. *Molecular and cellular biology* 2003;23(2):555–565. 5.2
- Engel F, Hsieh P, Lee R, et al. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(42):15546–15551. 1.2.3
- Engel F, Schebesta M, Duong M, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Development* 2005;19(10):1175–1187. 1.2.3
- Fagerberg B, Hjalmarson, Goldstein S, et al. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353(9169):2001–2007. 1.2.1
- Fischer M, Baessler A, Holmer S, et al. Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands. *Zeitschrift für Kardiologie* 2003 2003; 92(4):294–302. 1.1
- Flather M, Yusuf S, Kober L, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 2000;355(9215):1575–1581. 1.2.1
- Fujita N, Furukawa Y, Itabashi N, et al. Differences in E2F subunit expression in quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2002;283(1):H204–H212. 1.3.2
- Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 2003;125(6):1470–1479. 1.2.4
- Furuno N, den Elzen N, Pines J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *The Journal of Cell Biology* 1999;147(2):295–306. 1.3.1
- Garg R, Gorlin R, Smith T, et al. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336(8):525–533. 1.2.1

- Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circulation Research* 2002;91(10):866–876. 1.2.4
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology* 1984; 133(4):1710–1715. 5.4
- Gorgoulis V, Vassiliou L, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005;434(7035):907–913. 1.3.1
- Gossen M, Pak D, Hansen S, et al. A Drosophila homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* 1995;270(5242):1674–1677. 1.3.1
- Goto H, Tomono Y, Ajiro K, et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(36):25543–25549. 5.4
- Gratzner H. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982;218(4571):474–475. 5.4
- Gummert J, Rahmel A, Bucerius J, et al. Mitral valve repair in patients with end stage cardiomyopathy: who benefits? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2003;23(6):1017–1022. 1.2.2
- Hagting A, Karlsson C, Clute P, et al. MPF localization is controlled by nuclear export. *European Molecular Biology Organization* 1998;17(14):4127–4138. 1.3.1
- von Harsdorf R, Hauck L, Mehrhof F, et al. E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I. *Circulation Research* 1999;85(2):128–136. 1.3.2, 4.8
- Hartwell L, Weinert T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246(4930):629–34. 1.3.1
- Hauck L, von Harsdorf R. E2F transcription factors and pRb pocket proteins in cell cycle progression. *Methods in molecular biology* 2005;296:239–245. 1.3.2
- Henzel M, Wei Y, Mancini M, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997;106(6):348–360. 5.4
- Heng B, Haider H, Sim E, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular Research* 2004;62(1):34–42. 1.2.4

- Hill J, Olson E. Cardiac plasticity. *The New England Journal of Medicine* 2008;358(13):1370–1380. 5.1
- Hinchcliffe E, Thompson E, Miller F, et al. Nucleo-cytoplasmic interactions that control nuclear envelope breakdown and entry into mitosis in the sea urchin zygote. *Journal of Cell Science* 1999;112(8):1139–1148. 1.3.1
- Hirata A, Inada K, Tsukamoto T, et al. Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004;52(11):1503–1509. 5.4
- Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, et al. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Developmental biology* 2006;289(2):430–441. 5.1
- Hodgson D, Behfar A, Zingman L, et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004;287(2):471–479. 1.2.4
- Hoppe U, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie* 2001;90(3):218–237. 1.2.1
- Hsu J, Sun Z, Li X, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 2000;102(3):279–291. 1.3.1
- Hunt S. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary. *Circulation* 2001;104(24):2996–3007. 1.2.1
- Hunt T, Luca F, Ruderman J. The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *The Journal of cell biology* 1992;116(3):707–724. 1.3.1
- Hunter J, Chien K. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England Journal of Medicine* 1999;341(17):1276–1283. 5.1
- Iijima Y, Nagai T, Mizukami M, et al. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17(10):1361–1363. 1.2.5
- Irwin M, Marin M, Phillips A, et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000;407(6804):645–648. 1.3.2
- Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Journal of Heart Lung Transplantation* 2004;23(4):436–445. 1.2.4

