
Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zum Einfluss des
Calcineurin and Ras binding protein (Carabin)
auf die Wachstumsregulation von Kardiomyozyten

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sebastian C. B. Bremer
aus Mönchengladbach

Göttingen 2011

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. G. Hasenfuß

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands

Tag der mündlichen Prüfung:

13. März 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	1
1.2. Molekulare Mechanismen der Myokardhypertrophie	4
1.2.1. Die MAPK-Signalwege	5
1.2.2. Der Calcineurin/NFAT-Signalweg	8
1.3. Das <i>Calcineurin and Ras binding protein (Carabin)</i>	11
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.2. Enzyme	16
2.1.3. Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.4. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	17
2.1.5. Lösungen und Medien.....	18
2.1.5.1. Lösungen für die Zellisolation	18
2.1.5.2. Lösungen für die eukaryontische Zellkultur.....	19
2.1.5.3. Lösungen für den Western-Blot	19
2.1.6. Adenoviren	21
2.1.7. Tiere	21
2.1.8. Antikörper	22

2.1.8.1.	Primärantikörper.....	22
2.1.8.2.	Sekundärantikörper	23
2.1.9.	Sterilisationsverfahren	23
2.1.10.	Software	24
2.1.11.	Geräte.....	24
2.2.	Methoden.....	26
2.2.1.	Zellbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1.	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten	26
2.2.1.2.	Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten.....	27
2.2.1.3.	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten	28
2.2.1.4.	Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten	29
2.2.1.5.	Adenoviraler Gentransfer isolierter Rattenkardiomyozyten	30
2.2.1.6.	Verwendung eines Carabin-Adenovirus.....	30
2.2.1.7.	Verwendung eines konstitutiv aktiven Calcineurin-Adenovirus	31
2.2.1.8.	Planimetrie ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten	31
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.2.1.	Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen.....	32
2.2.2.2.	Herstellung von Protein-Lysaten aus tierischen Geweben	33
2.2.2.3.	Proteinkonzentrationsbestimmung von Protein-Lysaten	33
2.2.2.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.2.2.5.	Western-Blot	35
2.2.2.6.	Immundetektion von membrangebundenen Proteinen.....	35
2.2.3.	Subzelluläre Lokalisation von Proteinen	36
2.2.3.1.	Immunfluoreszenz-Färbung eukaryontischer Zellen	36
2.2.3.2.	Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen	37
2.2.4.	Transgene Mäuse	38
2.2.4.1.	Carabin-transgene Maus	38
2.2.4.2.	Genotypisierung transgener Mäuse.....	38

2.2.4.3.	Echokardiographische Phänotypisierung transgener Mäuse	39
2.2.4.4.	Implantation von mikroosmotischen Pumpen.....	40
2.2.5.	Histologische Methoden	41
2.2.5.1.	Gewebefixierung und -einbettung	41
2.2.5.2.	Herstellung von Paraffinschnitten	42
2.2.5.3.	WGA-Färbung von Gewebeschnitten	42
2.2.5.4.	Immunhistochemie	43
2.2.6.	Ethik.....	45
2.2.7.	Statistische Auswertung.....	45
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Untersuchungen der durch Carabin beeinflussten Signaltransduktion in isolierten Kardiomyozyten	46
3.1.1.	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Carabin in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten durch Immunfluoreszenzfärbung	46
3.1.2.	Einfluss von Carabin auf die Hypertrophie von isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten	47
3.1.3.	Einfluss von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung durch Analyse der subzellulären Lokalisation eines NFATc3-GFP-Fusionsproteins in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten.....	51
3.1.4.	Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten mittels Western-Blot	53
3.1.5.	Einfluss von Carabin auf die Aktivierung der MAPK-Signalwege nach Stimulation mit Phenylephrin in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten.....	57
3.2.	Untersuchungen der durch Carabin beeinflussten Signaltransduktion in Carabin-transgenen Mäusen	61
3.2.1.	Vergleich der kardialen Carabin-Proteinexpression verschiedener Carabin-transgener Mauslinien im Western-Blot.....	61
3.2.2.	Untersuchungen in Carabin-transgenen Mäusen	63
3.2.2.1.	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Carabin mittels Immunhistochemie	63

3.2.2.2.	Untersuchung der Morphometrie.....	64
3.2.2.3.	Untersuchung des Calcineurin/NFAT- und des ERK/MAPK-Signalwegs.....	67
3.2.3.	Untersuchung von Carabin-transgenen Mäusen mit implantierten, Angiotensin-II-beladenen, osmotischen Minipumpen	68
3.2.3.1.	Untersuchung der Morphometrie.....	68
3.2.3.2.	Untersuchung des Calcineurin/NFAT- und des ERK/MAPK-Signalwegs.....	72
3.3.	Untersuchungen zur Regulation von Carabin <i>in vivo</i>	75
3.3.1.	Einfluss von Calcineurin auf die Expression von Carabin in Calcineurin-transgenen Mäusen.....	75
3.3.2.	Einfluss von Angiotensin-II-Stimulation auf die Expression von Carabin in Wildtypmäusen	76
4.	Diskussion	77
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	77
4.2.	Einfluss von Carabin auf die Phosphorylierung und die subzelluläre Lokalisation von NFAT <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	79
4.3.	Einfluss von Carabin auf die MAPK-Signalkaskade <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	82
4.4.	Einfluss von Carabin auf die Wachstumsregulation von Kardiomyozyten	83
4.5.	Untersuchung einer möglichen Regulation der Carabin-Expression	86
4.6.	Perspektiven.....	87
5.	Zusammenfassung	88
6.	Literaturverzeichnis.....	90

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
Ang-II	Angiotensin-II
APS	Ammoniumpersulfat
AZ	Aktenzeichen
bidest	bidestillatus, bidestilliert
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Da	Dalton, Molekülmasse
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DCM	dilated cardiomyopathy, dilatative Kardiomyopathie
dd	doppelt destilliert, bidestilliert
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
ERK	Extracellular-Signal-Regulated-Kinase
et al.	et alii (und andere)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HCM	hypertrophic cardiomyopathy, hypertrophe Kardiomyopathie
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun-N-terminal-Kinase
k	kilo = 10^3
L	Liter
μ	mikro = 10^{-6}
m	milli = 10^{-3} ; Meter
M	Molarität

MAPK	mitogen-activated-Proteinkinase
MEK	MAP/ERK-Kinase
min	Minute
MKK	MAPK-Kinase
MOI	multiplicity of infection (Viruslast pro Zelle)
n	nano = 10^{-9} ; Versuchsanzahl, Größe der Stichprobe
N	Normalität
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzwert (Ergebnis eines statistischen Signifikanztests)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phenylephrin
pfu	plaque forming units
pH	potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RCM	restriktive Kardiomyopathie
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute, [min^{-1}])
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-buffered saline with Tween (TBS-Tween)
TEMED	N,N-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	wheat germ agglutinin (Weizenlectin)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1.1	3
Abb. 1.2	6
Abb. 1.3	10
Abb. 2.1	31
Abb. 2.2	38
Abb. 2.3	39
Abb. 3.1	47
Abb. 3.2	48
Abb. 3.3	50
Abb. 3.4	52
Abb. 3.5	54
Abb. 3.6	55
Abb. 3.7	56
Abb. 3.8	58
Abb. 3.9	60
Abb. 3.10	62
Abb. 3.11	63
Abb. 3.12	64
Abb. 3.13	65
Abb. 3.14	66
Abb. 3.15	67
Abb. 3.16	68
Abb. 3.17	69
Abb. 3.18	71
Abb. 3.19	72
Abb. 3.20	73
Abb. 3.21	75
Abb. 3.22	76

Tabelle	Seite
Tab. 2.1	41
Tab. 3.1	65
Tab. 3.2	70

1. Einleitung

1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Die Myokardhypertrophie ist definiert, als eine Zunahme des myokardialen Gewebes in Folge physiologischer oder pathophysiologischer Ereignisse. Sie kann durch viele der verschiedenen Stimuli im Rahmen einer Herzinsuffizienz induziert werden, wie z.B. durch Druck- oder Volumenbelastung, oder auch selbst eine Herzinsuffizienz verursachen. Herzinsuffizienz ist definiert als ein Syndrom mit einer kardialen Minderleistung, aus der eine Minderversorgung und Schädigung von Gewebe und Organen resultiert (WHO, 1995; Erdmann, 2009).

Ein erhöhter intraventrikulärer Druck führt zu einem erhöhten transmuralen Druck und damit zu einer erhöhten Wandspannung. Gemäß dem Laplace-Gesetz ($K = (P \times r) / (2 \times d)$, K=Wandspannung, P=transmuraler Druck, r=Gefäßradius, d=Wanddicke) führt eine Hypertrophie zu einer Abnahme der Wandspannung (adaptive Hypertrophie) (Grossmann et al., 1975). Dieser Mechanismus wird zunächst als physiologisch angesehen (Lips et al., 2003). Im Rahmen von Sport oder ähnlich auch in der Schwangerschaft kann eine solche physiologische Anpassung beobachtet werden, bei der es zu einer exzentrischen Hypertrophie kommt, die nach heutigem Kenntnisstand nicht gesundheitsschädlich ist (Dickuth et al., 2004; Maron und Pelliccia, 2006).

Eine pathologische (maladaptive) Hypertrophie entsteht durch krankheitsinduzierende Stimuli und wird morphologisch unterschieden in konzentrische Hypertrophie mit erhöhter Wanddicke und erniedrigtem Ventrikelvolumen mit der Folge einer Abnahme der Wandspannung und der enddiastolischen Volumina sowie in exzentrische (dilatative) Hypertrophie mit Volumenzunahme und letztlich Abnahme der Wanddicken, welche einen Anstieg der Wandspannung und damit eine vermehrte Herzarbeit und eine damit ungünstigere energetische Situation zur Folge haben (Heineke und Molkentin, 2006).

Die Myokardhypertrophie kann kompensatorisch durch eine gestörte kardiale Pumpfunktion entstehen, kann diese aber auch erst induzieren, wie z.B. im Rahmen der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM), bei der ein angeborener Gendefekt zu einer meist asymmetrischen Myokardhypertrophie führt, die im Verlauf in eine verminderte Herzleistung mündet. Zusätzlich kann es im Rahmen einer Herzinsuffizienz zu weiteren morphologischen Veränderungen des Myokards kommen (kardiales Remodeling), wie z.B. zu einer Myokardfibrosierung, zur Apoptose

und Nekrose, die ihrerseits wiederum zu einer eingeschränkten Herzfunktion führen (Deschamps und Spinale, 2006; Wencker et al., 2003; Burlew und Weber, 2000).

Im Rahmen der Herzinsuffizienz gibt es zahlreiche Kompensationsmechanismen, wobei allerdings der Übergang von erfolgreicher Kompensation zur deletären Aktivierung dieser Mechanismen unscharf ist. Hierzu gehören die renale Salz- und Wasserretention, die neurohumorale Stimulation und die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden am Herzen und in Gefäßen. Letzteres mündet in eine Veränderung der Morphologie und Funktion der Organe, wie z.B. in eine Myokardhypertrophie. Durch solche Kompensationsmechanismen wird oftmals die in frühen Stadien grundsätzlich individuelle, heterogene Symptomatik zunächst abgemildert. Meist bestehen, je nach Stadium, belastungsabhängige rasche Ermüdbarkeit, Dyspnoe und Ödemneigung. Im weiteren Verlauf können die Kompensationsmechanismen die Symptomatik oftmals nicht mehr maskieren und es kann zu zunehmender Symptomatik, bis hin zur Dekompensation kommen (Mudd und Kass, 2008; Haider et al., 1998).

Die Symptomatik der Herzinsuffizienz entsteht einerseits durch ein Rückwärtsversagen mit Stauungssymptomen wie (je nach betroffenem Ventrikel) z.B. Knöchelödemen oder Asthma cardiale bis hin zum Lungenödem und Dyspnoe und andererseits durch ein Vorwärtsversagen mit Symptomen wie z.B. schneller Ermüdbarkeit, Verwirrtheit, Zyanose und Dyspnoe. Letztlich kann es zu einer völligen Dekompensation kommen, die im Endstadium zu einem kardiogenen Schock und zum Tod führen kann (Erdmann, 2009). Daneben ist die Herzinsuffizienz mit einem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod assoziiert (Mudd und Kass, 2008).

Grundsätzlich wird eine akute von einer chronischen Herzinsuffizienz unterschieden. Akute Herzinsuffizienzen entstehen plötzlich und häufig unter anderem durch Dekompensation einer bestehenden chronischen Herzinsuffizienz (akut dekompensierte Herzinsuffizienz), durch das akute Koronarsyndrom, hypertensive Notfälle, akute Herzklappen-Insuffizienzen, oder auch akute Herzrhythmusstörungen (Nieminen et al., 2005). Die chronische Herzinsuffizienz entwickelt sich über einen längeren Zeitraum, wie unter anderem durch eine koronare Herzkrankheit, oder durch chronische Druckbelastung wie z.B. im Rahmen einer Aortenklappenstenose oder eines arteriellen Hypertonus. Im Rahmen der Framingham-Offspring-Studie wurden die arterielle Hypertonie und der Myokardinfarkt als die wichtigsten und häufigsten Auslöser der Herzinsuffizienz ermittelt (Lloyd-Jones et al., 2002).

Die Herzinsuffizienz kann weiterhin in systolische und diastolische Insuffizienz unterschieden werden. Der systolischen Insuffizienz liegt primär ein Pumpversagen zugrunde, wie beispielsweise bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM), oder einem akuten Myokardinfarkt (Erdmann, 2009;

Lorell und Carabello, 2000). Bei der diastolischen Herzinsuffizienz ist die Kontraktionskraft normal, jedoch die adäquate Herzfüllung gestört, wie beispielsweise bei Schädigungen durch chronische Druckbelastung im Rahmen einer chronischen arteriellen Hypertonie, bei der HCM, der restriktiven Kardiomyopathie bei Speicherkrankheiten (RCM), der Pericarditis constrictiva, oder als Akutform bei der Perikardtampnade (Erdmann, 2009; Elliott und McKenna, 2004; Lorell und Carabello, 2000).

Eine Schweregrad-Einteilung der Herzinsuffizienz kann funktionell anhand der NYHA-Klassifikation erfolgen. Hierbei wird die symptomfreie Belastbarkeit des Patienten geprüft (The Criteria Committee of the New York Heart Association, 1964), jedoch sind hier neuere Klassifikationen im Vormarsch, die zusätzlich auch Risikoprofile berücksichtigen, wie z.B. die AHA-Klassifikation (Hunt et al., 2001; Bonow et al., 2005).

In Deutschland waren 2009 kardiologische Erkrankungen auf den ersten drei Plätzen der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes. Insgesamt verstarben 356.462 Menschen an Krankheiten des Kreislaufsystems (ICD-10-GM: I1-I99; DIMDI, 2010). Speziell an Herzinsuffizienz (ICD-10-GM: I50; DIMDI, 2010) verstarben 2009 48.954 Menschen in Deutschland, womit diese Erkrankung an Platz drei dieser Statistik steht (Abb. 1.1) (Statistisches Bundesamt 2010a). Die Mortalität der Herzinsuffizienz liegt ohne kausale Therapie bei etwa 60% (Bleumink et al., 2004).

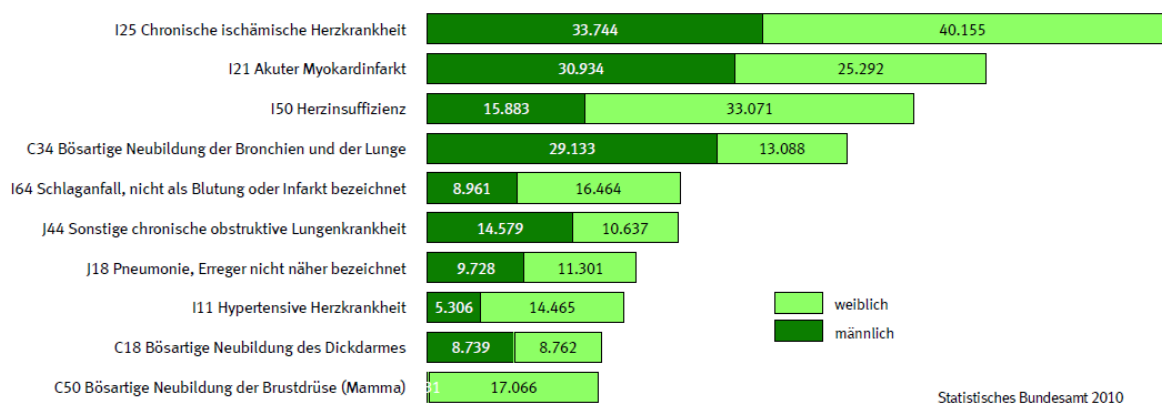


Abb. 1.1: Todesursachenstatistik für Deutschland 2009 des statistischen Bundesamtes. 2009 sind 48.954 Menschen an Herzinsuffizienz verstorben, was Platz 3 in der Statistik entspricht. Kardiale Todesursachen bilden die ersten drei Plätze der Statistik. (Statistisches Bundesamt 2010a, S. 3)

Die Herzinsuffizienz ist ein enormer Kostenfaktor für das Gesundheitssystem. Laut statistischem Bundesamt wurden 2006 insgesamt 17 Millionen Menschen stationär behandelt, davon 317.000

Menschen wegen Herzinsuffizienz, die damit 2006 den häufigsten Grund einer stationären Behandlung darstellte, gefolgt von Angina pectoris (301.000 Patienten) (Statistisches Bundesamt, 2008).

Die Kosten für die Behandlungen von Erkrankungen des Kreislaufsystems (ICD-10-GM: I1-I99; DIMDI, 2010) beliefen sich 2008 auf 36,97 Milliarden Euro, was ca. 14,5% der Gesamtgesundheitsausgaben von 254,28 Milliarden Euro entspricht (Statistisches Bundesamt, 2010b), dabei nahm die Herzinsuffizienz (ICD-10-GM: I50; DIMDI, 2010) ein Volumen von 3,23 Milliarden Euro ein, was 1,3% der Gesamtausgaben entspricht (Statistisches Bundesamt, 2010b).

In den letzten Jahren wurden enorme Fortschritte im Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse bei der Herzinsuffizienz und der Myokardhypertrophie erzielt, jedoch sind immer noch viele molekulare Mechanismen unzureichend verstanden. Auch in der Therapie der Herzinsuffizienz wurden deutliche Fortschritte erzielt. Zu der systolischen Herzinsuffizienz sind viele Studien und entsprechende Therapie-Leitlinien bekannt, während jedoch die Therapie der diastolischen Insuffizienz aktuell kaum erforscht ist. Um neue therapeutische Strategien und pharmakologische Targets zu finden, müssen die molekularen Regulationsmechanismen weiter erforscht werden.

1.2. Molekulare Mechanismen der Myokardhypertrophie

Die molekularen Mechanismen, die der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Insuffizienz zugrunde liegen, sind sehr komplex. Zahlreiche Signalwege und Interaktionen sind mittlerweile beschrieben. Eine verminderte kardiale Pumpleistung kann zu einer verminderten Organperfusion führen, welche wiederum Kompensationsmechanismen triggert. Hierzu gehören neurohumorale Mechanismen, wie die sympathoadrenerge Aktivierung, die Ausschüttung von ADH (Antidiuretisches Hormon, Vasopressin) und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Erdmann, 2009).

Die sympathoadrenerge Aktivierung führt über die Freisetzung von Katecholaminen zu einer Aktivierung adrenerger Rezeptoren, wie z.B. kardialer β -Adrenozeptoren oder gefäßständiger α -Adrenozeptoren (Vasokonstriktion). Die kardiale Stimulation führt zwar akut unter anderem zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens, jedoch führt eine chronische Stimulation zu einer Desensibilisierung und Verminderung der Anzahl der kardialen β_1 -Adrenozeptoren, so dass dieser

Kompensationsmechanismus im chronischen Verlauf versagen kann und die Herzarbeit sogar vermindert (Brodde, 1991; Bristow et al., 1986).

Die Ausschüttung von ADH, die Aktivierung des RAAS und die α -adrenerge Stimulation der Gefäße führen unter anderem zu einer Volumenretention, bzw. zu einer Vasokonstriktion, wodurch der Blutdruck erhöht wird, jedoch auch die Herzarbeit steigt. Dieser Mechanismus kann bei einer chronischen Aktivität sowie bei bereits insuffizienter Herzleistung ebenfalls zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und zur Ausbildung von Ödemen führen (Erdmann, 2009; Heineke und Molkentin, 2006).

Verschiedene der freigesetzten Transmitter, wie z.B. Katecholamine, oder Angiotensin-II, führen in Kardiomyozyten zu einer Aktivierung intrazellulärer Transduktionskaskaden. Hierdurch kommt es zum Beispiel zu einer Veränderung der Kontraktilität und zur Veränderung der Wachstumsregulation. Zu den wichtigsten Signalwegen im Rahmen der Entstehung und Regulation von Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie gehören unter anderem der ERK/MAPK-Signalweg und der Calcineurin/NFAT-Signalweg, welche Fokus dieser Arbeit sind.

1.2.1. Die MAPK-Signalwege

Die mitogen-activated-Proteinkinase-Signalwege (MAPK-Signalwege) bestehen aus Phosphorylierungskaskaden, die letztlich zur Aktivierung von Extracellulär-Signal-Regulated-Kinasen (ERK), c-Jun-N-terminal-Kinasen (JNK) und p38 führen (Widmann et al., 1999; Garrington und Johnson, 1999). Diese Effektoren phosphorylieren zahlreiche intrazelluläre Zielproteine, darunter auch prohypertrophe Transkriptionsfaktoren (Heineke und Molkentin, 2006) (Abb. 1.2).

Die MAP-Kinasen werden unter anderem durch kleine G-Proteine der Rho-Familie (Ras, Rac und Rho), Stress, Dehnung und ein Netzwerk aus MAPK-Kinasen und MAPKK-Kinasen reguliert (Abb. 1.2) (Heineke und Molkentin, 2006). Die durch Angiotensin-II oder durch α -adrenerge Katecholamine aktivierbare G_q -Proteine sind ebenfalls wichtige Aktivatoren von MAP-Kinasen, jedoch ist bisher nicht beschrieben, wie diese Verbindung genau vermittelt wird (Clerk und Sugden, 1999; LaMorte et al. 1993).

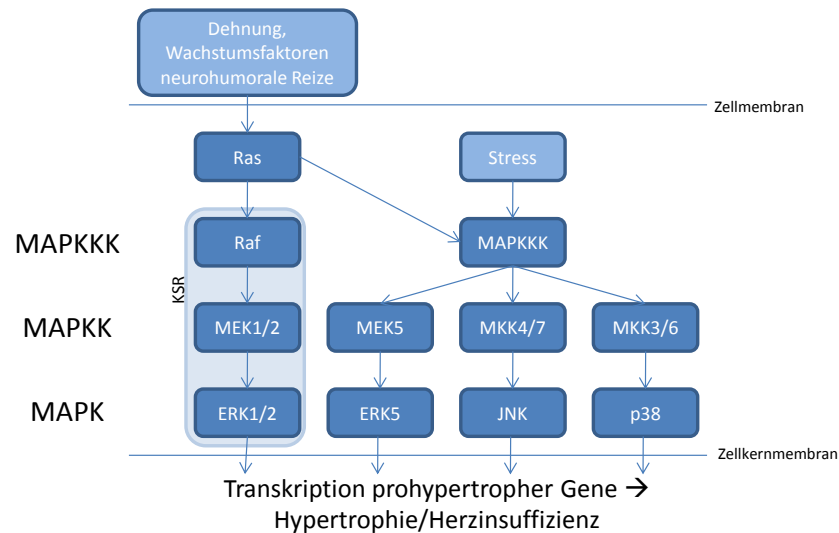


Abb. 1.2: Vereinfachtes, lineares Schema der MAPK-Signaltransduktionswege am Herzen. Das MAPK-System, besteht aus hierarchisch strukturierten Phosphorylierungskaskaden, die letztlich zu einer Änderung des Transkriptionsmusters zugunsten von Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz führen. Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Ras-Raf-MAPK-Signalweg. Die Interaktion von Raf, MEK und ERK ist durch das scaffolding-Protein KSR reguliert. ERK = Extracellular-Signal-Regulated-Kinase, JNK = c-Jun-N-terminal-Kinase, KSR = kinase suppressor of Ras, MAPK = mitogen-activated-Proteinkinase, MEK = MAP/ERK-Kinase, MKK = MAPK-Kinase, Raf = rapidly growing fibrosarcoma, Ras = Rat sarcoma

Bei der Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade spielt Ras (Rat sarcoma) eine wesentliche Rolle und ist ebenfalls wichtig bei der Regulation von Herzhypertrophie (Hunter et al., 1995). Ras ist ein membranständiges kleines G-Protein und wechselt stimulationsabhängig zwischen einem aktiven Zustand, indem es GTP-gebunden vorliegt und einem inaktiven Zustand, indem es GDP-gebunden vorliegt (Downward, 1996). Die Ras-Proteinfamilie besteht aus H-Ras, K-(A)Ras, K-(B)Ras und N-Ras (Barbacid, 1987). Durch Mikroinjektion von aktivierten Ras-Proteinen konnte eine zelluläre Hypertrophie in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert werden (Thorburn et al., 1993). Auch eine Kardiomyozyten-spezifisch gesteigerte Expression von konstitutiv aktivem H-Ras in transgenen Mäusen führte zu einer Herzhypertrophie und zu Herzinsuffizienz (Hunter et al., 1995). Mittlerweile sind zahlreiche Zielproteine von Ras bekannt, darunter u.a. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinasen rapidly growing fibrosarcoma (Raf) (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000; Avruch et al., 2001; Marais et al., 1997).

Raf-Proteine sind eine Kinasefamilie mit den Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1), die an der Signaltransduktion von Ras zum MEK/ERK-Signalweg (MAP/ERK-Kinase; Extracellular-Signal-Regulated-Kinase) beteiligt sind und in der Lage sind, MEK zu phosphorylieren. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur MEK-Aktivierung (Marais et al., 1997), wobei B-Raf die höchste MEK-Kinase-Aktivität besitzt, gefolgt von C-Raf (Pritchard et al., 1995). C-Raf,

bzw. B-Raf wird durch aktiviertes Ras an die Plasmamembran transloziert und aktiviert (Avruch et al., 2001; Morrison und Cutler, 1997). Harris et al. zeigten in Mäusen, die herzspezifisch dominant-negatives Raf-1 exprimierten, dass Raf-1 für die Entwicklung einer Hypertrophie essentiell ist. Die Tiere zeigten eine deutlich reduzierte Hypertrophie-Entwicklung im Vergleich zu Wildtypen nach TAC-Intervention (transaortic banding). Ebenfalls war die Menge an phosphoryliertem ERK in den transgenen Tieren sieben Tage nach TAC-Intervention deutlich reduziert im Vergleich zu den TAC-behandelten Wildtypen (Harris et al., 2004). Somit scheint C-Raf essentiell für die Aktivierung der ERK/MAPK-abhängigen Hypertrophie zu sein. Herzspezifische Raf-1-knockout-Mäuse entwickelten eine linksventrikuläre Dysfunktion und eine linksventrikuläre Dilatation ohne Ausprägung einer Myokardhypertrophie, allerdings war die MEK/ERK-Aktivität in diesem Modell unerwarteterweise nicht reduziert, was nahe legt, dass alternative MEK-Kinasen existieren und die MEK/ERK-Phosphorylierung komplexen Einflüssen unterliegt (Yamaguchi et al., 2004). Die Interaktion von Raf, MEK und ERK unterliegt ebenfalls einer komplexen Regulation, die unter anderem durch 14-3-3-Proteine und scaffolding-Proteine, wie zum Beispiel Kinase Suppressor of Ras (KSR) reguliert wird (Ritt et al., 2006; Kolch, 2005; Morrison, 2001).

Der Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung der MAPK-Signaltransduktion liegt auf den MAP-Kinasen ERK1/2, die direkt durch MAP/ERK-Kinasen (MEK) 1/2 aktiviert werden (Bueno et al., 2000; Garrington und Johnson, 1999) (Abb. 1.2). MEK1 und ERK1/2 spielen eine besonders große Rolle bei der Regulation der Herzhypertrophie (Heineke und Molkentin, 2006; Ueyama et al., 2000; Thorburn et al., 1994; Post et al., 1996; Ramirez et al., 1997). In transgenen Mäusen, die herzspezifisch MEK1 überexprimierten, konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Aktivierung von ERK1/2, sowie zu einer Ausbildung einer konzentrischen Herzhypertrophie führt, die nicht in eine Herzinsuffizienz mündet (Bueno et al., 2000). Auch eine adenoviral vermittelte, gesteigerte MEK1-Expression in kultivierten Kardiomyozyten führte zu einem gesteigerten Zellwachstum (Bueno et al., 2000). Die Funktion von ERK ist abhängig von dessen zellulärer Lokalisation. Durch eine mitogene Stimulation akkumuliert das aktivierte ERK für einige Minuten nukleär (Pouyssegur et al., 2002) und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, darunter Elk1, Msk1 und c-Myc, die bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie eine Rolle spielen (Bueno und Molkentin 2002; Zhong et al., 2006; Markou et al., 2004; Sharrocks, 2001). Lorenz et al. entdeckten einen komplexen Autophosphorylierungsmechanismus von ERK1/2 an Thr188, wodurch ERK1/2 in den Zellkern transloziert und seine Zielproteine aktiviert. Dieser Mechanismus führt zur Entwicklung einer Myokardhypertrophie (Lorenz et al., 2009)

Die ERK/MAPK-vermittelte Hypertrophie scheint zudem teilweise abhängig zu sein von einer NFAT-Aktivierung (Sanna et al., 2005). Sanna et al. zeigten, dass eine Calcineurin-Inhibition das MEK1-induzierte hypertrophe Wachstum im Herzen und in kultivierten Kardiomyozyten inhibiert.

Letztlich zeigen zahlreiche Studien, dass viele Verbindungen zwischen den einzelnen MAPK-Signalwegen und zwischen den MAP-Kinasen und anderen Signalkaskaden bestehen. Die genaue Regulation und Verbindung der einzelnen Signalwege ist aktuell nicht zufriedenstellend geklärt und lässt auf die Entdeckung neuer Zielstrukturen und neuer Therapieansätze hoffen.

1.2.2. Der Calcineurin/NFAT-Signalweg

Calcineurin ist eine Ca^{2+} -abhängige Serin/Threonin-Protein-Phosphatase, die eine zentrale Rolle bei der Regulation von hypertrophem Myokardwachstum spielt (Molkentin et al., 1998). Calcineurin ist ein Heterodimer aus einer katalytischen und Calmodulin-bindenden Untereinheit (Calcineurin A) und einer regulatorischen Untereinheit mit Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit (Calcineurin B) (Wilkins und Molkentin, 2004; Klee et al., 1988). Calcineurin wird durch die Calcineurin-B-Untereinheit und Calmodulin reguliert, wobei beide strukturell ähnlich, jedoch funktionell unterschiedlich sind (Wilkins und Molkentin, 2004; Klee et al., 1988). Dabei ist die notwendige Ca^{2+} -Konzentration für eine Aktivierung niedriger, je höher die Calmodulin-Konzentration ist und ebenso ist eine niedrigere Calmodulin-Konzentration notwendig, je höher die Ca^{2+} -Konzentration ist (Stemmer und Klee, 1994).

Zielproteine von Calcineurin sind die Transkriptionsfaktoren der nuclear-factor-of-activated-T-cells-Familie (NFAT). NFAT liegt phosphoryliert im Zytosol vor und transloziert nach Dephosphorylierung in den Zellkern, wo die Transkription prohypertropher Gene induziert wird (Abb. 1.3) (Wilkins und Molkentin, 2004; Molkentin et al., 1998).

In ventrikulären Kardiomyozyten existieren vier NFAT-Isoformen (NFATc1 (NFAT2, NFATc), NFATc2 (NFAT1, NFATp), NFATc3 (NFAT4, NFATx) und NFATc4 (NFAT3)), die Calcineurin-abhängig in den Zellkern translozieren können (van Rooij et al., 2002). Alle Isoformen scheinen spezifische Funktionen zu regulieren, wobei NFATc3 eine besonders wichtige Funktion bei der Regulation myokardialer Hypertrophie zu spielen scheint (Wilkins et al., 2002; van Rooij et al., 2002). Wilkins et al. zeigten, dass NFATc3-knockout-Mäuse unter verschiedenen Stimulationen eine signifikant mildere Hypertrophie ausbilden als ihre Wildtypgeschwister (Wilkins et al., 2002). NFATc1-

knockout-Mäuse versterben *in utero* durch Herzklappen-Malformationen (Ranger et al., 1998; de la Pompa et al., 1998).

Molkentin et al. konnten 1998 zeigen, dass transgene Mäuse, die herzspezifisch aktiviertes Calcineurin überexprimieren, eine deutliche Myokardhypertrophie und kurz darauf eine Herzinsuffizienz entwickeln. Auch eine herzspezifisch gesteigerte Expression von konstitutiv aktivem NFATc4 führte in transgenen Mäusen zu einem vergleichbaren Phänotyp (Molkentin et al., 1998). Allerdings konnte in NFATc4-knockout-Mäusen kein Unterschied in der Entwicklung kardialer Hypertrophie festgestellt werden (Wilkins et al., 2002). Analog wurde in Calcineurin-knockout-Mäusen und in dominant negativen Calcineurin-Mäusen eine weitgehende Inhibition der Entwicklung einer Myokardhypertrophie beschrieben (Bueno et al., 2002; Zou et al., 2001). NFAT und Calcineurin scheinen demnach wichtige Mediatoren der Myokardhypertrophie zu sein (van Rooji et al., 2002; Wilkins et al., 2002; Molkentin et al., 1998).

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg wird durch zahlreiche Proteine reguliert, die direkt NFAT phosphorylieren können, darunter MAP-Kinasen, GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β), PKA (Proteinkinase A) und Kinasen der DYRK-Familie (dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases) (Kuhn et al., 2009; Gwack et al., 2006; Grebe et al., 2011) oder durch Proteine, welche die NFAT-Phosphorylierung induzieren können, wie z.B. p38 und JNK (Liang et al., 2003; Braz et al., 2003) (Abb. 1.3). Folglich bestehen einige Querverbindungen zu den MAPK-Signalwegen. So erhöht z.B. eine Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs die Transkriptionsaktivität von NFAT (Sanna et al., 2005).

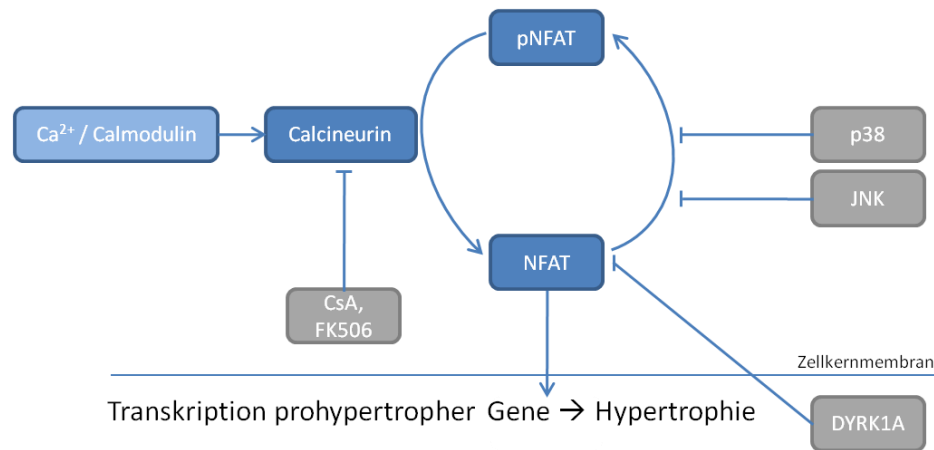


Abb. 1.3: Vereinfachtes Schema der Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionswege am Herzen. Die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert den zytosolisch vorliegenden Transkriptionsfaktor NFAT, woraufhin dieser in den Zellkern transloziert und Hypertrophie-assoziierte Gene aktiviert. Der Signalweg ist pharmakologisch inhibierbar durch CsA und FK506. Endogen wird der Signalweg u.a. durch DYRK, p38 und JNK inhibiert. CsA = Ciclosporin A, DYRK1A = dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A, FK506 = Tacrolimus, JNK = c-Jun-N-terminal-Kinase, NFAT = nuclear factor of activated T-cells

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg wird weitgehend als Signalweg der maladapten Myokardhypertrophie angesehen und ist daher im Fokus einer möglichen Therapie und Prävention (Heineke und Molkentin, 2006). Durch pharmakologische Inhibition von Calcineurin mittels Ciclosporin A und FK506 (Tacrolimus) gelang es in einigen Studien, eine Myokardhypertrophie zu verhindern (Bueno et al., 2002; Molkentin et al., 1998; Sussman et al., 1998; Shimoyama et al., 2000), jedoch sind hohe Konzentrationen der Wirkstoffe erforderlich. Da beide Wirkstoffe gewebeunspezifisch sind, stellen sich pharmakologisch genutzte Hauptwirkungen, wie zum Beispiel eine T-Zell-vermittelte Immunsuppression ein, was seit vielen Jahren im Rahmen der Transplantationsmedizin und bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen im Fokus der Behandlung steht, wobei hierzu deutlich geringere Konzentrationen notwendig sind (Liu et al., 1991). Zusätzlich sind weitere starke Nebenwirkungen, wie Nephrotoxizität und Neurotoxizität der Wirkstoffe bekannt. Letztlich ist also eine pharmakologische Beeinflussung der Myokardhypertrophie mittels Ciclosporin A oder Tacrolimus nicht möglich, sodass andere Inhibitoren gefunden werden müssen.

1.3. Das Calcineurin and Ras binding protein (*Carabin*)

Carabin wurde 2007 durch Pan et al. erstmalig beschrieben. Sie suchten nach unbekanntem Bindungspartnern von Calcineurin. Hierzu wurde ein Yeast-2-Hybrid-Screen einer humanen T-Zell-cDNA-Bank (prey-Protein, Beuteprotein) mit einer gekürzten und katalytisch inaktiven Calcineurin-Mutante als bait-Protein (Köderprotein) verwendet, wobei zwei Bindungspartner entdeckt wurden. Zum einen das bereits gut charakterisierte Protein Cabin 1 und zum anderen das Protein Carabin. Diese Interaktion wurde ebenfalls mithilfe eines Mammalian-2-Hybrid-Systems in Jurkat-T-Zellen unter Verwendung der katalytischen Calcineurin-Untereinheit als bait-Protein und des vollständigen Carabin-Proteins als prey-Protein bestätigt (Pan et al., 2007).

Aufgrund seiner Bindungsfähigkeiten wurde das entdeckte Protein als Carabin (Calcineurin and Ras binding) benannt. Carabin besitzt eine N-terminale Ras-GAP-Domäne (Ras-GTPase-activating-Domäne), welche die GTP-(Guanosintriphosphat)-Hydrolyseaktivität von Ras erhöht, und eine C-terminale Calcineurin-bindende Domäne (Pan et al., 2007).

Die höchste Expression von Carabin wurde in Milzgewebe und in Leukozyten des peripheren Blutes gemessen (Pan et al., 2007). Das Carabin-Gen ist bei der Maus auf Chromosom 17 und beim Menschen auf Chromosom 11 lokalisiert. Das humane Carabin besteht aus 446 Aminosäuren und ist zu 88% identisch zu der Mausvariante, wobei insbesondere der für die Ras-GAP-Aktivität essentielle Argininfinger (Arg 141) bei beiden Homologen identisch vorhanden ist (Pan et al., 2007).

Pan et al. zeigten mithilfe eines Enzym-Aktivitäts-Assays, unter Verwendung von RII-Phosphopeptid als Substrat, dass Carabin die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin dosisabhängig inhibiert ($IC_{50}=151\text{nM}$) (Pan et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Carabin-Expression in Jurkat-T-Lymphozyten eine durch Ionomycin induzierte NFAT-Dephosphorylierung und analog dazu auch eine Ionomycin-induzierte NFAT-Translokation in den Zellkern inhibieren kann (Pan et al., 2007). Mithilfe von Luciferase-Reportergen-Assays konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Calcineurin-abhängige Synthese von Interleukin 2 (IL-2) in Jurkat-T-Lymphozyten durch eine gesteigerte Carabin-Expression dosisabhängig reduziert werden konnte (Pan et al., 2007).

Zusätzlich inhibiert Carabin in T-Lymphozyten das kleine G-Protein Ras durch eine Steigerung der GTP-Hydrolyseaktivität von Ras, die durch die Ras-GAP-Domäne in Carabin vermittelt wird (Pan et al., 2007). Mithilfe eines Luciferase-Reportergen-Assays wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Carabin-Expression ein IL-2-Luciferase-Signal signifikant reduziert (Pan et al., 2007). Weiterhin wurde die GTP-Hydrolyse-Aktivität von Ras in Jurkat-T-Lymphozyten untersucht und festgestellt,

dass diese Aktivität durch eine Zugabe von rekombinantem Carabin dosisabhängig reduziert werden kann (Pan et al., 2007). Eine durch TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) in Kombination mit Ionomycin induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in Jurkat-T-Lymphozyten konnte durch eine gesteigerte Expression von N-terminalem Carabin (Ras-GAP-Domäne) ebenfalls vermindert werden (Pan et al., 2007).

Die Promotorregion des Carabin-Gens weist mehrere NFAT-Bindungsstellen auf. Die Carabin-Expression konnte durch Stimulation des Calcineurin/NFAT-Signalweges gesteigert werden, während dieser Effekt bei gleichzeitiger Ciclosporin-A-vermittelter Calcineurin-Inhibition ausblieb. Carabin fungiert demnach als negativer Feedback-Inhibitor von Calcineurin (Datta et al., 2009; Pan et al., 2007).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

In den vorigen Abschnitten wurde die entscheidende Rolle der MAPK-Signalwege und des Calcineurin/NFAT-Signalweges für die Regulation kardialer Hypertrophie und Insuffizienz dargestellt. Ebenso wurde die inhibitorische Wirkung von Carabin auf die MAPK-Signalwege, insbesondere auf den ERK/MAPK-Signalweg und den Calcineurin/NFAT-Signalweg in T-Lymphozyten erläutert. Die Rolle von Carabin in Kardiomyozyten wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Carabin auf die Wachstumsregulation von Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* analysiert. Folgende Hypothese wurde untersucht: Carabin kann die Entwicklung kardialer Hypertrophie durch duale Inhibition des ERK/MAPK-Signalweges und des Calcineurin/NFAT-Signalweges antagonisieren.

Dazu wurden die folgenden zentralen Fragestellungen bearbeitet:

1. Hemmt Carabin *in vitro* den Calcineurin/NFAT-Signalweg und den ERK/MAPK-Signalweg in kultivierten Kardiomyozyten (*in vitro*) und beeinflusst Carabin so die Entwicklung zellulärer Hypertrophie?

Mittels adenoviraler Transduktion sollte in isolierten Rattenkardiomyozyten eine gesteigerte Carabin-Expression erzielt und so die Wirkung von Carabin auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg und auf den ERK/MAPK-Signalweg untersucht werden. Weiterhin sollte durch Stimulation ein

hypertrophes Wachstum erzielt und durch gleichzeitige adenoviral vermittelte Carabin-Expressionssteigerung die Wirkung von Carabin auf die Entwicklung dieses Wachstums untersucht werden.

2. Bewirkt eine verstärkte Carabin-Expression *in vivo* eine Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalwegs und des ERK/MAPK-Signalwegs in Kardiomyozyten und beeinflusst Carabin so die Entwicklung kardialer Hypertrophie *in vivo*?

Die Wirkung von Carabin *in vivo* sollte in Carabin-transgenen Mäusen untersucht werden. Auch hier sollte der Einfluss von Carabin auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg und auf den ERK/MAPK-Signalweg untersucht werden. Ebenfalls sollte mithilfe von Implantation osmotischer Minipumpen eine Angiotensin-II-vermittelte zelluläre Myokardhypertrophie erzielt und so die Wirkung von Carabin auf die Entwicklung kardialer Hypertrophie geprüft werden.