- Ishimi Y, Komamura-Kohno Y, You Z, et al. Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(21):16235–16241. 1.3.1
- Jackson K, Majka S, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *Journal of Clinical Investigation* 2001;107(11):1395–1402. 1.2.4
- Jacob F, Brenner S. On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 1963;28:329–348. 1.3.1
- Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, et al. The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Failure Reviews* 2000;5(3):239–250. 1.1
- Jares P, Blow J. *Xenopus cdc7* function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes and Development* 2000;14(12):1528–1540. 1.3.1
- Jensen C, Herold P, Brunner H. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nature reviews Drug discovery* 2008;7(5):399–410. 1.2.1
- Jiang W, McDonald D, Hope T, et al. Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 1999;18(20):5703–5713. 1.3.1
- Julian M, Tollon Y, Lajoie-Mazenc I, et al. Gamma-Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. *Journal of cell science* 1993;105(1):145–156. 4.6
- Kadish A, Dyer A, Daubert J, et al. Prophylactic defibrillator implantation in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 2004;350(21):2151–2158. 1.2.2
- Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002;234-235(1):119–124. 1.2.4
- Kang H, Kim H, Zhang S, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363(9411):751–756. 1.2.4
- Kellerman S, Moore J, Zierhut W, et al. Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1992;24(5):497–505. 4.6

- Kirshenbaum L, Abdellatif M, Chakraborty S, et al. Human E2F-1 reactivates cell cycle progression in ventricular myocytes and represses cardiac gene transcription. *Developmental biology* 1996;179(2):402–411. 1.3.2
- Kjekshus J, Apetrei E, Barrios V, et al. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *The New England Journal of Medicine* 2007;357(27):2248–2261. 1.2.1
- Koepp D, Schaefer L, Ye X, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 2001;294(5540):173–177. 1.3.1
- Krause D. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy* 2002;9(11):754–758. 1.2.4
- Krishan A. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology* 1975;66(1):188–193. 5.4
- Kumagai H, Sato N, Yamada M, et al. A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 1999;19(7):5083–5095. 1.3.1
- Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz E. How do cardiomyocytes die? Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *Journal of Cardiac Failure* 2006;12(5):381–391. 5.1
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Experimental Cell Research* 1986;166(1):209–219. 5.4
- Labbe J, Capony J, Caput D, et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *European Molecular Biology Organization* 1989;8(10):3053–3058. 1.3.1
- Labib K, Tercero J, Diffley J. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* 2000;288(5471):1643–1647. 1.3.1, 5.2
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–685. 3.2.1
- Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005;111(18):2356–2363. 1.2.1
- Lane H, Nigg E. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *The Journal of Cell Biology* 1996;135(6 Pt 2):1701–1713. 1.3.1
- Lattanzi L, Salvatori G, Coletta M, et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101(10):2119–2128. 1.2.5

- Lechat P, Dargie H, Erdmann E, et al. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353(9146):9–13. 1.2.1
- Li F, Wang X, Bunger P, et al. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring; Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1997;29(6):1541–1551; 1553–1565. 1.2.3, 5.1, 5.3
- Li F, Wang X, Capasso J, et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1996; 28(8):1737–1746. 5.1
- Li J, Poolman R, Brooks G. Role of G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinases during cardiomyocyte hypertrophic growth in rats. *The American journal of physiology* 1998;275(3):814–822. 5.3
- Liang Q, Molkenkin J. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003;35(12):1385–1394. 1.2.3
- Lukas J, Petersen B, Holm K, et al. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and Cellular Biology* 1996;16(3):1047–1057. 1.3.2
- Maiorano D, Moreau M, Jand Mechali. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* 2000;404(6778):622–625. 1.3.1
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1999;103(5):697–705. 1.2.4
- Mangi A, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nature Medicine* 2003;9(9):1195–1201. 1.2.4
- Mazia D. How cells divide. *Scientific American* 1961;(205):100–120. 1.3.1
- McConnell B, Gregory F, Stott F, et al. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Molecular and Cellular Biology* 1999;19(3):1981–1989. 1.3.1
- McGill C, Brooks G. Cell cycle control mechanisms and their role cardiac growth. *Cardiovascular Research* 1995;30:557–569. 1.2.3
- McMurray J, Ostergren J, Swedberg K, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 2003;362(9386):767–771. 1.2.1

- Meghji P, Nazir S, Dick D, et al. Regional workload induced changes in electrophysiology and immediate early gene expression in intact in situ porcine heart. *Journal of Molecular Cell Cardiology* 1997;29(11):3147–3155. 1.1
- Mihara K, Cao X, Yen A, et al. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989;246(4935):1300–1303. 1.3.1
- Mimura S, Masuda T, Matsui T, et al. Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes to Cells* 2000;5(6):439–452. 1.3.1
- Morgan D. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;373(6518):131–134. 1.3.1
- Morgan D. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biology* 1999;1(2):E47–E53. 1.3.1
- Moss A, Zareba W, Hall W, et al. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *The New England Journal of Medicine* 2002;346(12):877–883. 1.2.2
- Mosterd A, Hoes A, de Bruyne M, et al. Prevalence of heart failure and leftventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *European Heart Journal* 1999;20:447–455. 1.1
- Murry C, Soonpaa M, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664–668. 1.2.4
- Nasmyth K, Peters J, Uhlmann F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 2000;288(5470):1379–1385. 1.3.1
- Newlon C. Putting it all together: building a prereplicative complex. *Cell* 1997;91(6):717–720. 4.2, 5.2
- Nigg E. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2(1):21–32. 5.1
- Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, et al. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 2000;404(6778):625–628. 1.3.1
- Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003;102(13):4361–4368. 1.2.4
- Nozato T, Ito H, Watanabe M, et al. Overexpression of cdk Inhibitor p16INK4a by adenovirus vector inhibits cardiac hypertrophy in vitro and in vivo: a novel strategy for the gene therapy of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001;33(8):1493–1504. 1.3.2