3. Wird die Carabin-Expression in Kardiomyozyten reguliert?

Um eine mögliche Regulation der Carabin-Expression zu prüfen, sollte in Calcineurin-transgenen Mäusen und in Angiotensin-II-stimulierten Mäusen die Carabin-Expression untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
100x Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Aceton	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid 40%	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Angiotensin-II	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	Roche, Mannheim
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merk, Darmstadt
Citratpuffer (pH 6) (Target Retrieval Solution)	Dako, Hamburg
Creatine	Sigma-Aldrich, München
Cytosin- β -D-arabinofuranosid (AraC)	Sigma-Aldrich, München
DAPI	Sigma-Aldrich, München
D-(+)-Glukose	AppliChem, Darmstadt
D,L-Carnitinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
D,L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Entellan® Einschlussmittel	Omikron, Neckarwestheim
Entwicklerlösung	Kodak, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fixierlösung	Kodak, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Sigma-Aldrich, München
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isofluran	EurimPharm Arzneimittel GmbH, Piding
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Laminin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Medium 199 (M199)	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraffin	MEDITE, Burgdorf
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Phenylephrinhydrochlorid (PE)	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Precision Plus Blue, All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Taurin	Sigma-Aldrich, München
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tryptan-Blau-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, München
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, München
WGA (wheat germ agglutinin)	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München

2.1.2. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood, USA
Protease XIV	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Roche, Mannheim

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96-well-Mikrotiterplatten, klar	Nunc, Wiesbaden
Auslaufpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einbetttschälchen	MEDITE, Burgdorf
Falcon™ 4-well CultureSlides	Becton Dickinson, Heidelberg

Falcon™ Tube, 15 und 50mL	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier	Whatman, Dassel
Glas- und Schliifwaren	Schott, Mainz
Mikroosmotische Pumpen (Alzet® 1002)	Charles River Laboratories, Sulzfeld
Neubauer-Improved-Zählkammer	LO – Laboroptik, Bad Homburg
Objektträger und Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Omnican® 40	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Protran® Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
Sterilfilter	Milipore, Bad Schwalbach
Zellkulturschale 35mm	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschale 60mm, 100mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Biotech., Rockford, USA
DirectPCR tail reagent	Peqlab, Erlangen
Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate	Milipore, Bad Schwalbach
SuperPicture™ Kit (DAB, Broad Spectrum)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Biotech., Rockford, USA

2.1.5. Lösungen und Medien

2.1.5.1. Lösungen für die Zellisolation

Lösung	Zusammensetzung
Kollagenaselösung für die Isolation adulter Rattenkardiomyozyten	60mM Taurin 8mM D,L-Glutaminsäure 2mM D,L-Carnitin 1,3mg/mL Collagenase II 26µg/mL Protease XIV 0,025mM CaCl ₂ ad 1x Tyrodelösung ohne Ca ²⁺ pH 7,54
10x Tyrodelösung	137mM NaCl 5,4mM KCl 1,2mM MgSO ₄ 1,2mM Na ₂ HPO ₄ 20mM HEPES ad ddH ₂ O
1x Tyrodelösung mit Kalzium	1M CaCl ₂ ad 1x Tyrodepuffer ohne Kalzium
1x Tyrodelösung ohne Kalzium	10% 10x Tyrodelösung 2,7g/L Glukose 1% 100x Penicillin/Streptomycin ad ddH ₂ O
Verdaulösung für die Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten	0,2% Trypsin 0,1% Collagenase ad PBS
Stopplösung	1M CaCl ₂ 2% (w/v) Albuminfraktion V 6µM BDM ad 1x Tyrodepuffer ohne Kalzium

2.1.5.2. Lösungen für die eukaryontische Zellkultur

Lösung	Zusammensetzung
Medium für adulte Rattenkardiomyozyten	Medium 199 (M199) 5mM D,L-Carnitin 5mM Creatin 5mM Taurin 1% (v/v) 100x L-Glutamin 1% (v/v) 100x Penicillin/Streptomycin
Medium für neonatale Rattenkardiomyozyten ohne FCS	4 Teile DMEM 1 Teil Medium 199 (M199) 1% (v/v) 100x L-Glutamin 1% (v/v) 100x Penicillin/Streptomycin
Medium für neonatale Rattenkardiomyozyten mit FCS	4 Teile DMEM 1 Teil Medium 199 (M199) 10% (v/v) FCS 1% (v/v) 100x L-Glutamin 1% (v/v) 100x Penicillin/Streptomycin
Gelatinelösung	2% (w/v) Gelatine ad 0,1N HCl

2.1.5.3. Lösungen für den Western-Blot

Lösung	Zusammensetzung
Laemmli-Ladepuffer	312,5mM Tris/HCl pH 6,8 50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 150mM DTT 5mM EDTA 0,05% (v/v) Bromphenolblau ad ddH ₂ O

Lysepuffer für Zellen/Gewebe	1% (v/v) IGEPAL® CA-630 10% (v/v) Glycerol 137mM NaCl 20mM Tris pH 7,4 10mM EDTA pH 8,0 1mM EGTA pH 7,0 20mM NaF 1mM Natriumorthovanadat 1mM Natriumpyrophosphat 50mM β -Glycerophosphat 4 μ g/mL Aprotinin 4 μ g/mL Leupeptin 4 μ g/mL Pepstatin A 1mM PMSF ad ddH ₂ O
5% Milchpuffer	5% Magermilchpulver ad TBS-Tween Waschpuffer
1x SDS-PAGE-Laufpuffer	1 Teil 5x SDS-PAGE-Laufpuffer 4 Teile ddH ₂ O
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	125mM Tris Base 96mM Glycin 0,5% (w/v) SDS ad ddH ₂ O
Sammelgelpuffer (4x Tris/SDS, pH 6,8)	0,5M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS ad ddH ₂ O
10x TBS	0,2M Tris 2M NaCl pH 7,5 ad ddH ₂ O
TBS-Tween Waschpuffer	1 Teile 10x TBS 9 Teile ddH ₂ O 0,1% Tween 20

1x Transferpuffer	20% (v/v) 5x Transferpuffer ohne Methanol 20% (v/v) Methanol 1% (w/v) SDS ad ddH ₂ O
5x Transferpuffer ohne Methanol	163mM Tris Base 96mM Glycin ad ddH ₂ O
Trenngelpuffer (4x Tris/SDS, pH 8,8)	1,5M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS ad ddH ₂ O

2.1.6. Adenoviren

Adenovirus	Präparationsdatum	Physikalische Aktivität [pfu/mL]
Ad-Balt-CMV βgal (Ad-lacZ)	28.01.2002	9,9 x 10 ¹⁰
Ad-Calcineurin	24.07.2007	1,44 x 10 ¹¹
Ad-Carabin-Flag	09.07.2007	1,64 x 10 ¹¹
Ad-NFATc3-GFP	23.05.2008	1,24 x 10 ¹¹

2.1.7. Tiere

Tier	Bezugsquelle
Calcineurin-transgene Mauslinie (FVB/N)	Arbeitsgruppe J. Molkentin
Carabin-transgene Mauslinien (FVB/N)	Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen
Wistar Ratten	Tierzucht, Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung, Universitätsmedizin Göttingen

Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55 ± 5 % relativer Luftfeuchtigkeit mit uneingeschränktem Zugang zu Trinkwasser und Nahrung gehalten. Das Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung, Inkubationszeit	Bezugsquelle
anti-alpha-Aktinin (A7811), monoklonaler AK, Maus	IF*: 1:200, 1h	Sigma-Aldrich, München
anti-Carabin (PSC-4267), polyklonaler AK, Kaninchen	1:2.000, 2h IF*: 1:100 - 1:200, 1h IH**: 1:200 - 1:50, 1.5h	Axxora Deutschland, Lörrach
anti-ERK1/2 (#9102), polyklonaler AK, Kaninchen	1:3.000, 2h	New England Biolabs, Bad Schwalbach
anti-phospho-ERK1/2 (#9106), monoklonaler AK, Maus	1:3.000, 2h	New England Biolabs, Bad Schwalbach
anti-Flag M2 (F3165), monoklonaler AK, Maus	1:10.000, 2h IF*: 1:100 - 1:200, 1h IH**: 1:500 - 1:200, 1,5h	Sigma-Aldrich, München
anti-GAPDH, monoklonaler AK, Maus	1:40.000, 1h	Biotrend Chemikalien, Köln
anti-MEK1/2 (#9122), polyklonaler AK, Kaninchen	1:3.000, 2h	New England Biolabs, Bad Schwalbach
anti-phospho-MEK1/2 (#9154), monoklonaler AK, Kaninchen	1:3.000, 2h	New England Biolabs, Bad Schwalbach
anti-pNFAT4 (Ser165) (ab59204), polyklonaler AK, Kaninchen	1:200 - 1:1.000, 2h - über Nacht	Abcam, Cambridge, UK
anti-pNFATc4 (Ser237) (sc- 32989), polyklonaler AK, Kaninchen	1:200 - 1:1.000, 2h - über Nacht	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-pNFATc4 (Ser281/285) (sc-32987), polyklonaler AK, Kaninchen	1:200 - 1:1.000, 2h - über Nacht	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-pNFATc4 (Ser334) (sc-32988), polyklonaler AK, Kaninchen	1:200 - 1:1.000, 2h - über Nacht	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-pNFATc3 (Ser344) (sc-32983), polyklonaler AK, Kaninchen	1:200, 2h	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

*IF = Immunfluoreszenz

**IHC = Immunhistochemie

2.1.8.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung, Inkubationszeit	Bezugsquelle
Anti-mouse IgG, Cy3-linked Antibody	IF*: 1:600, 1h	Jackson ImmoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase-linked whole Antibody (from sheep)	1:10.000, 1h	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-rabbit IgG, Horseradish peroxidase-linked whole Antibody (from donkey)	1:10.000, 1h	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-rabbit IgG, Cy3-linked Antibody	IF*: 1:600, 1h	Jackson ImmoResearch Laboratories, West Grove, USA

*IF = Immunfluoreszenz

2.1.9. Sterilisationsverfahren

Alle Gebrauchswaren und Lösungen wurden bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert, bzw. über Nacht bei 220°C sterilisiert. Alle hitzeempfindlichen Lösungen wurden steril filtriert.

2.1.10. Software

Software	Hersteller	Verwendung
Alpha Ease FC (Version 4.1.0)	AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA	Densitometrische Auswertungen
AxioVision (Version 4.8)	Carl Zeiss, Hamburg	Fluoreszenzmikroskopie
GraphPad Prism® (Version 5.01)	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA	Statistische Auswertungen
ImageJ (Version 1.43u)	http://rsb.info.nih.gov/ij/	Zellvermessungen

2.1.11. Geräte

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Durchlichtmikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Echokardiographie-Gerät Vevo 660	VisualSonics, Toronto, Kanada
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Hamburg
Geldokumentationssystem (Multimage™ Light Cabinet)	AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA
Homogenisator (Micra)	ART Labortechnik, Müllheim
Inkubator Thermo Scientific (Heraeus®)	Perbio Science Deutschland, Bonn
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Hamburg
LQuant Universal Microplate- Spektralphotometer	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Magnetrührer (RCT basic)	IKA® Werke, Staufen
Mikrozentrifuge (5415 R)	Eppendorf, Hamburg
Mini Trans-Blot® Elektrophorese Transfer- Kammer	Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter (Calimatik)	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm-Prozessor (SRX-101 A)	Konika Minolta, München

SDS-PAGE System Mini-PROTEAN® II	Bio-Rad Laboratories, München
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5810 R)	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Tiefkühlschrank (-86°C)	SANYO, München
Waagen	Sartorius, Göttingen

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Die Isolation neonataler ventrikulärer Rattenkardiomyozyten erfolgte aus neonatalen Wistar-Ratten, die maximal 2 Tage alt waren und aus einem Wurf stammten. Ein solcher Wurf bestand meistens aus 10 bis 14 Tieren und stammte aus der Tierzucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß §4 TierSchG („Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“) und wurde dementsprechend, über den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen, der zuständigen Landesbehörde gemeldet.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und anschließend zügig auf einer Styroporunterlage fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Danach wurde der Thorax mit sterilisiertem Material eröffnet und das Herz auf Höhe der Ventilebene abgetrennt und entnommen.

Die Herzen wurden in einem Becherglas mit 1xPBS-Lösung gesammelt, welches anschließend in eine Sterilbank überführt wurde. Die Herzen wurden dann in einer 10-cm-Zellkulturschale in 3mL Verdaulösung (0,2% Trypsin und 0,1% Collagenase in PBS) mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Die Suspension wurde danach vollständig in einen 25-mL-Erlenmeyerkolben überführt. Nach Spülen der Zellkulturschale mit weiteren 5mL der Verdaulösung und anschließender Zugabe zu der Suspension, erfolgte zunächst ein Vorverdau. Hierzu wurde die Suspension in dem Erlenmeyerkolben mit einem Rührfisch über 9 min auf einer magnetischen Heizplatte bei 37°C und 180rpm inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und verworfen.

Nun folgten vier bis fünf Verdauzyklen, je nach Anzahl der Herzen. Zum Verdau wurden vor jedem Zyklus, ebenfalls abhängig von der Anzahl der Herzen, 10-15mL der Verdaulösung zugegeben. Anschließend wurde die Suspension auf der magnetischen Heizplatte für 14 min bei 37°C unter Rühren bei 180rpm inkubiert. Während dieser Inkubationen sollten die Zellen aus ihrem Verband gelöst werden. Nach der Inkubation wurde der Überstand in ein vorbereitetes 50-mL-Falcon-Röhrchen überführt, welches zuvor mit 37°C warmem Kulturmedium (DMEM:M199 (4:1) + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS) befüllt wurde. Der Suspension in dem Erlenmeyerkolben wurde dann frische Verdaulösung zugegeben und ein neuer Verdauzyklus eingeleitet. Die Falcon-Röhrchen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Abschluss der 4-5 Verdauzyklen verwahrt.

Nach Abschluss der Verdauzyklen wurden sichtbare Gewebereste aus den Falcon-Röhrchen entfernt und anschließend wurden die Falcon-Röhrchen mit der gewonnenen Zellsuspension 10 min bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die entstandenen Zellpellets wurden in insgesamt 20mL Nährmedium (DMEM:M199 (4:1) + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS) resuspendiert und in einem der Falcon-Röhrchen gesammelt. Da die Zellsuspension auch andere im Herzgewebe enthaltene Zellen als Kardiomyozyten enthält (insbesondere Fibroblasten), wurde die Zellsuspension im nächsten Schritt auf zwei 10-cm-Zellkulturschalen aufgeteilt und für 45 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit sollten sich möglicherweise enthaltene Fibroblasten an die Zellkulturschalen anheften und somit der Fibroblasten-Anteil der Suspension minimiert werden. Anschließend wurde die Suspension wieder in einem 50-mL-Falconröhrchen gesammelt. Um die trotzdem verbliebenen Fibroblasten in ihrem Wachstum zu inhibieren wurde dem Kulturmedium Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC) als Fibroblasteninhibitor zugefügt.

Bevor die Zellen nun für die Kultivierung ausplattiert werden konnte, wurde die Zellkonzentration der Suspension mithilfe einer Neubauer-Improved-Zellzählkammer bestimmt. Die isolierte Zellmenge belief sich in der Regel auf insgesamt 8 bis 12 Millionen Zellen, je nach Anzahl der Tiere.

2.2.1.2. Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Die isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden je nach geplantem Versuch auf Gelatinebeschichteten Zellkulturslides, oder 35- oder 60-mm-Zellkulturschalen in Kulturmedium (DMEM:M199 (4:1) + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS) ausplattiert.

Zur Gelatinebeschichtung wurde eine steril-filtrierte 2%ige Gelatinelösung (in 0,1 N HCl) verwendet, die zuvor für mindestens 30 min auf die entsprechenden Slides, bzw. Schalen aufgegeben wurde.

Je nach Versuch wurden die folgende Kulturmedium- und Zellmengen verwendet:

	Menge an Kulturmedium [mL]	Ausplattierte Zellzahl
Zellkulturslides	1	50.000
35-mm-Zellkulturschale	2	100.000
60-mm-Zellkulturschale	4	500.000 – 1.000.000

Nach dem Ausplattieren wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium auf serumfreies DMEM:M199 (4:1) (+ 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin) gewechselt. Im Anschluss daran erfolgte ggf. die adenovirale Transduktion (2.2.1.4). Hiernach wurden die Zellen je nach Versuch weitere 48 bis 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um dann im Rahmen des anschließenden Versuches weiterverarbeitet werden zu können.

2.2.1.3. Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten

Die Isolation adulter ventrikulärer Rattenkardiomyozyten erfolgte aus adulten, weiblichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 250g. Die Tiere stammten aus der Tierzucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß §4 TierSchG („Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“) und wurde dementsprechend, über den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen, der zuständigen Landesbehörde gemeldet.

Zur Gewinnung isolierter Rattenkardiomyozyten wurde eine modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage verwendet.

Die Tiere wurden mithilfe von Isofluran-Inhalation (20 µL/g KG) anästhesiert, sodass anschließend zügig der Thorax eröffnet und das Herz freipräpariert werden konnte. Nun wurden 625 I.E. (Internationale Einheiten) Heparin in das linke Atrium injiziert und das Herz danach mit einem langen Aortenstumpf entnommen. Das Restblut im Herzen wurde in einem Becherglas mit eiskühler, kalziumhaltiger Tyrodelösung (1,25mM Kalzium) ausgespült. Danach wurde in den Aortenstumpf eine Kanüle eingeführt und das Herz an der Langendorff-Perfusionsapparatur aufgehängt. Durch eine Pumpe wurde das Herz nun retrograd perfundiert (Langendorff-Perfusion) (Marsh, 1979). Das Prinzip beruht auf Oscar Langendorff der erkannte, dass die Herzfunktion durch eine retrograde Perfusion über die Aorta ascendens mit einer oxygenierten und nährstoffangereicherten Lösung aufrecht erhalten werden kann. Durch die retrograde Perfusion wird die Aortenklappe verschlossen und konsekutiv die Koronargefäße perfundiert (Langendorff, 1895).

Zur Perfusion wurde 37°C warme und mit 100% O₂ begaste Lösungen mit einer Flussrate von 8-10mL/min verwendet. In der ersten Phase wurde eine kalziumhaltige Tyrodelösung verwendet, bis kräftige und regelmäßige Herzaktionen erkennbar waren. Dann wurde über 5 min eine kalziumfreie Tyrodelösung verwendet, unter der die Herzfunktion allmählich vollständig sistierte. Als nächstes wurde über 15 bis 20 min eine kollagenasehaltige Lösung zur Perfusion verwendet.

Die Konsistenz des Herzens wurde weicher, sodass die Ventrikel nach der Perfusion abgetrennt werden konnten. Diese wurden mit der aufgefangenen Kollagenaselösung in einen Erlenmeyerkolben gegeben und zerteilt.

Das Gewebe wurde nun in dem Erlenmeyerkolben 20 min bei 37°C und 200 U/min schüttelnd inkubiert, um den Zellverband aufzulösen. Durch Auf- und Abpipettieren des verbleibenden Gewebes wurden weitere Zellen aus ihrem Verband gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde nun durch ein Nylonnetz gefiltert und anschließend mit einer kalziumhaltigen Tyrodelösung (0,125mM Kalzium) im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Im nächsten Schritt wurde die Sedimentation der Zellen abgewartet und anschließend die Kollagenaselösung abgenommen. Danach folgten mehrere Waschvorgänge der Zellen mit Tyrodelösungen mit ansteigenden Kalziumkonzentrationen (0,125mM; 0,25mM; 0,5mM; 1mM). Nach der Sedimentationsphase des letzten Waschvorgangs wurden die Zellen in M199-Medium mit einem Zusatz von 6% Albumin überführt.

Im letzten Schritt erfolgte die Zellzählung mithilfe einer Neubauer-Improved-Zählkammer. Hierzu wurden 40µL der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Tryptan-Blau-Lösung gefärbt, um eine bessere Beurteilung der Morphologie und Vitalität der Zellen zu ermöglichen. Die isolierte Zellmenge belief sich in der Regel auf insgesamt 2,5 bis 4 Millionen Zellen. Das Verhältnis von intakten Zellen zu der mikroskopisch sichtbaren Gesamtzellzahl betrug durchschnittlich ca. 70%.

2.2.1.4. Kultivierung ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten

Für die Kultivierung von adulten ventrikulären Rattenkardiomyozyten wurden 3-cm-Zellkulturschalen verwendet, die zuvor mit Laminin beschichtet wurden. Hierzu wurde eine Laminin-Lösung (1:100 in M199) auf die entsprechenden Schalen gegeben und diese anschließend für 30-45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen ausplattiert. Hierzu wurden je nach Versuch 200.000 bis 250.000 Zellen in jeweils 2,5mL Kulturmedium (Medium für adulte Kardiomyozyten) verwendet.

Im Anschluss erfolgten die adenovirale Transduktion und eine 4stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und pro Schale jeweils 4mL frisches Kulturmedium (Medium für adulte Kardiomyozyten) aufgegeben. Durch den Mediumwechsel wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt und die Virustransduktion terminiert. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und konnten danach für den jeweilig geplanten Versuch weiterverarbeitet werden.

2.2.1.5. Adenoviraler Gentransfer isolierter Rattenkardiomyozyten

Mithilfe des adenoviralen Gentransfers konnte eine transiente Transduktion erzielt und hierüber gezielte Steigerungen von Protein-Expressionen erreicht werden.

Die jeweils notwendige Virusmenge wird in MOI (multiplicity of infection) angegeben, wobei MOI definiert ist, als die Menge aktiver Viruspartikel pro Zelle. Die zugrundeliegende Formel zur Berechnung des benötigten Volumens des Virusstocks lautet:

$$V = \frac{\text{MOI} \times a}{C_{\text{stock}}}$$

Formel 2.1: Formel zur Berechnung des benötigten Volumens an Virusstock. V = Volumen an zuzufügendem Virusstock; MOI = Ziel-MOI (multiplicity of infection); a = Zellzahl; C_{stock} = Viruskonzentration / Aktivität [pfu/mL] des Stocks

Die biologische Aktivität der Viren wurde mithilfe der Agarose-overlay-Methode in QBI-HEK-293A-Zellen bestimmt und in pfu/mL (plaque forming units pro mL) angegeben. Das berechnete Volumen wurde zur Transduktion in das jeweilige Kulturmedium der Zellen gegeben. Bei teilungsfähigen neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte die Transduktion 24 Stunden nach der Isolation. Zum Entfernen von toten Zellen wurden diese zunächst gewaschen. Danach wurde das berechnete Volumen (Formel 2.1) in das Kulturmedium gegeben und die Zellen für weitere 24 bis 72 Stunden inkubiert.

Bei sich nicht mehr teilenden adulten Kardiomyozyten wurde unmittelbar nach der Isolation die Transduktion begonnen und nach vierstündiger Inkubation durch einen Mediumwechsel terminiert.

2.2.1.6. Verwendung eines Carabin-Adenovirus

Um eine gesteigerte Expression von Carabin in isolierten Kardiomyozyten zu erzielen, wurde ein Carabin-Adenovirus zum Transfer einer Carabin-Flag-DNA unter der Kontrolle des murinen Cytomegalie-Virus-Promotors (MCMV-Promotor) verwendet (Abb. 2.1). Durch Ligation der Flag-DNA-Sequenz an die Carabin-DNA-Sequenz wird die Synthese eines Carabin-Flag-Fusionsproteins erzielt, das die Möglichkeit erlaubt durch Flag-Detektion gezielt das exogene Carabin nachzuweisen. Das Flag-Peptid besteht aus acht Aminosäuren und ist allgemein etabliert zur Markierung von rekombinanten Proteinen (Hopp et al., 1988). Das Virus wurde von Frau Dr. rer.

nat. C. Grebe (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

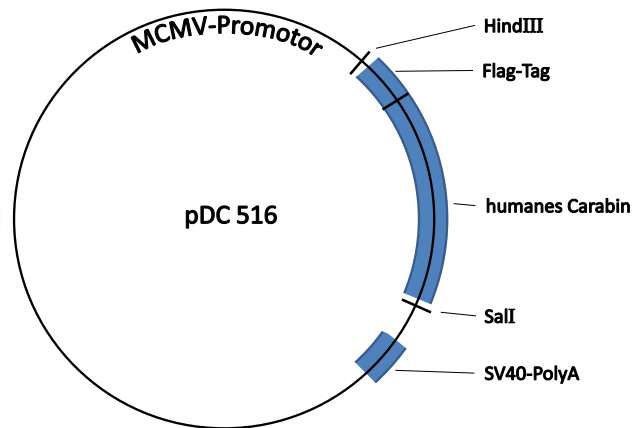


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Carabin-Viruskonstrukts. Die Carabin-DNA unterliegt der Kontrolle des MCMV-Promotors und ist an das Flag-Tag gekoppelt, um die spezifische Detektion des exogenen Carabin-Proteins zu ermöglichen. Das Virus wurde von Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

2.2.1.7. Verwendung eines konstitutiv aktiven Calcineurin-Adenovirus

Das verwendete Calcineurin-Adenovirus kodiert für eine konstitutiv aktive Form der murinen Calcineurin α -Einheit (Aminosäure 1 – 398). Die konstitutive Aktivität wurde durch Deletion der autoinhibitorischen Domäne erreicht (Parsons et al., 1994). Das Virus wurde von Herrn Dr. med. Tim Seidler und Frau Dr. rer. nat. C Grebe (beide: Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt.

2.2.1.8. Planimetrie ventrikulärer Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Zur Analyse der zellulären Hypertrophie wurden neonatale, ventrikuläre Rattenkardiomyozyten in jeweils 2mL Kulturmedium auf 35-mm-Zellkulturschalen ausplattiert. Pro Schale wurden 100.000 Zellen ausplattiert, um möglichst keine Zellkonfluenz zu erzielen. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit vorgewärmten DMEM (37°C) gewaschen, um nicht-adhärenente und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde frisches Kulturmedium in die

Kulturschalen gegeben und die Zellen adenoviral transduziert und für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurden die Zellen stimuliert, um ein hypertrophes Wachstum zu induzieren. Hierzu wurde entweder Phenylephrin (5µM) oder Angiotensin-II (50nM) verwendet (Yamazaki et al., 1999; Scheuer, 1999; Ramirez et al., 1997; Baker, 1996; Clerk et al., 1994; Sadoshima und Izumo, 1993). Nach Zugabe der jeweiligen Stimulatoren in das Kulturmedium der entsprechenden Kulturschalen, wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ für weitere 48 Stunden inkubiert.

Vor der Analyse wurden die Zellen erneut mit vorgewärmtem DMEM (37°C) gewaschen um wiederum tote und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Danach erfolgte zur verblindeten Auswertung eine Kodierung der Zellkulturschalen. Anschließend wurden die Zellen bei 200facher Vergrößerung im Mikroskop fotografiert. Die Ausmessung der Kardiomyozyten erfolgte mithilfe des Programms ImageJ (Version 1.43u). Pro Schale wurden mindestens 100 Zellen vermessen. Jeder Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, sodass immer jeweils zwei Zellkulturschalen gleich behandelt wurden.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen

Die kultivierten Zellen wurden nach Abschluss der jeweiligen Inkubationszeiten vorsichtig mit DPBS gewaschen, um tote und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Zellen in 1mL DPBS mittels Zellschaber abgelöst und ein Reaktionsgefäß überführt. Die Schalen wurden mit weiteren 0,5mL DPBS gespült, welches anschließend ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben wurde. Die Proben wurden zur Kühlung sofort auf Eis gestellt.

Die Reaktionsgefäße wurden dann bei 3.000 x g und 4°C für 1 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die entstandenen Pellets wurden in 150µL frisch angesetzten Lysepuffer resuspendiert und zusätzlich mithilfe einer Spritze und einer 40G-Kanüle mechanisch lysiert. Im Anschluss wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 9.000 x g für 2 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand enthielt nun die Zellproteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Nach anschließender Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Lysate bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2. Herstellung von Protein-Lysaten aus tierischen Geweben

Die isolierten Mäuseherzen wurden unmittelbar nach Entnahme mit eiskaltem PBS gewaschen und perfundiert, um Restblut zu entfernen. Gleichzeitig wurden die Atrien auf Höhe der Ventilebene abgetrennt. Danach wurde das kardioventrikuläre Gewebe in ein Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zur Homogenisation und Proteinisolierung wurden dem gefrorenen Gewebe 300-500µL frisch angesetzter, gekühlter Lysepuffer zugegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisation mittels eines Rotor/Stator-Homogenisators (ART Labortechnik, Müllheim).

Danach wurden die Proben bei 7.000 x g und 4°C für 2,5 min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Der Überstand enthielt nun die Zellproteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Nach anschließender Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Lysate bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung von Protein-Lysaten

Die Proteinkonzentration von Proteinlysaten wurde mit dem BCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotech., Rockford, USA) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der BCA-Methode, bei der die Biuret-Reaktion ausgenutzt wird (Smith et al., 1985). Hierbei binden Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung an Proteinen und werden zu Cu⁺ reduziert. Bicinchonin-Säure (BCA) ist ein Chelator mit zwei koordinativen Bindungsstellen. Jeweils zwei Bicinchonin-Säure-Moleküle gehen eine Komplexbindung mit dem reduzierten Kupfer als Zentral-Ion ein, welche violett erscheint. Die Intensität der Färbung kann kolorimetrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 562nm.

Von den zu messenden Proben wurden 1:10- bis 1:20-Verdünnungen in H₂O angefertigt. Jeweils 25µL jeder verdünnten Probe wurde in ein flachbödiges well einer 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Um die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgeraden extrapolieren zu können, wurde bei jeder Messung zusätzlich eine BSA-Eichreihe mit Konzentrationen von 0 bis 2000µg/mL als interner Standard verwendet und ebenfalls jeweils 25µL jeder Konzentration in die Mikrotiterplatte überführt.

Anschließend wurde zu jedem well 200µL einer 50:1-Mischung der Lösungen A und B des BCATM Protein Assay Kits zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Extinktionen bei

562nm in einem μ Quant Universal Microplate-Spektralphotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA) gemessen.

2.2.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenaufftrennung von Proteinlysaten wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tris-Glycin-Puffern nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierzu wurde das SDS-PAGE System Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet.

Als Trenngel wurde, in Abhängigkeit von der Größe des Zielproteins, ein 10-12,5%iges Polyacrylamidgel nach folgender Zusammensetzung gemischt und gegossen:

	10% Trenngel	12,5% Trenngel
Acrylamid-Bisacrylamid	3,33 mL	4,17 mL
4x Tris/SDS, pH8,8	2,5 mL	2,5 mL
H₂O	4,16 mL	3,33 mL
APS	33 μ L	33 μ L
TEMED	7 μ L	7 μ L
	10 mL	10 mL

Nach vollständiger Polymerisation wurde ein 4%iges Sammelgel nach folgender Zusammensetzung gemischt und dem Trenngel aufgegossen:

	4% Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid	0,67 mL
4x Tris/SDS, pH6,8	1,25 mL
H₂O	3,08 mL
APS	30 μ L
TEMED	10 μ L
	5 mL

Nachdem auch diese vollständig polymerisiert war, wurden die Proben in die Geltaschen gegeben. Die Proteinproben wurden zuvor durch Verdünnung mit dem Lysepuffer auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt, sodass jede Probe die gleiche Proteinkonzentration enthielt.

Zusätzlich wurden jeder Probe 0,4 Volumeneinheiten 5xLaemmli-Puffer zugegeben und die Proben anschließend für 5 min bei 55°C erhitzt.

Um die Proteingrößen bestimmen zu können, wurde neben den Proteinproben zusätzlich ein vorgefärbter Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in 1xLaufpuffer bei konstantem Gleichstrom von 50mA, bzw. 100mA (1 Gel, bzw. 2 Gele) für etwa eine Stunde.

2.2.2.5. Western-Blot

Nach der SDS-PAGE wurde der Western-Blot durchgeführt, um die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren. Hierzu wurde ein Mini-Trans-Blot-System der Firma Bio-Rad Laboratories (München) verwendet. Zum Aufbau wurden zwei Schwämme, vier Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt und anschließend verwendet. Hierzu wurden in einer Blot-Kassette zwei Filterpapiere auf einem Schwamm gelegt. Darauf wurden die Nitrocellulosemembran und dann das PAGE-Gel luftfrei gestapelt. Zwei weitere Filterpapiere und ein weiterer Schwamm wurden aufgelegt und die Kassette verschlossen in den Blot-Tank eingehängt. Der Tank wurde mit 1xTransferpuffer gefüllt und zur Kühlung ein Eis-Akku zugefügt.

Der Western-Blot-Prozess wurde nun bei konstantem Gleichstrom bei 500mA für zwei Stunden durchgeführt. Hierbei wurden die SDS-Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Im Anschluss wurde die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt, um das Transfer-Ergebnis beurteilen zu können. Gleichzeitig sorgte die Essigsäure aus dem Farbstoff für eine Fixierung der Proteine auf der Membran.

2.2.2.6. Immundetektion von membrangebundenen Proteinen

Zunächst wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder alternativ über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver (in 1xTBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Anschließend wurde nach kurzem Waschen in 1xTBST der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in 0,5% Magermilchpulver (in 1xTBST) auf die Membran gegeben und, je nach Evidenz, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal jeweils 5 min. in 1xTBST gewaschen und anschließend mit

dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundärantikörper waren HRP-gekoppelt (horseradish peroxidase) und wurden in einer Verdünnung von 1:10.000 (in 0,5% Magermilchpulver in 1xTBST) verwendet. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min in 1xTBST gewaschen.

Zum Nachweis der Peroxidase-Aktivität wurde die Membran nach den Waschgängen 5 min mit dem SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotech., Rockford, USA) inkubiert. Alternativ wurde für schlecht detektierbare Signale Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Bad Schwalbach) verwendet. Die Reagenzien wurden durch die Peroxidase oxidiert, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wurde, die zur Schwärzung von Röntgenfilmen genutzt wurde.

Nach dieser Inkubation wurde die abgetropfte Membran in eine Klarsichtfolie eingelegt und diese in eine Röntgenkassette gelegt. Nun wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) eingelegt und nach 1 min entwickelt. Je nach Ergebnis wurde die Belichtung mit veränderten Zeiten wiederholt.

Sollten zwei annähernd gleich große Zielproteine nachgewiesen werden, wurde zunächst der erste Primärantikörper verwendet und die Membran nach Anfertigung der Bilder von allen Antikörpern befreit („Membran-Strippen“). Hierzu wurde die Membran zunächst 3 min mit aqua_{bidest}, dann 4 min in 0,2M NaOH und zuletzt wieder 3 min in aqua_{bidest} inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit 5% Magermilchpulver (in 1xTBST) für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht geblockt. Danach konnte der zweite Primärantikörper wie beschrieben verwendet werden.

2.2.3. Subzelluläre Lokalisation von Proteinen

2.2.3.1. Immunfluoreszenz-Färbung eukaryontischer Zellen

Für diese Färbung wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten verwendet, die auf speziellen Kultur-Objektträgern (Falcon™ 4-well CultureSlides, Becton Dickinson, Heidelberg) in entsprechendem Kulturmedium kultiviert und ggf. adenoviral transduziert wurden. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in einer eiskalten Methanol/Aceton-Mischung (Mischungsverhältnis 7:3) für 10 min bei -20°C fixiert und danach dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellmembranen durch 10minütige Inkubation in 0,1% Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert und danach erneut einmal kurz mit PBS

gewaschen. Dann wurde 4%iges (w/v) BSA in PBS für 40 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und dadurch unspezifische Bindungsstellen geblockt.

Nach dieser Vorbereitung der Zellen wurden diese mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration (in 1% (w/v) BSA in PBS) für eine Stunde bei 37°C und dunkel inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Anti-rabbit IgG, Cy3-linked Antibody bzw. Anti-mouse IgG, Cy3-linked Antibody, Jackson ImmoResearch, West Grove, USA) in einer 1:600-Verdünnung (in 1% (w/v) BSA in PBS) eine Stunde bei 37°C und dunkel inkubiert.

Gegebenenfalls wurden nach weiteren drei Waschgängen mit PBS zusätzlich durch eine DAPI-Färbung die Zellkerne markiert. Hierzu wurde DAPI in einer Verdünnung von 1:5.000 (in PBS) für 10 min auf die Zellen gegeben und anschließend vorsichtig abgetropft.

Zuletzt wurden die Präparate mit Vectashield-Mounting-Medium eingedeckt und entsprechende Deckgläser fixiert. Die Präparate wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse (Axiovert 200, Carl Zeiss, Hamburg) bei 4°C und dunkel gelagert.

2.2.3.2. Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen

Zur subzellulären Lokalisation von NFAT wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten 24 Stunden nach Isolation mit einem NFATc3-GFP-Adenovirus transduziert. Dieser Virus kodiert für ein Fusionsprotein aus NFATc3 und GFP (green fluorescent protein). Nach 48stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200, Carl Zeiss, Hamburg) und der Software AxioVision (Version 4.8, Carl Zeiss, Hamburg) bei 200facher Vergrößerung, unter Verblindung hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit, Bilder angefertigt.

Während der Analyse wurden pro Experiment und Transduktion mindestens 200 Zellen ausgewertet. Diese wurden in Abhängigkeit der NFAT-GFP-Lokalisation einer von drei Gruppen zugeordnet (eindeutig zytosolische Lokalisation, ubiquitäre Lokalisation, eindeutig nukleäre Lokalisation). Für die statistische Auswertung wurden die Zellen mit nukleärer Lokalisation (eindeutig nukleäre und ubiquitäre Lokalisation) zusammengefasst und in Relation zur analysierten Gesamtzellzahl gesetzt.

2.2.4. Transgene Mäuse

2.2.4.1. Carabin-transgene Maus

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde durch Herrn Dr. med. T. Seidler und Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (beide: Universitätsmedizin Göttingen) ein Mausmodell zur herzspezifisch gesteigerten Carabin-Expression etabliert und drei transgene Mauslinien generiert, gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Mauslinien wurde ein Konstrukt verwendet, das unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors für ein Carabin-Flag-Fusionsprotein kodiert (Abb. 2.2).

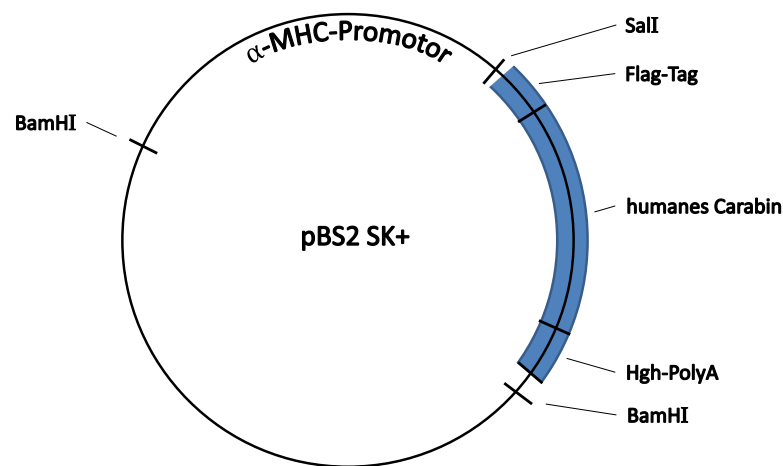


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Carabin-Mauskonstrukts. Die Carabin-DNA unterliegt der Kontrolle des α -MHC-Promotors und ist an das Flag-Tag gekoppelt. Hierdurch wird die herzspezifische Expressionssteigerung eines Carabin-Flag-Fusionsproteins erreicht. Zusätzlich ermöglicht das Flag-Tag die spezifische Detektion des exogenen Carabin-Proteins. Das Virus wurde von Herrn Dr. med. T. Seidler und Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (beide: Universitätsmedizin Göttingen) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

2.2.4.2. Genotypisierung transgener Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mithilfe von Schwanzspitzen-Biopsaten. Zur Aufarbeitung der genomischen DNA wurde das DirectPCR (tail) Reagent (PEQlab, Erlangen) verwendet. Hierzu wurden die Schwanzspitzen jeweils in 200 μ L Lysepuffer mit Proteinase K (Carl Roth, Karlsruhe) bei 55°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K zur Hitzeinaktivierung für 45 min bei 85°C inkubiert. Danach wurden die Proben 3 min lang bei 10.000 x g zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Nun erfolgte die Genotypisierung mittels PCR mit Transgen-spezifischen Primern.

2.2.4.3. Echokardiographische Phänotypisierung transgener Mäuse

Vor der echokardiographischen Untersuchung wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose (1% Isofluran-Gasgemisch über Inhalationsmaske) sediert und im Thoraxbereich rasiert. Diese Narkose wurde während der kompletten Untersuchung aufrechterhalten.

Die echokardiographischen Messungen erfolgten in M-Mode-Darstellung der kardialen Längsachse. Hierbei wurden die Herzfrequenz, die Dicke des Septums und der Hinterwand, sowie der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) und der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVESD) gemessen (Abb. 2.3). Jede Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, d.h. jede Untersuchung ist dreimal hintereinander an jedem Tier durchgeführt worden. Die Untersuchungen erfolgten unter Verblindung, hinsichtlich der Genotypen, bzw. der Gruppenzugehörigkeit.

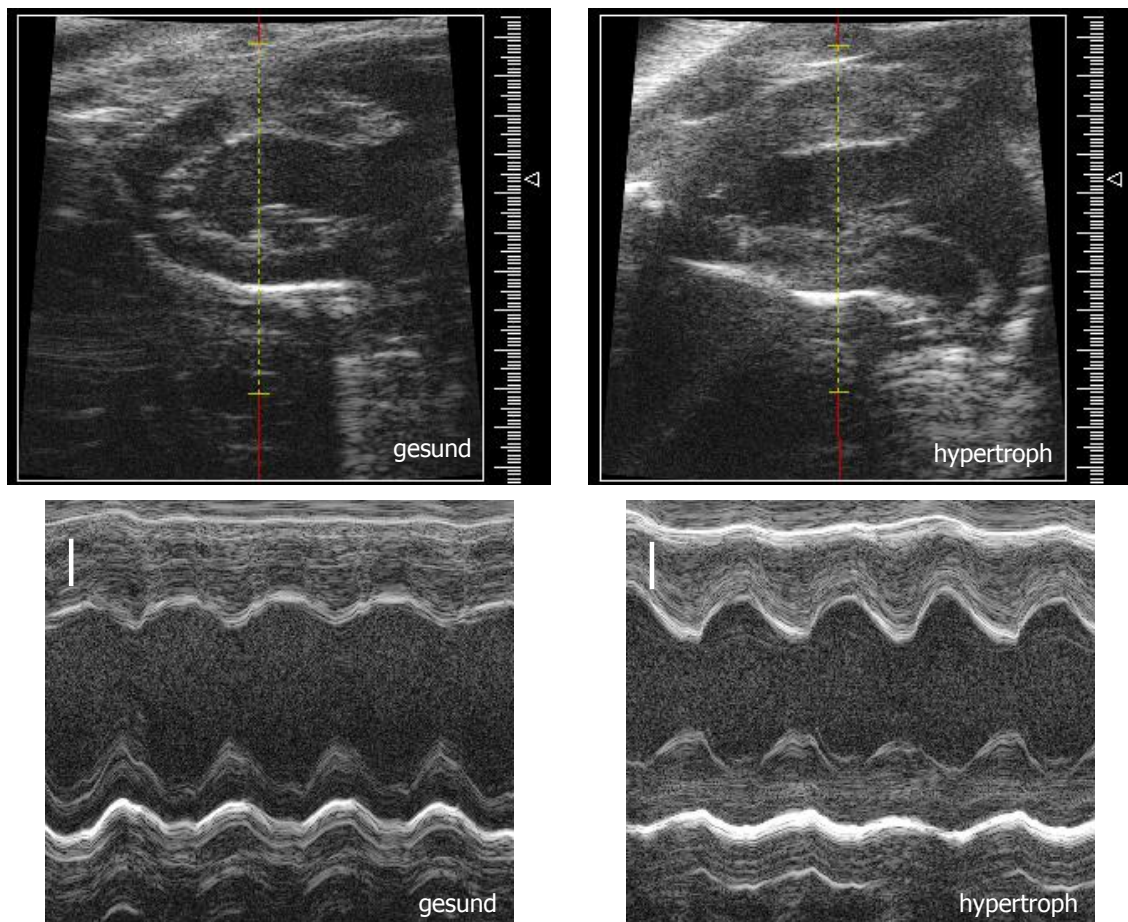


Abb. 2.3: Beispielbilder für die M-Mode-Echokardiographie von Mäusen. In der kardialen Längsachse wird eine M-Mode-Echokardiographie senkrecht zum linken Ventrikel durchgeführt und die Herzfrequenz, die Dicke des Septums und der Hinterwand, sowie der LVEDD und LVESD vermessen. Die Bilder zeigen ein Beispiel für eine Wildtyp-Maus ohne messbare kardiale Hypertrophie (gesund) und ein Beispiel für eine Wildtyp-Maus mit messbarer Hypertrophie nach Dauerstimulation mit Angiotensin-II (hypertroph). Der Eichbalken entspricht 1 cm.