- Nygren J, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine* 2004;10(5):494–501. 1.2.4
- Ohtani K, Tsujimoto A, Ikeda M, et al. Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 1998;17(14):1777–1785. 1.3.2
- van Oijen RuSPuRG MG und Medema. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *American Journal of Clinical Pathology* 1998;110(1):24–31. 5.4
- Ookata K, Hisanaga S, Okano T, et al. Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *The EMBO Journal* 1992; 11(5):1763–1772. 1.3.1
- Oparil S, Bishop S, Jr CF. Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension* 1984; 6(6):38–43. 5.1
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001a;410(6829):701–705. 1.2.4
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001b; 98(18):10344–10349. 1.2.4
- Pardee A. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603–608. 1.3.1
- Pasero P, Duncker B, Schwob E, et al. A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes and Development* 1999; 13(16):2159–2176. 1.3.1
- Pasumarthi K, Field L. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circulation Research* 2002; 90(10):1044–1054. 1.2.3, 5.3, 5.4
- Pasumarthi K, Nakajima H, Nakajima H, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circulation Research* 2005; 96(1):110–118. 1.2.3, 5.3
- Pei X, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005;24(17):2787–2795. 1.3.1
- Perkins G, Diffley J. Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders. *Molecular Cell* 1998;2(1):23–32. 1.3.1

- Pines J, Rieder C. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature Cell Biology* 2001;3(1):E3–6. 1.3.1
- Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine* 2003;348(14):1309–1321. 1.2.1
- Pitt B, Zannad F, WJ R, et al. Effectiveness of Spironolactone added to an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor and a Loop Diuretic for Severe Chronic Congestive Heart Failure(The Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *American Journal of Cardiology* 1996; 78(8):902–907. 1.2.1
- Poss K, Wilson L, Keating M. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;298(5601):2188–2190. 1.2.3
- Powell T, Terrar D, Twist V. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *Journal of Physiology* 1980;(302):131–153. 3.1.2
- Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann K. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Research* 2003;31(3):878–885. 4.6
- Puck T, Steffen J. Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemide and sublethal doses of x-irradiation. *Biophysical Journal* 1963;(33):379–397. 1.3.1
- Rabinovitch P. Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling cell fraction transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983;80(10):2951–2955. 5.4
- Reinecke H, MacDonald G, Hauschka S, et al. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000;149(3):731–740. 1.2.5
- Reinecke H, Poppa V, Murry C. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002;34(2):241–249. 1.2.5
- Rieder C. Effect of hypothermia (20–25 degrees C) on mitosis in PtK1 cells. *Cell Biology International Reports* 1981;(6):563–573. 1.3.1
- Rieder C, Cole R. Microtubule disassembly delays the G2-M transition in vertebrates. *Current Biology* 2000;10(17):1067–1070. 1.3.1

- Rieder C, Khodjakov A. Mitosis and checkpoints that control progression through mitosis in vertebrate somatic cells. *Progress in Cell Cycle Research* 1997;(3):301–312. 1.3.1, 1.3.1
- Rogers W, Johnston D, Yusuf S, et al. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine* 1991;32(5):293–302. 1.2.1
- Rohrbough J, Pinto S, Mihalek R, et al. Latheo, a drosophila gene involved in learning, regulates functional synaptic plasticity. *Neuron* 1999;23(1):55–70. 5.2
- Romano M, Bolling S. Mitral valve repair as an alternative treatment for heart failure patients. *Heart Failure Monitor* 2003;4(1):7–12. 1.2.2
- Rumyantsev P. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *International Review Cytology* 1977;(51):186–273. 1.1, 1.2.3
- Sadoshima J, Aoki H, Izumo S. Angiotensin II and serum differentially regulate expression of cyclins, activity of cyclin-dependent kinases, and phosphorylation of retinoblastoma gene product in neonatal cardiac myocytes. *Circulation Research* 1997;80(2):228–241. 1.3.2
- Sansoucie D, Cavaliere T. Transition from fetal to extrauterine circulation. *Neonatale Network* 1997;16(2):5–12. 5.1
- Schachinger V, Assmus B, Britten M, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;44(8):1690–1699. 1.2.4
- Selvetella G, Hirsch E, Notte A, et al. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovascular Research* 2004;63(3):373–380. 5.1
- Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circulation Research* 1982;51(6):787–801. 1.3.2, 3.1.1
- Singer J, Gurian-West M, Clurman B, et al. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes and Development* 1999;13(18):2375–2387. 5.3
- Smith P, Klenk D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985;(150):76–85. 3.2.1
- Solomon M, Kaldis P. Regulation of CDKs by phosphorylation. *Results and Problems in Cell Differentiation* 1998;22:79–109. 1.3.1
- Soonpaa M, Koh G, Pajak L, et al. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 1997; 99(11):2644–2654. 1.2.3, 5.3