In dieser Arbeit wurde lediglich die Septumdicke als Indikator für hypertrophes Herzwachstum betrachtet.

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von den speziell geschulten medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kirsten Koschel und Frau Jessica Spitalieri (beide: Abteilung Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

2.2.4.4. Implantation von mikroosmotischen Pumpen

Die Operationen wurden durch Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

Zunächst wurden die Mäuse narkotisiert. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere jeweils in einen gläsernen Topf gelegt, der zuvor mit Watte ausgekleidet wurde, welche mit Isofluran getränkt war. Unter ständiger Beobachtung wurde die Einleitung durchgeführt, bis das entsprechende Tier betäubt war. Dann wurde die Maus zügig aus dem Topf entnommen und eine Maske angelegt, um eine kontrollierte Inhalationsnarkose fortzuführen. Hierzu wurde ein 1,5%iges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch verwendet. Während der Narkose wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gelegt, um eine maligne Hypothermie zu verhindern. Die Maus wurde nun auf dem Bauch liegend, mithilfe von Klebeband, an den Extremitäten fixiert. Nun wurde der Schulter/Rücken-Bereich der Maus mithilfe einer Enthaarungscreme und wassergetränkten Wattestäbchen enthaart und anschließend mit Wasser gespült und mit Braunol-Lösung desinfiziert. Als nächstes wurde ein kleiner transversaler Hautschnitt, ca. 1,5 - 2 cm kaudal des Schultergürtels auf dem Rücken gesetzt und mithilfe einer Schere kranialwärts stumpf präpariert, sodass eine Tasche gebildet wurde. Nun wurde die 13 mm lange mikroosmotische Pumpe vom Typ 1002 (Alzet) blasenfrei nach entsprechender Berechnung mit einer Angiotensin-II-Lösung befüllt (Tab. 2.1) und dann mit der Öffnung nach kranial gerichtet in die präparierte Gewebstasche eingeführt. Danach wurde die Wunde mit 2-3 Einzelknopfnähten verschlossen und die Position der Pumpe manuell so korrigiert, dass eine spannungsfreie Naht resultierte. Nun wurde die Wunde ein weiteres Mal mithilfe von Braunol-Lösung desinfiziert und die Inhalationsnarkose beendet. Zur Narkoseausleitung wurden die Mäuse weiterhin unter Beobachtung auf einer Wärmeplatte belassen, bis sie deutliche Wachreaktionen zeigten und sie in einen Käfig zurück verbracht werden konnten.

Im Rahmen der sham-OP wurde statt einer mikroosmotischen Pumpe ein Silikonstück in vergleichbarer Größe und in gleicher Technik implantiert.

Pumpenleistung	0,25 µL/h
Pumpenvolumen	90 µL
Zieldosis	3 mg/kg KG/d = 0,125 mg/kg KG/h
Mittelgewicht (♂)	28,75 g
Zieldosis (♂)	0,00359375 mg/Maus/h
Zielkonzentration der Pumpe (♂)	14,375 mg/mL
Mittelgewicht (♀)	23,8 g
Zieldosis (♀)	0,002975 mg/Maus/h
Zielkonzentration der Pumpe (♀)	11,9 mg/mL

Tab. 2.1: Berechnung zur Befüllung der mikroosmotischen Pumpen Typ Alzet 1002. Die Berechnung der Angiotensin-II-Konzentration erfolgte gewichtsadaptiert. Hierzu wurden die Mittelgewichte von allen verwendeten Männchen, bzw. Weibchen als Rechengrundlage verwendet. Zieldosis war 3 mg/kg KG/d.

Nach 10 Tagen *post operationem* wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt (2.2.4.3) und nach 14 Tagen *post operationem* wurden die Tiere getötet und Gewebe für weitere Untersuchungen entnommen.

2.2.5. Histologische Methoden

2.2.5.1. Gewebefixierung und -einbettung

Für die histologischen Untersuchungen wurden Herzen aus transgenen Mäusen verwendet. Nach der Isolation und Reinigung der Mäuseherzen wurden die Atrien entfernt. Vom verbleibenden ventrikulären Gewebe wurde Herzbasis-nah eine transversal geschnittene, wenige Millimeter dicke Gewebescheibe abgetrennt und sofort in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS eingelegt und über Nacht bei 4°C fixiert. Das verbleibende Apex-nahe Gewebe wurde für Protein-Analysen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Nach der Fixierung wurde das Gewebe in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica, Wetzlar) in mehreren Schritten nach folgendem Protokoll entwässert:

Medium	Inkubationszeit
H₂O	> 3 h
70% Ethanol	1 h
80% Ethanol	1 h
96% Ethanol	1 h
100% Ethanol	3 x 1 h
Chloroform	2 x 1 h
Paraffin	3 x 1 h

Für die anschließende Einbettung wurde eine Paraffinausgießstation der Firma Leica (Wetzlar) verwendet. Passende Einbettungsformen wurden auf 65°C erhitzt und zur Hälfte mit flüssigem Paraffin gefüllt. Dann wurden die entwässerten Gewebestücke möglichst plan und mittig in den Formen positioniert. Nun wurde die Form mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und über Nacht ausgehärtet. Zuletzt wurde der Paraffinblock entnommen und bei 4°C gelagert.

2.2.5.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Die fertigen Paraffinblöcke wurden in ein Mikrotom (Leica, Wetzlar) eingespannt und es wurden 6µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mithilfe eines feinen Pinsels in ein Wasserbad (37°C) überführt und von dort auf einen Objektträger aufgenommen. Die Objektträger wurden anschließend auf einer Wärmeplatte angetrocknet und dann für 1 Stunde bei 55°C vollständig getrocknet und fixiert. Nun wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.3. WGA-Färbung von Gewebeschnitten

Die WGA-Färbung ist eine Standard-Färbetechnik zur selektiven Färbung von Zellmembranen. Hierbei wird die selektive Bindung von WGA (wheat germ agglutinin) an N-Acetylglukosamin-Oligomeren der Zellmembranen ausgenutzt. Durch Nutzung eines WGA-Konjugats mit einem fluoreszierenden Moleküls (hier verwendet: TRITC-WGA) können die Zellmembranen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

Die angefertigten Gewebeschnitte wurden zunächst in einer ansteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und bewässert:

Medium	Inkubationszeit
Xylol	2 x 20 min
100% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
65% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
25% Ethanol	5 min
H₂O	5 min

Die Objektträger wurden nun vorsichtig abgetropft und in eine feuchte Kammer gelegt und für 30 min mit WGA (Sigma-Aldrich, München) in einer Konzentration von 50µg/mL (in 1xPBS) inkubiert, wobei so viel WGA auf die Schnitte getropft wurde, dass sie nicht austrockneten. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte 10 min mit DAPI (1:500 in 1% (w/v) BSA in PBS) dunkel inkubiert und danach dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen.

Zuletzt wurden die Präparate mit Vectashield-Mounting-Medium eingedeckt und entsprechende Deckgläser aufgelegt und fixiert. Die Präparate wurden bei 4°C und dunkel gelagert und in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Hamburg) bei 200facher Vergrößerung und verblindet, hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit, fotografiert.

Die angefertigten Fotos wurden mithilfe der Analysesoftware ImageJ (Version 1.43u), ebenfalls unter Verblindung, vermessen. Hierbei wurden pro Schnitt von mindestens 100 Zellen die jeweils kleinsten Diameter bestimmt. Hierdurch wurde vermieden, dass falsch große Diameter durch schräge Anschnitte gemessen wurden.

2.2.5.4. Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden Paraffinschnitte von kardioventrikulärem Gewebe verwendet (2.2.5.1 - 2.2.5.2). Mithilfe der Immunhistochemie unter der Nutzung von spezifischen Antikörpern können Proteine gezielt angefärbt werden und deren subzelluläre

Lokalisation untersucht werden. Die Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Ethanol-Reihe entparaffiniert und bewässert:

Medium	Inkubationszeit
Xylol	2 x 15 min
100% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
65% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
25% Ethanol	5 min
H₂O	5 min

Nun wurden die Objektträger in eine Kunststoffküvette gegeben und mit Citratpuffer (pH 6) getränkt und in der Mikrowelle für 15 min gekocht. Dabei wurde verdunstete Flüssigkeit regelmäßig mit aqua_{bidest} aufgefüllt. Anschließend wurden die Objektträger 20 min passiv abgekühlt und danach zweimal für jeweils 5 min mit aqua_{bidest} gespült. Dann erfolgten drei weitere Waschgänge mit 1xPBS für jeweils 5 min. Nun wurden die Objektträger für 10 min in 3% H₂O₂ in 1xPBS gegeben um die endogene Peroxidase zu blockieren und anschließend erneut dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate wenige Minuten getrocknet, mit einem Fettstift eingekreist und für 30 min mit 4% BSA in 1xPBS + 0,2% Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschgänge in aqua_{bidest} für jeweils 2 min und danach eine Inkubation mit 4% BSA in 1xPBS für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer (Blockung).

Als nächstes wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration für 1,5 Stunden auf die Schnitte gegeben und diese anschließend in drei Schritten für jeweils 5 min mit 1xPBS gewaschen.

Nun wurde das Reagenz A des SuperPicture™ Kits (HRP Poly Conjugat) auf die Präparate gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und diese anschließend dreimal für jeweils 2 min in 1xPBS gewaschen.

Hiernach erfolgte die Färbung mit DAB Chromogen. Hierzu wurden zunächst jeweils ein Tropfen der Reagenzien B1, B2 und B3 des SuperPicture™ Kits (Substratpufferkonzentrat (20x; B1) + Chromogenlösung-Konzentrat (DAB; 20x; B2) + 0,6% Hydrogen Peroxid (20x; B3) auf 1 mL aqua_{bidest} gegeben und gut vermischt. Nun wurden die Präparate mit derlichtsensiblen Lösung

benetzt und für 5 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend zweimal für jeweils 5 min mit aqua_{bidest} gewaschen.

Zuletzt erfolgte eine Kernfärbung. Hierzu wurden die Präparate 8 min mit Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert und anschließend mit aqua_{bidest} gewaschen und der Erfolg mithilfe eines Mikroskops kontrolliert. Dann wurde 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült um durch die Umstellung des pH-Werts eine Blaufärbung zu erzielen („Bläuen“).

Nun wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Hierzu wurden die Objektträger kurz in 80% Ethanol, dann für 1 min in 96% Ethanol und anschließend für 2 min in 100% Ethanol getaucht. Danach folgten zwei Inkubationen in Xylol für jeweils 5 min. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt und entsprechende Deckgläser aufgelegt und fixiert. Die Präparate wurden bei 4°C und dunkel gelagert und mithilfe eines Mikroskops (BX51, Olympus) bei 200facher Vergrößerung fotografiert.

2.2.6. Ethik

Alle Untersuchungen an lebenden Tieren wurden durch die örtliche Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und bewilligt. Zusätzlich erfolgte die Prüfung und Genehmigung durch das "Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit" unter dem Aktenzeichen: 33.11.42502-04-094/07.

2.2.7. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism® (Version. 5.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet.

Die Berechnung von statistischen Signifikanzen zweier Stichproben erfolgte mithilfe des Student-t-Tests. Die Berechnung von statistischen Signifikanzen mehrerer Stichproben erfolgte mithilfe der Anwendung eines einfaktoriellen ANOVA (Oneway-ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test. Die angezeigten Fehlerbalken in den Graphiken entsprechen, sofern nicht anders angegeben, dem Standardfehler (SEM, standard error of the mean). Die im Text angegebenen Streuungsmaße entsprechen den Fehlern der jeweils zugehörigen Graphiken.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen der durch Carabin beeinflussten Signaltransduktion in isolierten Kardiomyozyten

3.1.1. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Carabin in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten durch Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurde untersucht, ob Carabin in Kardiomyozyten exprimiert wird, und wo Carabin intrazellulär lokalisiert ist. Hierzu wurde Carabin in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Carabin-spezifischen Antikörpern detektiert. Gleichzeitig wurde die Lokalisation von adenoviral exprimiertem Carabin in Kardiomyozyten geprüft. Für diese Untersuchung wurden Carabin-transduzierte und untransduzierte isolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten analysiert. Die Transduktion wurde 24 Stunden nach Zellisolation mit einem Carabin-Adenovirus durchgeführt (generiert durch Frau Dr. rer. nat. C. Grebe, Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen). Das Carabin-Adenovirus kodiert für ein Fusionsprotein aus dem Flag-Tag und Carabin. Hierdurch ist das adenoviral exprimierte (exogene) Carabin mithilfe von Flag-spezifischen Antikörpern isoliert nachweisbar. Um ein deutliches Signal des adenoviral exprimierten Carabins zu erhalten, wurde experimentell eine MOI (multiplicity of infection) von 1 ermittelt. Die Zellen wurden insgesamt 48 Stunden kultiviert und anschließend fixiert. Dann wurde zur Lokalisation des Gesamt-Carabins ein Teil der Zellen mit einem Anti-Carabin-Antikörper inkubiert (Abb. 3.1 a, b), und zur Lokalisation von Carabin-Flag-Fusionsprotein ein Teil der Zellen mit einem Anti-Flag-Antikörper (Abb. 3.1 c, d) gefärbt. Anschließend wurden mittels Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung Fotos angefertigt.

Die Untersuchung zeigte ein spezifisches Immunfluoreszenzsignal. Daraus geht hervor, dass Carabin in Rattenkardiomyozyten endogen exprimiert wird. Carabin ist sowohl zytoplasmisch, als auch nukleär zu lokalisieren (Abb. 3.1 a). Es konnte auch gezeigt werden, dass das Carabin-Adenovirus zu einer deutlichen Expressionssteigerung führt (Abb. 3.1 c, d) und das adenoviral exprimierte Carabin ein vergleichbares Verteilungsmuster aufweist (Abb. 3.1 b + d).

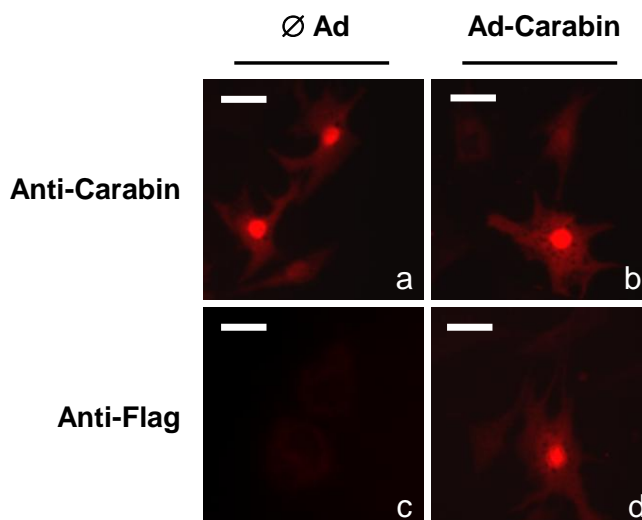


Abb. 3.1: Immunfluoreszenzdetektion von endogenem und exogenem Carabin. Isolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten wurden ohne Transduktion für 48 Stunden kultiviert (a, c) und mit einem Carabin-Flag-Adenovirus (MOI 1) transduziert (b, d). Nach der Inkubation wurden die Zellen entweder mit einem Anti-Carabin-Antikörper (a + b, rot) oder mit einem Anti-Flag-Antikörper (c + d, rot) gefärbt. Carabin wird endogen exprimiert und ist sowohl zytosolisch, als auch nukleär zu lokalisieren. Der Carabin-Adenovirus erzielt eine gesteigerte Carabin-Expression, wobei das adenoviral exprimierte Carabin ein vergleichbares Verteilungsmuster aufweist. Eichbalken = 10 µm.

3.1.2. Einfluss von Carabin auf die Hypertrophie von isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten

Bevor der Effekt einer gesteigerten Carabin-Expression in Kardiomyozyten neonataler Ratten untersucht werden konnte, musste zunächst das Expressionsniveau bei unterschiedlichen MOI des Carabin-Adenovirus in diesen Zellen quantifiziert werden, um eine geeignete, deutlich über dem Ausgangsniveau liegende und dennoch mäßig gesteigerte Carabin-Expression für die folgenden Experimente zu erzielen. Für diese Untersuchung wurden ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten nach der Isolation 24 Stunden lang kultiviert und anschließend adenoviral transduziert. In Vorversuchen wurde in adenoviral transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Carabin-Adenovirus, MOI 1 und 10) bereits eine sehr stark gesteigerte Carabin-Expression mittels Western-Blot-Analyse gemessen (nicht gezeigt), sodass für dieses Experiment die MOI 0, 0,001, 0,01, 0,1 und 1 verwendet wurden. Nach anschließenden weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Danach wurden die Gesamtproteinkonzentrationen aller Proben bestimmt und die jeweils gleiche Gesamtproteinmenge für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Carabin-Expression wurde durch den Anti-Carabin-Antikörper visualisiert. Zusätzlich wurde das weitgehend konstant

exprimierte Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gefärbt und die Carabin-Proteinmenge hierzu in Relation gesetzt (Abb. 3.2).

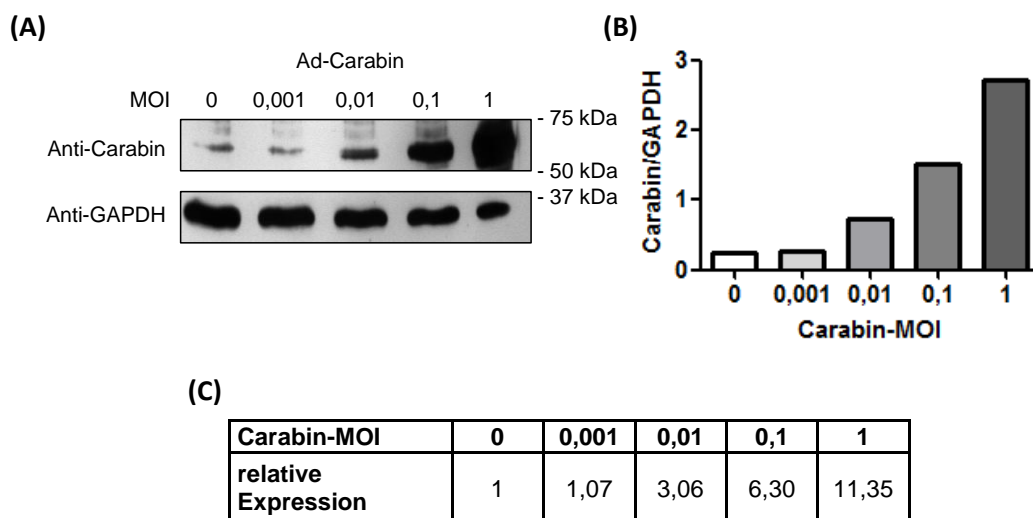


Abb. 3.2: Western-Blot zur Untersuchung der Carabin-Expression nach adenoviraler Transduktion mit unterschiedlichen MOI in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten neonataler Ratten. (A) Carabin-Proteinexpression in Abhängigkeit der verwendeten MOI nach Immunfärbung mit einem Anti-Carabin-Antikörper. Zusätzlich wurde eine Immunfärbung von GAPDH durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Carabin-Adenovirus (MOI wie angegeben) transduziert und nach insgesamt 72 Stunden Kultivierung geerntet, lysiert und zu proteinkonzentrationsäquivalenten Proben aufbereitet. Anschließend wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt ist die Carabin-Proteinmenge normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. (C) Tabellarische Darstellung der relativen Carabin-Expression, bezogen auf die endogene Carabin-Expression (MOI 0). Eine Ad-Carabin MOI von 0,1 zeigt eine deutliche, aber moderat gesteigerte Carabin-Expression (6,30fach). Daher wurde diese MOI für alle weiteren Experimente in neonatalen Rattenkardiomyozyten verwendet.

Die Analyse des mithilfe des Anti-Carabin-Antikörpers gefärbten Western-Blots ergab eine distinkte Bande zwischen 50 und 75 kDa. Ein solches Signal war bereits basal, d.h. in nicht-transduzierten Zellen (MOI 0) nachweisbar. Die Expression von Carabin infolge der adenoviralen Transduktion wurde als Quotient der Carabin-Expression nach Transduktion und der Carabin-Expression ohne Transduktion dargestellt. Ab einer MOI von 0,01 zeigte sich eine deutliche Steigerung der Carabin-Proteinmenge um den Faktor 3,06. MOI 0,1 erzielte eine Steigerung um den Faktor 6,30 und MOI 1 um den Faktor 11,35 (Abb. 3.2 (C)). Um eine deutlich über dem Ausgangsniveau liegende, jedoch moderat gesteigerte Expression zu erzielen, wurde für alle weiteren Untersuchungen in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine MOI von 0,1 festgelegt und in allen Versuchen verwendet.

Zur Untersuchung des Einflusses von Carabin auf das Zellwachstum, wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten verwendet und nach der Isolation 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die adenovirale Transduktion wie in Abb. 3.2 (B) angegeben. Für den Carabin-

Adenovirus wurde die zuvor ermittelte MOI 0,1 verwendet. Die Gesamtviruslast der Zellen wurde durch Kotransduktion eines lacZ-Adenovirus ausgeglichen, um eine gleiche Exposition der Zellen mit Adenoviren zu erreichen. Die Zellen wurden dann weitere 24 Stunden kultiviert und anschließend mit einem Carabin-Adenovirus, bzw. mit einem lacZ-Adenovirus transduziert und mit Phenylephrin, bzw. Angiotensin-II für weitere 48 Stunden unter Inkubation stimuliert um ein hypertrophes Zellwachstum zu induzieren (2.2.1.7) (Abb. 3.3). Für Phenylephrin wurde eine Konzentration von 5 μ M gewählt und für Angiotensin-II eine Konzentration von 50nM. Anschließend wurden die Zellen bei 200facher Vergrößerung fotografiert und die Zelloberflächen vermessen (Abb. 3.3 (A)). Die Erstellung der Fotos, sowie die Auswertung erfolgten verblindet hinsichtlich der Gruppenverteilung. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt (n=4) und pro Behandlungsgruppe und Versuch mindestens 100 Zellen ausgewertet.

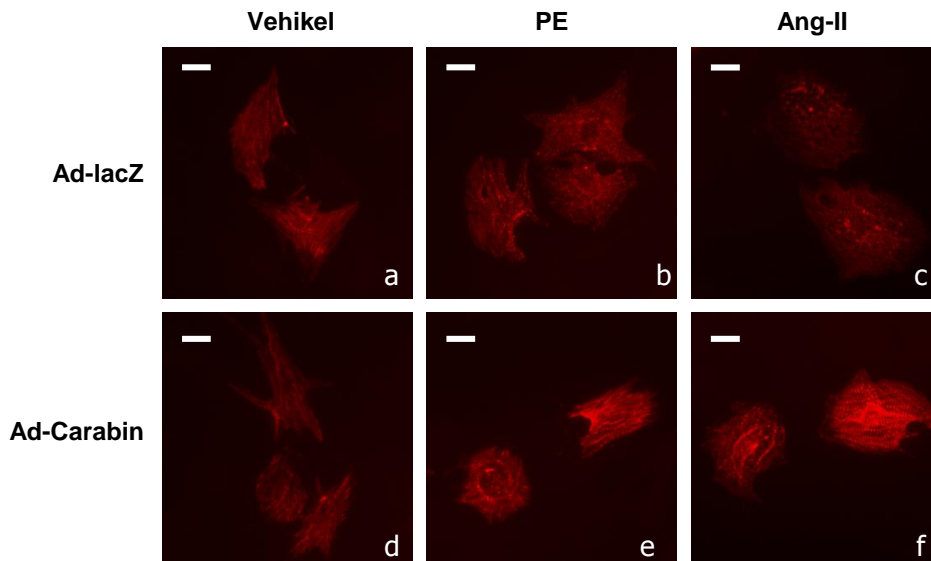
Die Zelloberflächen wurden relativ, d.h. als Quotient zur durchschnittlichen Zelloberfläche der vehikelbehandelten lacZ-transduzierten Zellen (Abb. 3.3 (B), a) dargestellt. In den lacZ-transduzierten Zellen wurde sowohl mit Phenylephrin als auch mit Angiotensin-II eine jeweils signifikante Vergrößerung der Zelloberfläche um 39%, bzw. 42% festgestellt (Ad-lacZ+PE: $1,39 \pm 0,03$, $p < 0,001$; Ad-lacZ+Ang-II: $1,42 \pm 0,04$, $p < 0,001$).

Die vehikelbehandelten Carabin-transduzierten Zellen zeigten eine mittlere relative Zelloberfläche von $1,06 \pm 0,02$ und demnach keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,074$).

Unter Phenylephrin-Stimulation zeigte sich in den Carabin-transduzierten Zellen eine relative Zelloberfläche von $1,02 \pm 0,02$. Somit ergab der Versuch keinen signifikanten Unterschied zwischen Carabin-transduzierten und vehikelbehandelten lacZ-transduzierten Zellen und damit eine signifikante Inhibition des Wachstumseffekts verglichen mit den Phenylephrin-stimulierten lacZ-transduzierten Zellen ($p < 0,001$).

Unter Angiotensin-II-Stimulation zeigte sich in den Carabin-transduzierten Zellen eine relative Zelloberfläche von $1,06 \pm 0,02$. Auch hier wurde folglich kein signifikanter Unterschied zu den vehikelbehandelten lacZ-transduzierten Zellen und somit eine signifikante Inhibition des Wachstumseffekts verglichen mit den Angiotensin-II-stimulierten lacZ-transduzierten Zellen festgestellt ($p < 0,001$) (Abb. 3.3 (B)).

(A)



(B)

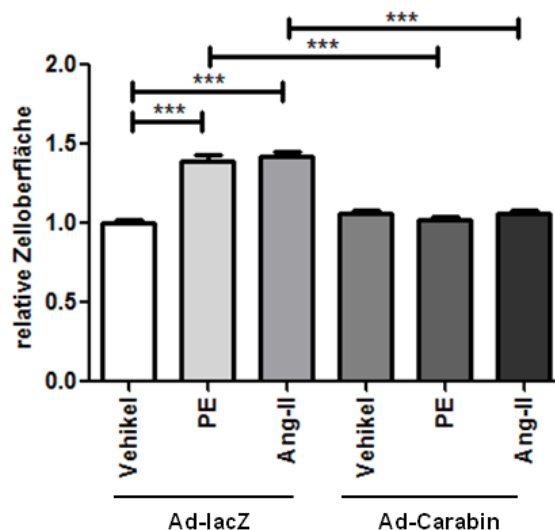


Abb. 3.3: Planimetrische Untersuchung des Zellwachstums in Abhängigkeit einer gesteigerten Carabin-Expression. Zur Untersuchung wurden isolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten 24 Stunden nach Isolation mit einem Carabin-Adenovirus, bzw. mit einem lacZ-Adenovirus (jeweils MOI 0,1) und nach weiteren 24 Stunden mit Phenylephrin (PE: 5 μ M), bzw. Angiotensin-II (Ang-II: 50nM) für weitere 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 200facher Vergrößerung und unter Verblindung hinsichtlich der Gruppenzuordnung fotografiert und die Zelloberflächen vermessen. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Für die Färbung wurde ein cy3-gekoppelter Anti-Alpha-Aktinin-Antikörper (rot) verwendet. (B) Gesamtergebnis von vier unabhängigen Versuchen (n=4). Pro Behandlung und Versuch wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet. Jede Intervention wurde in Doppelbestimmung analysiert. Die Zelloberfläche wurde relativ zum Mittelwert der Oberflächen vehikelbehandelter lacZ-transduzierter Zellen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Durch PE und Ang-II konnte in Ad-lacZ-transduzierten Zellen jeweils ein signifikantes ($p < 0,001$) hypertrophes Zellwachstum induziert werden. Dieses Wachstum wurde in Ad-Carabin-transduzierten Zellen nicht festgestellt. Eichbalken = 10 μ m. *** $p < 0,001$.

In diesem Versuch ließ sich demnach mittels PE und mittels Ang-II jeweils ein signifikantes Zellwachstum in lacZ-transduzierten neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten induzieren. Durch die Transduktion mit einem Carabin-Adenovirus und der dadurch induzierten Carabin-Expressionssteigerung, konnte dieser Wachstumseffekt signifikant inhibiert werden.

3.1.3. Einfluss von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung durch Analyse der subzellulären Lokalisation eines NFATc3-GFP-Fusionsproteins in isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert zytosolisches NFAT, woraufhin dieses in den Zellkern transloziert und eine Transkription prohypertropher Gene bewirkt (Molkentin et al., 1998). Da Carabin die Calcineurinaktivität in T-Lymphozyten inhibiert (Pan et al., 2007), wurde untersucht ob Carabin den gleichen Effekt in Kardiomyozyten erzielt.

Hierzu wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten wie in Abb. 3.4 (A) angegeben 24 Stunden nach Isolation transduziert. Es wurden ein Carabin-Adenovirus mit einer MOI von 0,1 und ein Calcineurin-Adenovirus, das für ein konstitutiv aktives Calcineurin A kodiert, mit einer MOI von 50 verwendet. Um eine äquivalente Virusexposition in allen Gruppen zu erzielen, wurde durch Kotransduktion mit einem lacZ-Adenovirus jeweils die Zahl der Viren pro Zelle angeglichen. Zusätzlich wurden alle Zellen mit einem NFATc3-GFP-Adenovirus transduziert. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden bei 200facher Vergrößerung fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt und ausgewertet (Abb. 3.4 (B)). Die Erstellung der Bilder und die Auswertung erfolgten verblindet hinsichtlich der Gruppenverteilung.

Die Zellen wurden visuell, abhängig von ihrer NFATc3-GFP-Lokalisation, einer von drei Gruppen zugeordnet: primär zytosolische Lokalisation, intermediäre (ubiquitäre) Lokalisation und primär nukleäre Lokalisation. Die Anteile der Zellen, die eine nukleäre Lokalisation zeigten (Intermediär-Gruppe und primär-nukleär-Gruppe) wurden als relativer Anteil (in %) der gemessenen Gesamtzellzahl dargestellt. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3) und pro Behandlung und Versuch mindestens 200 Zellen ausgewertet.

In den lacZ-transduzierten Zellen wurde ein Anteil von 8,5% mit nukleär lokalisiertem NFATc3-GFP gemessen (Ad-lacZ: $8,5 \pm 0,02\%$). In den Carabin-transduzierten Zellen wurde ein vergleichbarer, nicht signifikant unterschiedlicher Anteil von 11,4% detektiert (Ad-Carabin: $11,4 \pm 0,02\%$; $p=0,207$). Durch adenoviral vermittelter Expression eines konstitutiv aktiven Calcineurin A wurde mit 75,4% eine signifikante Steigerung des Zellanteils mit nukleär lokalisiertem NFATc3-GFP gegenüber lacZ-transduzierten Zellen festgestellt (Ad-Calcineurin: $75,4 \pm 0,02\%$ vs. Ad-lacZ: $8,5 \pm$

0,02%; $p < 0,001$). Die gleichzeitige adenoviral vermittelte Expression von konstitutiv aktivem Calcineurin und Carabin führte zu einem Anteil von 55,9% Zellen mit nukleär lokalisiertem NFATc3-GFP ($55,9 \pm 0,03\%$). Die Calcineurin-Stimulation konnte durch die Carabin-Kotransduktion signifikant inhibiert werden ($p < 0,001$). Carabin hemmte folglich signifikant den NFATc3-GFP-Translokationseffekt unter Calcineurin, während ohne Stimulation, d.h. ohne gesteigerte Calcineurin-Expression kein signifikanter Unterschied in der NFATc3-GFP-Lokalisation festzustellen war (Abb. 3.4).

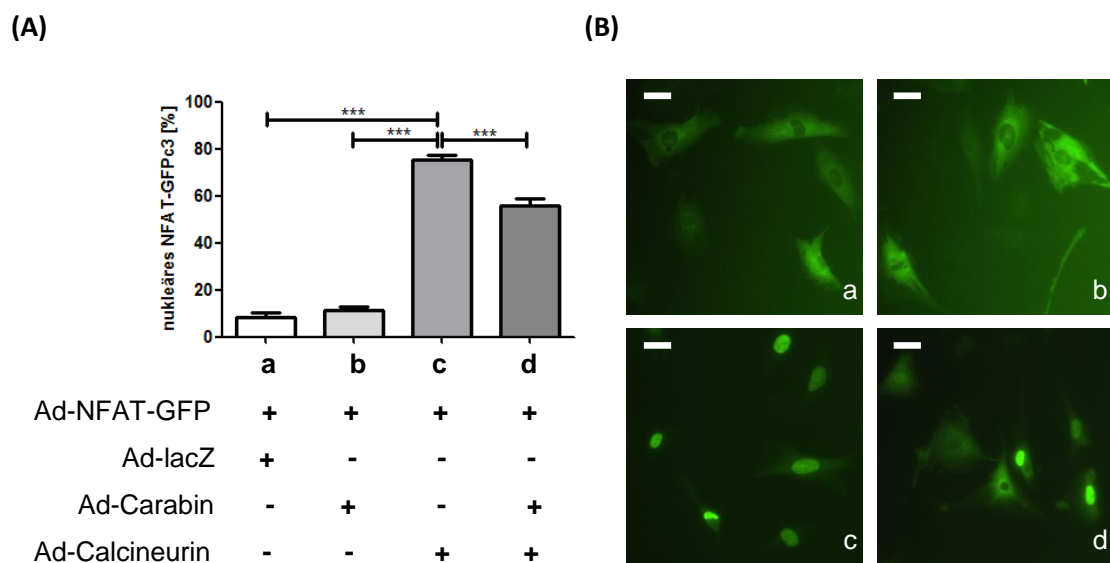


Abb. 3.4: Subzelluläre Lokalisation eines NFATc3-GFP-Fusionsproteins in Abhängigkeit der Carabin-Expression. Zur Untersuchung wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten neonataler Ratten 24 Stunden nach Isolation entsprechend dem unter (A) angegebenen Schema transduziert (Ad-NFAT-GFP MOI 100; Ad-Carabin MOI 0,1; Ad-Calcineurin MOI 50). Nach weiteren 48 Stunden Kultivierung wurden mittels Mikroskop bei 200facher Vergrößerung und unter Verblindung Fotos angefertigt und analysiert. (A) Gesamtergebnis von drei unabhängigen Versuchen ($n=3$). Pro Behandlung und Versuch wurden mindestens 200 Zellen ausgewertet. Durch eine Ad-Calcineurin-Transduktion wurde der Anteil von Zellen mit nukleärer NFAT-Lokalisation im Vergleich zu den lacZ-transduzierten Zellen signifikant erhöht ($p < 0,001$). Dieser Effekt konnte durch eine Ad-Carabin-Kotransduktion signifikant inhibiert werden ($p < 0,001$). Eine gesteigerte Expression von Carabin alleine erzielte keinen Unterschied im Vergleich zu den lacZ-transduzierten Zellen. (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von neonatalen Rattenkardiomyozyten: a) Ad-lacZ-transduzierte Zellen, b) Ad-Carabin-transduzierte Zellen, c) Ad-Calcineurin-transduzierte Zellen, d) Ad-Carabin- und Ad-Calcineurin-transduzierte Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Eichbalken = 10 μm . *** $p < 0,001$.

3.1.4. Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten mittels Western-Blot

Der Einfluss von Carabin auf Calcineurin, und damit auf die Phosphorylierung von NFAT wurde auch mittels Western-Blot untersucht. Hierfür wurden, aufgrund der extrem niedrigen Proteinausbeute aus neonatalen Rattenkardiomyozyten, isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten verwendet.

Um die Untersuchungen in adulten Rattenkardiomyozyten mit einer, deutlich über dem Ausgangsniveau liegende, aber dennoch mäßig gesteigerten Carabin-Expression durchführen zu können, wurde auch in diesen Zellen zunächst das Expressionsniveau bei unterschiedlichen MOI des Carabin-Flag-Adenovirus analysiert. Hierzu wurden Kardiomyozyten unmittelbar nach Isolation mit MOI 0, 0,001, 0,01, 0,1 und 1 transduziert und für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen für weitere 20 Stunden virusfrei kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Im folgenden Western-Blot wurden jeweils die gleichen Gesamtproteinmengen verwendet. Die Carabin-Expression wurde mit einem Anti-Carabin-Antikörper visualisiert. Zur Normalisierung wurde zusätzlich das weitgehend konstant exprimierte Protein GAPDH gefärbt (Abb. 3.5 (A)).

Die Analyse des Western-Blots, der mithilfe des Anti-Carabin-Antikörpers gefärbt wurde, ergab eine distinkte Bande auf der Höhe zwischen 50 und 75 kDa. Carabin war bereits basal, d.h. in nicht transduzierten Kardiomyozyten (MOI 0) nachweisbar. Die Carabin-Expression wurde in Relation zur basalen Carabin-Expression dargestellt. Mit einer MOI von 0,001 wurde eine 1,4fache Expression erzielt. MOI 0,01 zeigte eine 1,39fache und MOI 0,1 eine 1,81fache Expression. Mit einer MOI von 1 wurde eine deutlich höhere, 6,79fache Expression erreicht (Abb. 3.5 (B, C)).

Nach diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren Versuche in adulten Rattenkardiomyozyten eine MOI von 1 festgelegt und verwendet.

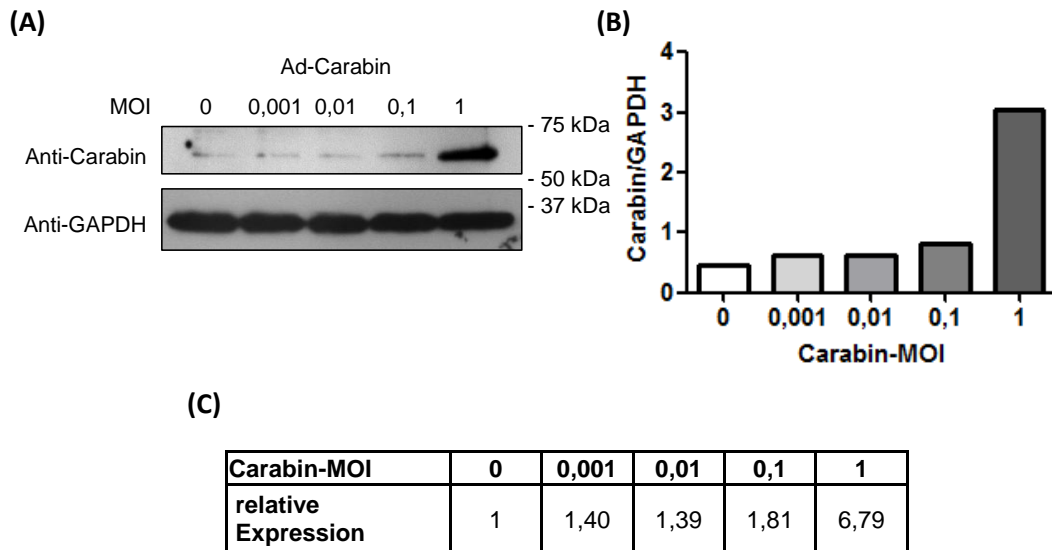


Abb. 3.5: Western-Blot zur Untersuchung der Carabin-Expression nach adenoviraler Transduktion mit unterschiedlichen MOI in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten. (A) Carabin-Proteinexpression in Abhängigkeit der verwendeten MOI. Durch Immunfärbung wurden Carabin und GAPDH markiert. Die Zellen wurden entsprechend dem angegebenen Schema transduziert und nach insg. 24 Stunden Kultivierung geerntet, lysiert, zu proteinkonzentrationsäquivalenten Proben aufbereitet. Anschließend wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt ist die Carabin-Proteinmenge normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. (C) Tabellarische Darstellung der relativen virusabhängigen Carabin-Expression, bezogen auf die endogene Carabin-Expression (MOI 0). Eine Ad-Carabin MOI von 1 zeigt eine deutlich über dem Ausgangsniveau liegende, mäßig gesteigerte 6,97fache Carabin-Expression. Daher wurde diese MOI für alle weiteren Versuche in adulten Rattenkardiomyozyten verwendet.

Für die Western-Blot-Analyse musste weiterhin ein geeigneter phosphorylierungsspezifischer Anti-NFAT-Antikörper (Anti-pNFAT-Antikörper) ermittelt werden. Letztlich wurden fünf verschiedene Antikörper, hinsichtlich ihrer Eignung phosphoryliertes NFAT zu detektieren, untersucht. Für die Analyse wurden Wildtyp- und Carabin-transgene Mäuse verwendet. Die Herzen wurden isoliert und die Vorhöfe entfernt. Danach wurde das ventrikuläre Gewebe wie in 2.2.2 beschrieben aufbereitet und anschließend für die Western-Blot-Analyse verwendet. Um einen optimalen Vergleich durchführen zu können, wurden für alle Western-Blots Proben aus der gleichen Charge verwendet und wie in Abb. 3.6 dargestellt aufgetragen. Alle Antikörper wurden wie in Abb. 3.6 angegeben, in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet.

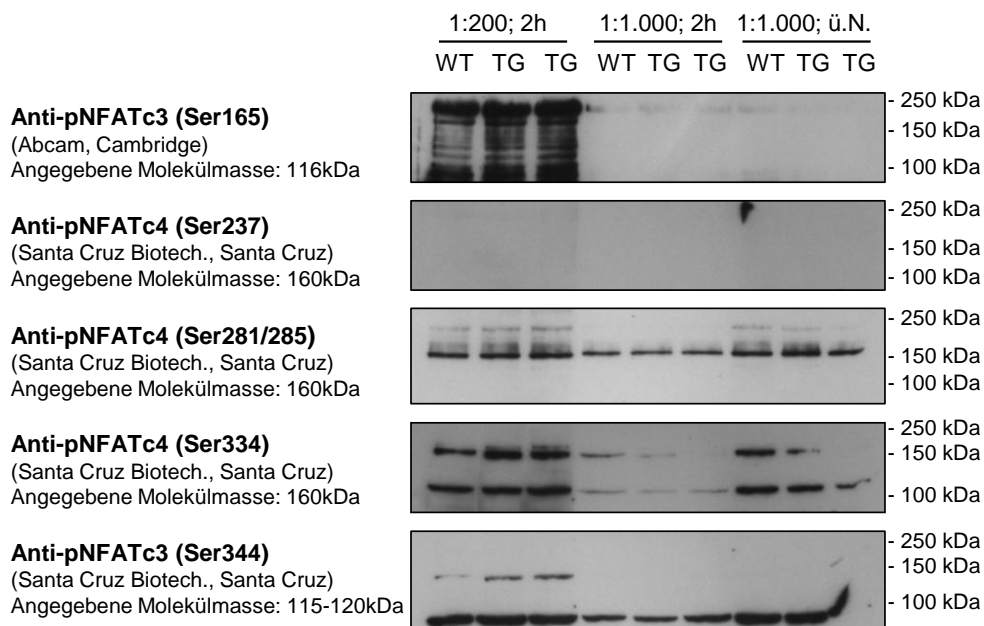


Abb. 3.6: Western-Blot zur Ermittlung eines geeigneten Anti-pNFAT-Antikörpers. Das ventrikuläre Myokardgewebe von Wildtyp- (WT) und Carabin-transgenen (TG) Mäusen wurde homogenisiert und zu proteinkonzentrationsäquivalenten Proben verarbeitet. Angegeben ist der Antikörper, dessen Hersteller und die im jeweiligen Datenblatt angegebene Molekülmasse des Zielproteins, sowie die jeweils verwendete Antikörperkonzentration und Inkubationszeit (ü.N. = über Nacht). Lediglich die Antikörper Anti-pNFATc4(Ser281/285), Anti-pNFATc4(Ser334) und Anti-pNFATc3(Ser344) detektierten ein Protein der jeweils angegebenen Molekülmasse mit ausreichender Spezifität.

Der Anti-pNFATc3(Ser165)-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) detektierte nur bei einer Konzentration von 1:200 und einer Inkubationszeit von zwei Stunden und bewirkte eine Färbung mehrerer Banden in der Höhe zwischen 100 und 250 kDa. Da diese sehr diffus und sehr unspezifisch erschienen, wurde dieser Antikörper nicht weiter verwendet.

Der Anti-pNFATc4(Ser237)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) färbte in keiner der verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten Banden in der Höhe zwischen 100 und 250 kDa und wurde daher ebenfalls nicht weiter verwendet.