- Soos T, Park M, Kiyokawa H, et al. Regulation of the cell cycle by CDK inhibitors. *Results and Problems in Cell Differentiation* 1998;22:111–131. 1.3.1
- Strickberger S, Hummel J, Bartlett T, et al. Amiodarone versus implantable cardioverter-defibrillator: randomized trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy and asymptomatic nonsustained ventricular tachycardia—AMIOVIRT. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41(10):1713–1715. 1.2.2
- Studzinski G, Harrison L. Differentiation-related changes in the cell cycle traverse. *International Review Cytology* 1999;(189):1–58. 1.2.3
- Sumara I, Quadroni M, Frei C, et al. A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Developmental Cell* 2007;12(6):887–900. 5.3
- Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, et al. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1979;1(8131):1374–1376. 1.2.1
- Takahashi Y, Rayman J, Dynlacht B. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes and Development* 2000;14(7):804–16. 1.3.2
- Takisawa H, Mimura S, Kubota Y. Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Current Opinion in Cell Biology* 2000;12(6):690–696. 1.3.1
- Tamamori M, Ito H, Hiroe M, et al. Essential roles for G1 cyclin-dependent kinase activity in development of cardiomyocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology* 1998;275:2036–2040. 1.3.2, 5.3
- Tamamori-Adachi M, Hayashida K, Nobori K, et al. Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(48):50429–50436. 5.3
- Tamamori-Adachi M, Ito H, Nobori K, et al. Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture: a possible implication for cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;296(2):274–280. 1.3.2, 5.2
- Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, et al. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circulation research* 2003;92(1):9–12. 5.3
- Tapscott S. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 2005;132(12):2685–2695. 1.2.5

- Taylor D, Edwards L, Boucek M, et al. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-second official adult heart transplant report–2005. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2005;24(8):945–955. 1.2.2
- Tercero J, Labib K, Diffley J. DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 2000; 19(9):2082–2093. 1.3.1
- Thome K, Dhar S, Quintana D, et al. Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(75):35233–35241. 5.2
- Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145–1147. 1.2.4
- Tomita S, Ishida M, Nakatani T, et al. Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *Journal of Heart Lung Transplantation* 2004;23(5):577–584. 1.2.4
- Urbanek K, Quaini F, Tasca G, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100(18):10440–10445. 1.2.4
- Vara D, Bicknell K, Coxon C, et al. Inhibition of E2F abrogates the development of cardiac myocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(24):21388–21394. 5.2
- Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247(1-2):1–15. 1.3.1
- Walter J, Newport J. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Molecular Cell* 2000; 5(4):617–627. 1.3.1
- Wei Y, Mizzen C, Cook R, et al. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(13):7480–7484. 5.4
- Weinberg R. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323–330. 1.3.1
- Wheatley S, Hinchcliffe E, Glotzer M, et al. CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *The Journal of cell biology* 1997;138(2):385–393. 1.3.1

- Wollert K, Meyer G, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141–148. 1.2.4
- Woo Y, Panlilio C, Cheng R, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation* 2006;114(1 Suppl.):I206–213. 1.2.3
- Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992;71(3):504–514. 5.4
- Yang J, Bardes E, Moore J, et al. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes and Development* 1998;12(14):2131–2143. 1.3.1
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman K. What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology* 1995;7(6):835–842. 1.3.1
- Zhang H, Postigo A, Dean D. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* 1999;97(1):53–61. 1.3.1
- Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Molecular Biology of the Cell* 1993;4(9):897–906. 5.4
- Zou L, Stillman B. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20(9):3086–3096. 1.3.1

Erklärung an Eides Statt

Ich, Thomas Knaus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Induktion von Zytokinese und Mitose bei Herzmuskelzellen“ 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.

Curriculum Vitae

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