Der Anti-pNFATc4(Ser281/285)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) färbte in allen Konzentrationen und Inkubationszeiten zwei distinkte Banden zwischen 150 und 250 kDa. Dieser Antikörper wurde jedoch nach weiterführenden Tests nicht mehr verwendet, da das Signal im Mittel zu schwach erschien, um mögliche Unterschiede darstellen zu können.

Der Anti-pNFATc4(Ser334)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) färbte in alle getesteten Konzentrationen und Inkubationszeiten eine distinkte Bande zwischen 150 und 250 kDa und wurde daher zunächst weiter getestet. Auch der Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) färbte bei einer Konzentration 1:200 und einer Inkubationszeit von 2 Stunden eine distinkte Bande zwischen 100 und 150 kDa und wurde ebenfalls intensiver getestet.

Weitere vergleichende Western-Blots mit zusätzlichen Proben aus ventrikulärem Myokardgewebe von Mäusen zeigten eine zuverlässigere und deutlichere pNFAT-Detektion durch den Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg), so dass dieser für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

Für die Analyse der NFAT-Phosphorylierung im Western-Blot wurden adulte Rattenkardiomyozyten nach Isolation entsprechend Abb. 3.7 (A) transduziert. Durch Kotransduktion eines lacZ-Adenovirus wurde die Gesamtvirus-Exposition jeweils angeglichen. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben weiter behandelt und aufbereitet und für die Analyse verwendet. Das phosphorylierte NFATc3 wurde mit dem Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) visualisiert. Zur Normalisierung auf die eingesetzte Proteinmenge wurde zusätzlich GAPDH gefärbt (Abb. 3.7 (A)). Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3).

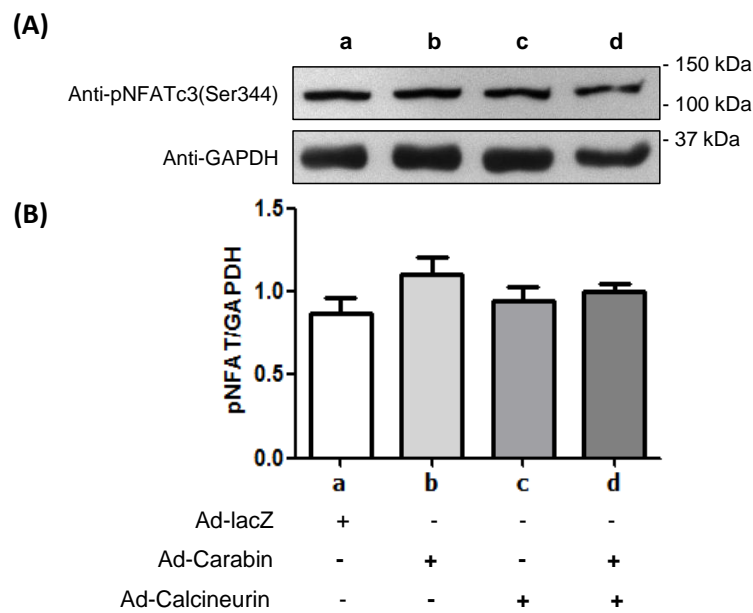


Abb. 3.7: Western-Blot zur Untersuchung der NFAT-Phosphorylierung in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten. Adulte Rattenkardiomyozyten wurden nach Isolation wie in (B) angegeben adenoviral transduziert (Ad-Carabin MOI 1, Ad-Calcieneurin MOI 50) und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 20 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert und proteinkonzentrationsäquivalente Proben für den Western-Blot verwendet. (A) Western-Blot mit Anti-pNFATc3(Ser344)- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Der Graph zeigt die pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge, sowie das Transduktionsschema. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der pNFAT-Proteinmenge gemessen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In den lacZ-transduzierten Zellen wurde eine mittlere, auf die GAPDH-Proteinmenge normalisierte, pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge von $0,87 \pm 0,1$ und in den Carabin-transduzierten Zellen von $1,10 \pm 0,11$ gemessen. Die Calcineurin-transduzierten Zellen wiesen eine pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge von $0,95 \pm 0,08$ auf. Unter Kotransduktion von Carabin und Calcineurin ergab die Analyse der Zellen eine pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge von $1,0 \pm 0,05$. Im Western-Blot konnte damit keine signifikant verminderte pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge unter gesteigerter Calcineurin-Expression gemessen werden. Die Carabin-Transduktion erzielte ohne und mit gesteigerter Calcineurin-Expression ebenfalls keine messbaren, signifikanten Unterschiede der pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge.

3.1.5. Einfluss von Carabin auf die Aktivierung der MAPK-Signalwege nach Stimulation mit Phenylephrin in isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten

Eine Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweg führt über Ras/Raf-Interaktion zur Phosphorylierung von MEK (MAP/ERK-Kinase = MAPKK) welches wiederum ERK (Extracellular-Signal-Regulated-Kinase = MAPK) phosphoryliert. Carabin hat in stimulierten T-Lymphozyten einen inhibierenden Effekt auf diesen Signalweg, der eine verminderte ERK-Phosphorylierung zur Folge hat.

Um den Einfluss von Carabin auf den ERK/MAPK-Signalweg in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden sowohl in neonatalen, als auch in adulten ventrikulären Rattenkardiomyozyten Western-Blot-Analysen von lacZ-transduzierten und Carabin-transduzierten Zellen durchgeführt. Diese zeigten keine signifikanten Unterschiede in der pMEK1/2- und pERK1/2-Proteinmenge (nicht gezeigt).

Daraufhin wurden Untersuchungen mit Phenylephrin (PE) durchgeführt, um eine α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Stimulation der ERK/MAPK-Signalkaskade zu erzielen. Der optimale Zeitraum um eine Aktivierung und deren Kinetik nachzuweisen wurde zunächst in Vorversuchen ermittelt (nicht gezeigt).

In folgendem Versuch wurde der Zeitverlauf der MEK-, bzw. ERK-Aktivierung nach PE-Stimulation verglichen. Aufgrund der geringen Proteinmengen in neonatalen Rattenkardiomyozyten und der entsprechend hohen Zellzahlen, die für diesen Versuch notwendig gewesen wäre, wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten verwendet. Diese wurden unmittelbar nach der Isolation adenoviral transduziert. Hierzu wurden Zellen mittels Carabin-Adenovirus (MOI 1) und Kontrollzellen mit einer äquivalenten lacZ-Adenoviruslast transduziert. Nach vier Stunden Inkubation wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 20 Stunden kultiviert (2.2.1.5). Anschließend wurden die Zellen mittels Phenylephrin mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$

zwischen 0 und 15 Minuten lang stimuliert, um einen zeitlichen Verlauf der MAPK-Aktivierung darstellen zu können. Im Anschluss wurden die Zellen zügig geerntet und lysiert und wie in 2.2.2 erläutert für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Für die Immunfärbung wurde ein Anti-pMEK1/2-Antikörper verwendet. Die Messergebnisse wurde auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.8). Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3).

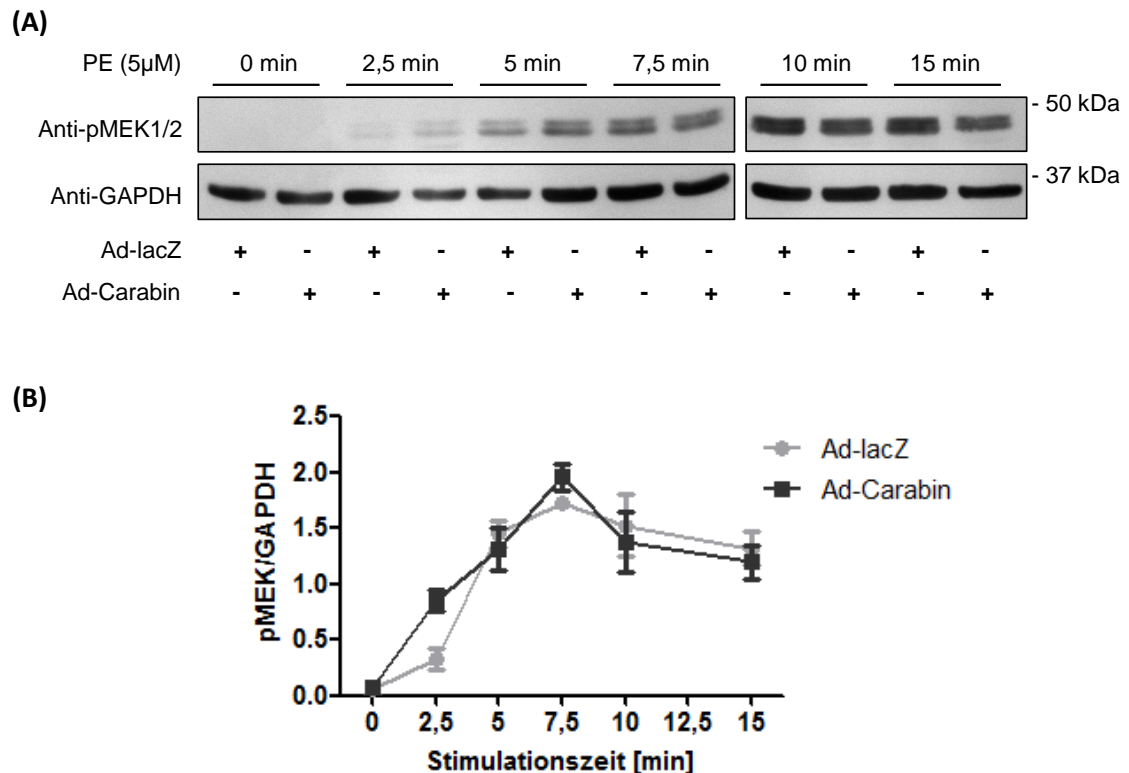


Abb. 3.8: Western-Blot zur Untersuchung der Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten. Adulte ventrikuläre Rattenkardiomyozyten wurden nach Isolation wie in (A) angegeben adenoviral transduziert (Ad-Carabin MOI 1) und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneuert und die Zellen weitere 20 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauern mit Phenylephrin (5 µM) stimuliert und im Anschluss geerntet, lysiert und proteinkonzentrationsäquivalente Proben für den Western-Blot verwendet. (A) Western-Blot mit Anti-pMEK1/2- und Anti-GAPDH-Immundetektion. Zusätzlich sind das Transduktionsschema und die Stimulationszeiten angegeben. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten aus drei unabhängigen Versuchen. Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf der pMEK1/2-Proteinmenge normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge, jeweils für die Carabin- und die Kontrollgruppe. Durch PE konnte eine signifikante Erhöhung der MEK1/2-Phosphorylierung erzielt werden (0 min vs. 5 min, 7,5 min, 10 min, 15 min: $p < 0,001$ (Ad-lacZ), $p < 0,01$ (Ad-Carabin)). Eine Ad-Carabin-Transduktion erzielte nur zum Zeitpunkt 2,5 min einen signifikanten Unterschied in der Kinetik der MEK-Phosphorylierung, jedoch nicht zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In den lacZ-transduzierten Zellen konnte unter PE-Stimulation ab 5 Minuten ($1,14 \pm 0,40$), eine signifikante Erhöhung der pMEK1/2-Proteinmenge im Vergleich zu 0 Minuten ($0 \pm 0,0$) gemessen

werden ($p < 0,001$). Dieser Unterschied blieb im weiteren zeitlichen Verlauf signifikant (7,5 min: $1,68 \pm 0,02$; 10 min: $1,39 \pm 0,17$; 15 min: $1,51 \pm 0,33$; $p < 0,001$).

In den Carabin-transduzierten Zellen wurde unter Stimulation ebenfalls ab 5 Minuten ($1,19 \pm 0,30$) eine signifikante Erhöhung der pMEK1/2-Proteinmenge im Vergleich zu 0 Minuten ($0,01 \pm 0,01$) gemessen ($p < 0,01$). Auch diese Erhöhung blieb im zeitlichen Verlauf signifikant (7,5 min: $1,96 \pm 0,20$; 10 min: $1,31 \pm 0,21$; 15 min: $1,13 \pm 0,10$; $p < 0,01$).

Zwischen den lacZ-transduzierten und den Carabin-transduzierten Zellen ergab die Analyse zum Zeitpunkt 2,5 min einen signifikanten Unterschied, wobei die pMEK1/2-Proteinmenge in den lacZ-transduzierten Zellen signifikant geringer war, als in den Carabin-transduzierten Zellen (Ad-lacZ: $0,32 \pm 0,14$ vs. Ad-Carabin: $0,85 \pm 0,31$; $p < 0,05$). Zu allen weiteren Zeitpunkten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Durch PE wurde folglich eine signifikante Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges, bzw. signifikante Erhöhung der pMEK1/2-Proteinmenge erzielt. Dieser Effekt wurde durch eine gesteigerte Carabin-Expression nicht inhibiert.

Die Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade wurde in den gleichen Proben auch für ERK1/2 untersucht ($n=3$). Für die Immunfärbung wurde ein Anti-pERK1/2-Antikörper verwendet (Abb. 3.9 (A)). Danach wurden die Antikörper von der Nitrozellulose-Membran herunter gelöst und die Membran mit einem Anti-ERK1/2-Antikörper neu inkubiert, um die Gesamt-ERK1/2-Menge zu bestimmen. Die pERK1/2-Proteinmenge wurde auf die ERK1/2-Proteinmenge normalisiert (Abb. 3.9 (B)).

In den lacZ-transduzierten Zellen konnte unter PE-Stimulation keine signifikante Erhöhung der pERK1/2-Proteinmenge im Vergleich zu 0 Minuten gemessen werden. Es war lediglich eine Tendenz zu erkennen, die mit der Kinetik der MEK-Aktivierung vergleichbar war.

In der Carabingruppe wurde unter Stimulation ebenfalls keine signifikante Erhöhung der pERK1/2-Proteinmenge gemessen. Auch hier war lediglich eine zur Kinetik der MEK-Aktivierung vergleichbare Tendenz zu erkennen.

Zwischen den lacZ-transduzierten und den Carabin-transduzierten Zellen gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der pERK1/2-Proteinmenge (0 min: $0,71 \pm 0,11$ vs. $0,79 \pm 0,11$; 2,5 min: $1,09 \pm 0,12$ vs. $1,08 \pm 0,06$; 5 min: $0,93 \pm 0,10$ vs. $1,06 \pm 0,09$; 7,5 min: $1,17 \pm 0,08$ vs. $1,36 \pm 0,12$; 10 min: $1,02 \pm 0,07$ vs. $1,18 \pm 0,06$; 15 min: $0,88 \pm 0,01$ vs. $0,97 \pm 0,09$).

Auf ERK-Ebene konnte keine signifikante Stimulation gemessen werden. Die Expressionssteigerung von Carabin führte zu keiner signifikanten Veränderung.

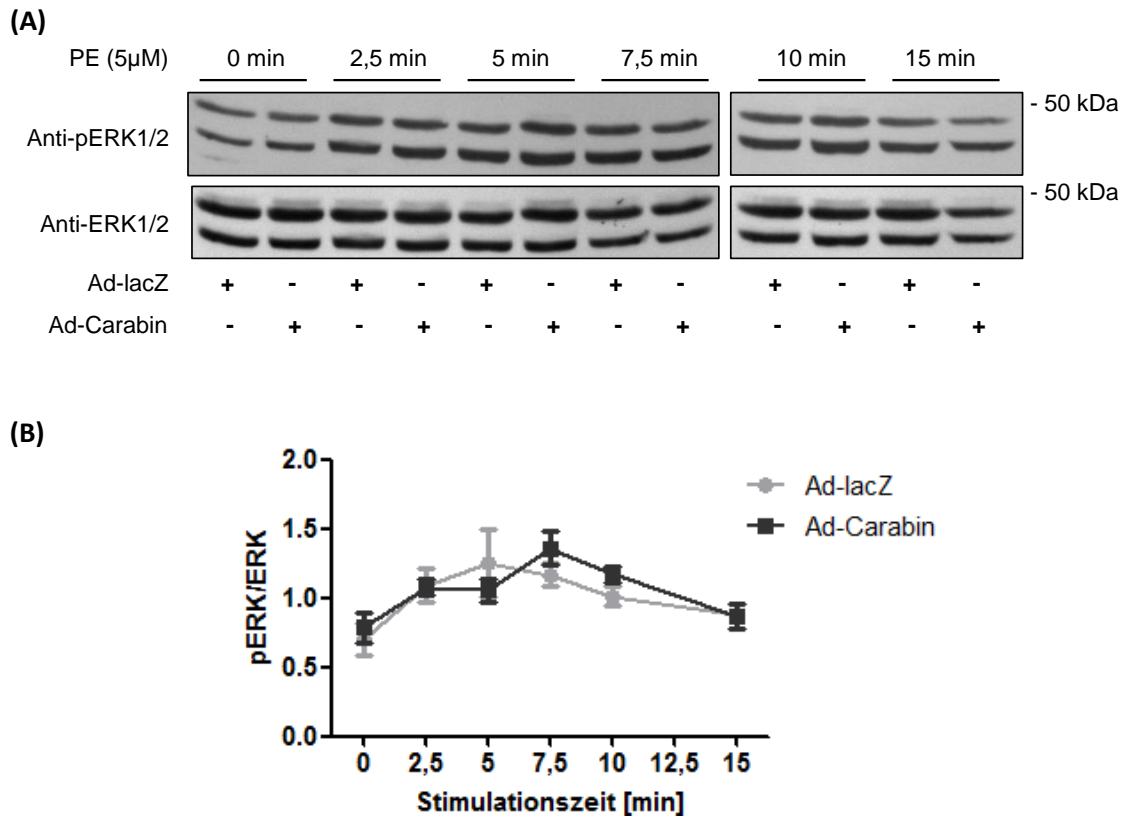


Abb. 3.9: Western-Blot zur Untersuchung der Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs in isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten. Adulte ventrikuläre Rattenkardiomyozyten wurden nach Isolation wie in (A) angegeben adenoviral transduziert (Ad-Carabin MOI 1) und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneuert und die Zellen weitere 20 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen unterschiedlich lange mit Phenylephrin (5 μ M) stimuliert (A) und im Anschluss geerntet, lysiert und proteinkonzentrationsäquivalente Proben für den Western-Blot verwendet. Die Nitrozellulose-Membran wurde nach Immunfärbung mit einem Anti-pERK-Antikörper und Bilderstellung gewaschen, und mit einem Anti-ERK-Antikörper neu inkubiert. (A) Western-Blots mit Anti-pERK1/2- und Anti-ERK1/2-Immundetektion. Zusätzlich sind das Transduktionsschema und die Stimulationszeiten angegeben. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten aus drei unabhängigen Versuchen. Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf der pERK1/2-Proteinmenge normalisiert auf die ERK1/2-Proteinmenge. Durch PE-Stimulation konnte keine signifikante Zunahme der pERK1/2-Proteinmenge erzielt werden. Eine gesteigerte Carabin-Expression erzielte keinen signifikanten Unterschied in der Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu lacZ-transduzierten Zellen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.2. Untersuchungen der durch Carabin beeinflussten Signaltransduktion in Carabin-transgenen Mäusen

3.2.1. Vergleich der kardialen Carabin-Proteinexpression verschiedener Carabin-transgener Mauslinien im Western-Blot

Um den Einfluss von Carabin auch *in vivo* zu untersuchen, wurden durch Herrn Dr. med. T. Seidler und Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (beide: Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) drei Carabin-transgene Mauslinien generiert und zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die Carabin-Expression untersucht, um eine geeignete Mauslinie mit einer möglichst moderat gesteigerten Carabin-Expression auszuwählen.

Hierzu wurden aus mindestens vier adulten Nachkommen jeder Founder-Linie und aus Wildtypgeschwistern Herzen isoliert und die Atrien entfernt. Anschließend wurden die Ventrikel homogenisiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Für die folgende Western-Blot-Analyse wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt. Die Carabin-Proteinmengen wurden zudem als Quotient der entsprechenden GAPDH-Proteinmengen dargestellt (Abb. 3.10).

Die Analyse ergab in den Wildtypmäusen ein Carabin/GAPDH-Verhältnis von $0,1 \pm 0,02$ ($n=10$). Die Linie 34 zeigte mit einem Carabin/GAPDH-Verhältnis von $1,24 \pm 0,05$ ($n=6$) die geringste Expressionssteigerung (12,03fach). Die Linie 26 wies ein Carabin/GAPDH-Verhältnis von $1,53 \pm 0,15$ ($n=4$; \cong 14,48fache Expression) auf und die Linie 35 von $1,58 \pm 0,17$ ($n=8$; \cong 15,36fache Expression).

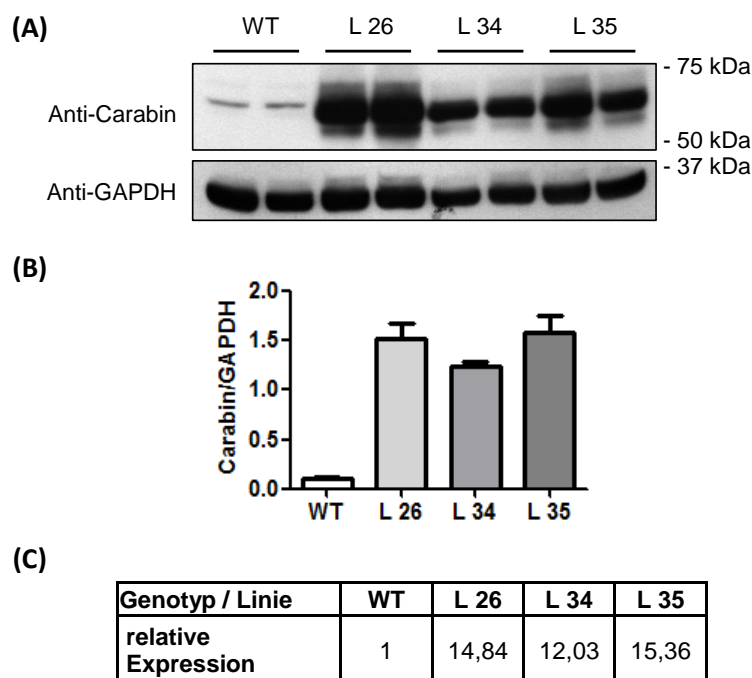


Abb. 3.10: Western-Blot zur Untersuchung der Carabin-Expression in Carabin-transgenen Mauslinien. Ventrikuläres Gewebe wurde aus Mäuseherzen isoliert und homogenisiert. Für die Immundetektion wurde ein Anti-Carabin-Antikörper verwendet. Die Expression wurde auf die GAPDH-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-Carabin- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. $n = 10$ (WT), 4 (L26), 6 (L34), 8 (L35). (C) Tabellarische Darstellung der relativen Carabin-Expression, bezogen auf die Expression in Wildtyp-Mäusen. Die Linie 34 zeigte mit Faktor 12,03 die mildeste Carabin-Expressionssteigerung und wurde daher expandiert und für alle folgenden Versuche verwendet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Um das Expressionsniveau des exogenen Carabins isoliert zu analysieren, wurde aus den gleichen Proben eine Western-Blot-Analyse mit einer Flag-Immundetektion durchgeführt. Die Flag-Proteinmengen wurden ebenfalls auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.11).

Die Untersuchung auf Flag-Expression ergab in den Wildtypmäusen erwartungsgemäß kein detektierbares Signal. Die Linie 26 ergab ein Flag/GAPDH-Verhältnis von $1,53 \pm 0,15$ ($n=4$), die Linie 34 von $1,24 \pm 0,05$ ($n=6$) und die Linie 35 von $1,58 \pm 0,17$ ($n=8$). Die Linie 34 zeigte auch in diesem Versuch die geringste Expressionssteigerung von Carabin.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Linie 34 expandiert und für alle weiteren *in-vivo*-Experimente verwendet.

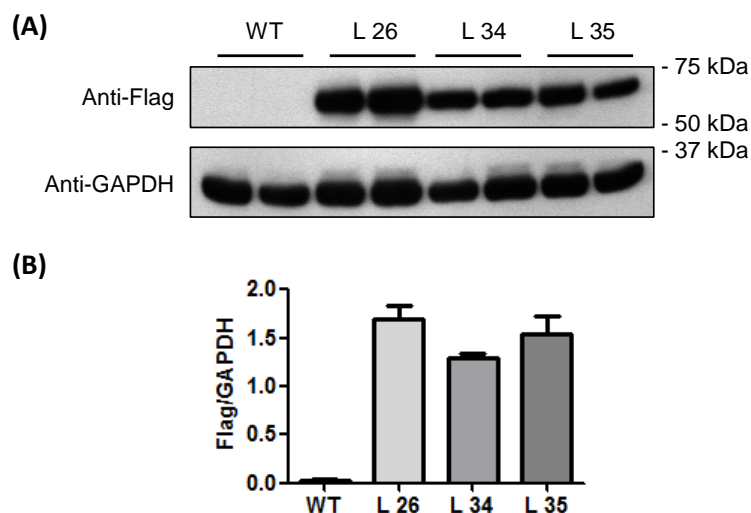


Abb. 3.11: Western-Blot zur Untersuchung der Flag-Expression in generierten Carabin-transgenen Mauslinien. Für die Untersuchung wurden die gleichen Proben wie in Abb. 3.10 verwendet. Für die Immundetektion wurde ein Anti-Flag-Antikörper verwendet. Die Expression wurde auf die GAPDH-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-Flag- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. $n = 10$ (WT), 4 (L26), 6 (L34), 8 (L35). Die Linie 34 zeigte die geringste Flag-Expression und wurde daher expandiert und für alle folgenden Versuche verwendet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.2.2. Untersuchungen in Carabin-transgenen Mäusen

3.2.2.1. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Carabin mittels Immunhistochemie

Um auch histologisch die subzelluläre Lokalisation von Carabin zu untersuchen, wurden mithilfe eines Mikrotoms ca. 6 μm dicke Schnitte von Ventrikeln aus Mäuseherzen angefertigt. Für diesen Versuch wurden Wildtypmäuse und Carabin-transgene Mäuse verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte mithilfe eines Anti-Flag-Antikörpers gefärbt. Eine Färbung mit dem Anti-Carabin-Antikörper gelang nicht. Dieser schien folglich für eine immunhistochemische Analyse ungeeignet. Nach der Färbung wurden die Schnitte bei 200facher Vergrößerung mittels Mikroskop fotografiert (Abb. 3.12).

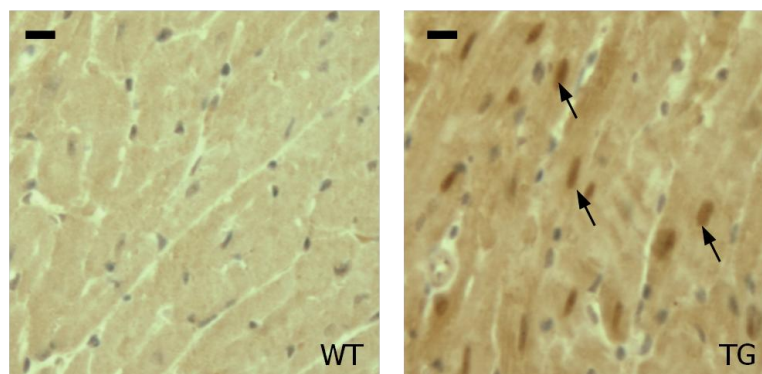


Abb. 3.12: Immunhistochemische Analyse der subzellulären Carabin-Lokalisation in Mäusen. Für die Untersuchung wurden histologische Schnitte aus kardioventrikulärem Gewebe von Wildtypmäusen (WT) und Carabin-transgenen Mäusen (TG) angefertigt und verwendet. Die Färbung wurde mithilfe eines Anti-Flag-Antikörpers durchgeführt (Chromogen DAB, braun). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt (blau). Die Bilder zeigen jeweils repräsentative Ausschnitte der fotografierten Präparate. Die Pfeile zeigen exemplarisch die kardiomyozytären Zellkerne. Eichbalken = 10 µm

Die Färbung zeigt, dass das Carabin-Flag-Signal in den Präparaten der Carabin-transgenen Mäuse ubiquitär in den Kardiomyozyten lokalisiert ist. Im Vergleich zu den Präparaten der Wildtypmäuse war eine deutliche Anfärbung (braun) des Zytoplasms und der myokardialen Zellkerne zu beobachten (Abb. 3.12). Erwartungsgemäß konnte in den Wildtypmäusen kein Flag-Protein detektiert werden. Da die Detektion von Carabin mithilfe des verwendeten Anti-Carabin-Antikörpers im Rahmen der Immunhistochemie nicht gelang, konnten entsprechend keine Bilder zum Vergleich zur endogenen Carabin-Lokalisation angefertigt werden.

3.2.2.2. Untersuchung der Morphometrie

Der Einfluss von Carabin auf das Wachstum von ventrikulären Kardiomyozyten wurde in ein Jahr alten Carabin-transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistern untersucht. In jedem Tier wurde echokardiographisch, in der kardialen Längsachsen-Darstellung, die enddiastolische Dicke des Septums ausgemessen. Die Untersuchungen wurden durch Frau K. Koschel (Translationale Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung.

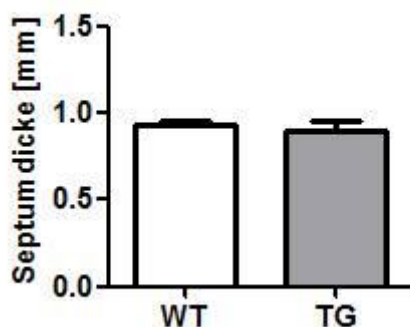


Abb. 3.13: Echokardiographische Untersuchungen der basalen Septumdicke in Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. In ein Jahr alten Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen wurde echokardiographisch die enddiastolische Dicke des Septums in Darstellung der kardialen Längsachse, gemessen. Der Graph zeigt die kumulativen Daten (WT: n=12; TG: n=12). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Septumdicke gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die Untersuchung wurde von Frau K. Koschel (Translationale Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

Die Messungen ergaben in den Wildtypmäusen eine mittlere Septumdicke von $0,93 \pm 0,03\text{mm}$ (n=12) und in den Carabin-transgenen Tieren von $0,91 \pm 0,05\text{mm}$ (n=12) (Abb. 3.13). Es gab keinen signifikanten Unterschied, sodass die gesteigerte Carabin-Expression folglich keinen Einfluss auf die Septumdicke in Mäuseherzen hatte.

In den gleichen Tieren wurden auch die Herzgewichte verglichen. Das Körpergewicht der jeweiligen Tiere wurde bestimmt und anschließend wurden die Herzen isoliert und gewogen. Die Herzgewichte wurden auf das jeweilige Körpergewicht normalisiert (Tab. 3.1). Die Isolation und Messung erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung.

	Körpergewicht [g]	Herzgewicht/ Körpergewicht [mg/g]
WT n=12	34,02 ± 4,35	3,53 ± 0,53
TG n=12	34,43 ± 5,00	3,79 ± 0,42

Tab. 3.1: Analyse der Herzgewichte von Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. Aus ein Jahr alten Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen wurden die Körpergewichte gemessen und anschließend die Herzen isoliert und gewogen. Die Tabelle zeigt die kumulativen Daten. Angeben sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. Das Herzgewicht wurde auf das jeweilige Körpergewicht normalisiert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beim mittleren Herzgewicht gemessen.

Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht der Wildtypmäuse lag im Mittel bei $3,53 \pm 0,53\text{mg/g}$ ($n=12$). Die Carabin-transgenen Mäuse hatten im Mittel ein Herz-/Körpergewicht-Verhältnis von $3,79 \pm 0,42\text{mg/g}$ ($n=12$). Die Analyse der Herzgewichte ergab keine signifikanten Unterschiede. Die gesteigerte Carabin-Expression hatte keinen Einfluss auf das Herzgewicht.

Nach der Gewichtsanalyse wurden die Atrien der Herzen entfernt und ein Teil des gewonnenen kardioventrikulären Gewebes für eine histologische Untersuchung verwendet. Mithilfe eines Mikrotoms wurden $6\mu\text{m}$ dünne histologische Schnitte angefertigt und anschließend eine Färbung mit WGA (wheat germ agglutinin) durchgeführt, um die Zellgrenzen darzustellen. Nachfolgend wurden die Schnitte bei 200facher Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskop fotografiert und danach die Durchmesser der Kardiomyozyten ausgemessen und analysiert. Von jedem Tier wurden mindestens 100 Zellen ausgemessen (Abb. 3.14). Die Anfertigung der Fotos und die Analyse erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung.

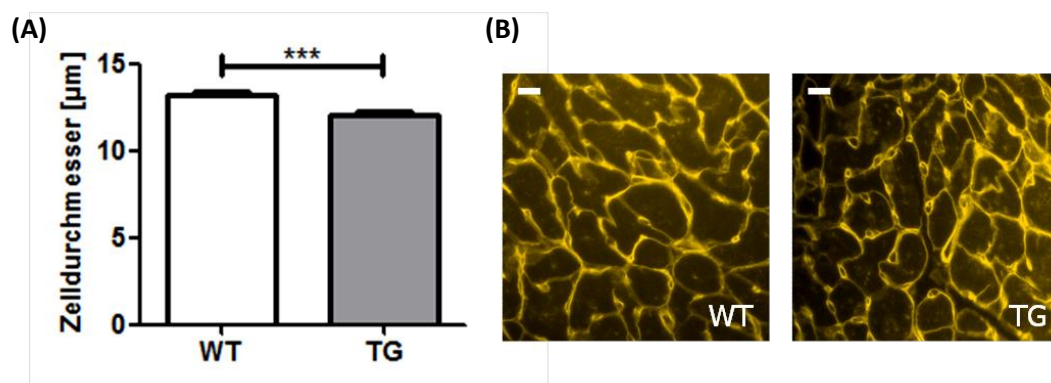


Abb. 3.14: Analyse der Zelldiameter von Kardiomyozyten in histologischen Schnitten mittels WGA-Färbung. Aus Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen wurde das kardioventrikuläre Gewebe isoliert und histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden nach WGA-Färbung (gelb) im Mikroskop fotografiert und anschließend analysiert. (A) Darstellung der kumulativen Daten. Pro Tier wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet (WT: $n=4$; TG: $n=4$). Die Zelldiameter der Carabin-transgenen Mäuse waren signifikant geringer als die der Wildtypmäuse ($p<0,001$). (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von WGA-gefärbten Schnitten aus kardioventrikulärem Mausgewebe. WT=Wildtypmaus, TG=Carabin-transgene Maus. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Eichbalken = $10\mu\text{m}$. *** $p<0,001$.

Die Analyse ergab in den Wildtypmäusen einen mittleren Zelldiameter von $13,22 \pm 0,18\mu\text{m}$ ($n=4$). In den Carabin-transgenen Mäusen wurde ein mittlerer Zelldiameter von $12,10 \pm 0,18\mu\text{m}$ ($n=4$) ermittelt. Der durchschnittliche Zelldiameter der Kardiomyozyten aus den Carabin-transgenen Mäusen war signifikant kleiner ($p<0,001$).

3.2.2.3. Untersuchung des Calcineurin/NFAT- und des ERK/MAPK-Signalwegs

Zur Untersuchung der Signaltransduktionswege wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Mäusen der Carabin-transgenen Linie isoliert und homogenisiert und wie in 2.2.2 beschrieben aufbereitet. Für die Western-Blot-Analysen wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt.

Zur Untersuchung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs wurde mittels Western-Blot-Analyse die Proteinmengen von phosphoryliertem NFAT in Herzen Carabin-transgener Mäuse und Wildtypgeschwistern verglichen. Basierend auf den Ergebnisse des Versuchs 3.1.4 (Abb. 3.6) wurde der Antikörper Anti-pNFATc3(Ser344) (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) zur Visualisierung des phosphorylierten NFAT verwendet. Die Messwerte wurden auf die GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.15).

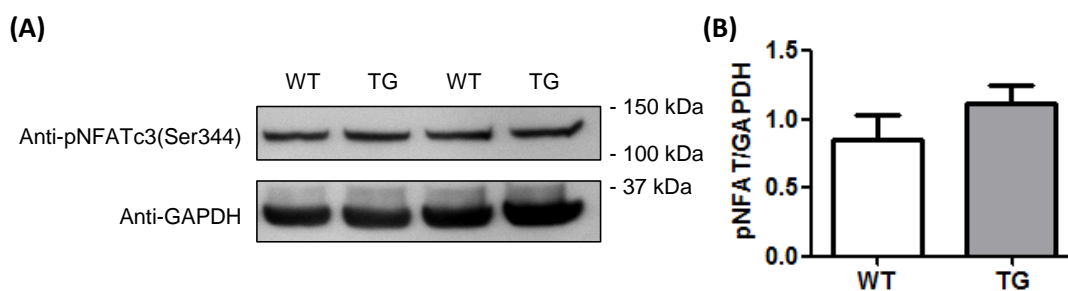


Abb. 3.15: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die pNFATc3-Proteinmenge in unstimuliertem kardioventrikulärem Mausegewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Mäusen isoliert und homogenisiert. Von den Proben wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die Analyse verwendet. Für die Immundetektion wurde ein Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) verwendet. Die Expression wurde auf die GAPDH-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-pNFATc3(Ser344)- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen. n = 4 (WT), 7 (TG). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge festgestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Analyse ergab in Wildtypmäusen eine mittlere, auf die GAPDH-Proteinmenge normalisierte, pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge von $0,85 \pm 0,18$ (n=4) und in Carabin-transgenen Mäusen von $1,12 \pm 0,13$ (n=7). Es wurde damit kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die gesteigerte Carabin-Expression hatte folglich keinen messbaren Einfluss auf die pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge in kardioventrikulärem Mausegewebe.

In den gleichen Proben wurde der Einfluss von Carabin auf den ERK/MAPK-Signalweg untersucht. Hierzu wurde mittels Western-Blot-Analyse die pMEK-Proteinmenge zwischen den Wildtyp- und

Carabin-transgenen Mäusen verglichen. Zur pMEK-Detektion wurde ein Anti-pMEK1/2-Antikörper verwendet. Die Messergebnisse wurden auf die jeweiligen MEK1/2-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.16).

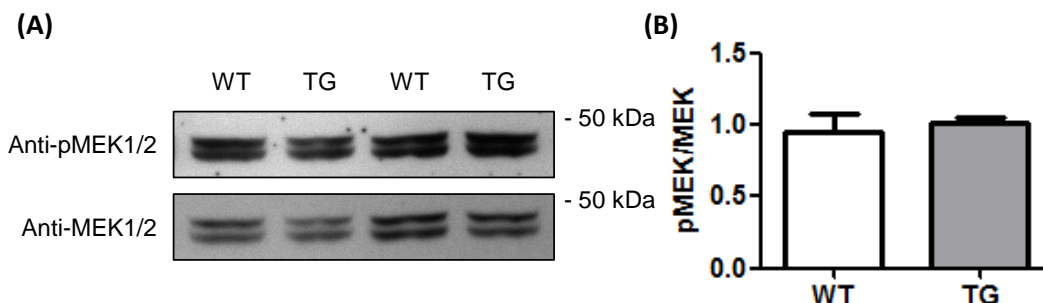


Abb. 3.16: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die pMEK-Proteinmenge in kardioventrikulärem Mausegewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Mäusen isoliert und homogenisiert. Von den Proben wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die Analyse verwendet. Für die Immundetektion wurde ein Anti-pMEK1/2-Antikörper verwendet. Anschließend wurde die Antikörper von der Nitrocellulosemembran gewaschen und die Membran mit einem Anti-MEK1/2-Antikörper neu inkubiert. Die Messergebnisse wurden auf die MEK-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-pMEK1/2- und Anti-MEK1/2-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die MEK-Proteinmenge. WT: n=4; TG: n=7. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der pMEK1/2-Proteinmenge gemessen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Analyse ergab in Wildtypmäusen eine mittlere, auf die GAPDH-Proteinmenge normalisierte, pMEK1/2-Proteinmenge von $0,95 \pm 0,13$ (n=4) und in Carabin-transgenen Mäusen von $1,01 \pm 0,05$ (n=7). Damit wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt, sodass die gesteigerte Carabin-Expression ebenfalls keinen Einfluss auf die pMEK1/2-Proteinmenge in kardioventrikulärem Mausegewebe erzielte.

3.2.3. Untersuchung von Carabin-transgenen Mäusen mit implantierten, Angiotensin-II-beladenen, osmotischen Minipumpen

3.2.3.1. Untersuchung der Morphometrie

Weiterführend wurden analoge Untersuchungen in Angiotensin-II-stimulierten Mäusen durchgeführt. Zur Stimulation einer myokardialen Hypertrophie, wurden Carabin-transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistern mikroosmotische Pumpen implantiert. Diese wurden zuvor mit Angiotensin-II beladen, sodass eine kontinuierliche Abgabe von 3mg/kg/d Angiotensin-II über 14

Tage erzielt wurde. Zur Kontrolle diente eine sham-Gruppe, deren Tieren an gleicher Lokalisation ein gleichgroßes Silikonstück implantiert wurde. Die Operationen wurden von Frau Dr. rer. nat. C. Grebe (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Die Tiere waren im Mittel 15 Wochen alt.

Noch während der Stimulationszeit (am 10. Tag *post operationem*) wurden durch Frau J. Spitalieri (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) echokardiographische Untersuchungen durchgeführt, um mithilfe dieser Daten den kardialen Effekt der Angiotensin-II-Infusion *in vivo* zu analysieren (Abb. 3.17). Hierbei wurde in der kardialen Längsachsen-Darstellung, die enddiastolische Dicke des Septums ausgemessen. Die Untersuchungen erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung.

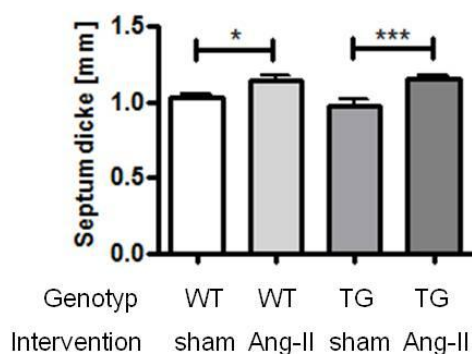


Abb. 3.17: Echokardiographische Untersuchungen der Septumdicke in Angiotensin-II-stimulierten Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen wurden entweder mit Angiotensin-II beladene osmotische Minipumpen, oder als Kontrolle ein Silikonstück (sham-Gruppe) implantiert. Nach 10 Tagen wurde bei den Tieren echokardiographisch die enddiastolische Dicke des Septums in Darstellung der kardialen Längsachsen, gemessen. Der Graph zeigt die kumulativen Daten (WT(sham): n=6; WT(Ang-II): n=7; TG(sham): n=6; TG(Ang-II): n=7). Durch Angiotensin-II-Stimulation konnte sowohl in Wildtypmäusen ($p < 0,05$), als auch in Carabin-transgenen Mäusen ($p < 0,001$) eine signifikante Zunahme der Septumdicke ermittelt werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Die Untersuchungen wurden durch Frau J. Spitalieri (Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

Die Analyse ergab für die Wildtypmäuse eine signifikante Zunahme der Septumdicke von $1,03 \pm 0,02$ mm (n=6) in der sham-Gruppe, zu $1,15 \pm 0,03$ mm (n=7, $p < 0,05$) in der Angiotensin-II-Gruppe. In den Carabin-transgenen Mäusen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Septumdicke von $0,97 \pm 0,04$ mm (n=6) in der sham-Gruppe, zu $1,16 \pm 0,02$ mm (n=7, $p < 0,001$) in der Angiotensin-II-Gruppe.

Durch die Stimulation mit Angiotensin-II konnte demnach eine signifikante Septumhypertrophie sowohl bei Wildtypmäusen, als auch bei Carabin-transgenen Mäusen erzielt werden. Dieses

Wachstum wurde durch die gesteigerte Carabin-Expression in den transgenen Tieren nicht beeinflusst.

Nach 14 Tagen (postoperativ) wurden die Herzen der Tiere isoliert und gewogen. Zur Normalisierung wurden zusätzlich jeweils das Gesamt-Körpergewicht und die Tibialänge bestimmt (Tab. 3.2). Die Isolationen und die Bestimmung der Gewichte erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung.

	Körpergewicht [g]	Tibialänge [mm]	Herzgewicht/ Körpergewicht [mg/g]	Herzgewicht/Tibialänge [mg/mm]
WT (sham) n=6	25,82 ± 3,17	1,78 ± 0,08	5,97 ± 0,59	86,28 ± 6,62
TG (sham) n=9	26,58 ± 4,05	1,8 ± 0,05	6,08 ± 0,50	89,36 ± 10,87
WT (Ang-II) n=8	27,48 ± 3,26	1,75 ± 0,07	5,84 ± 0,36	91,79 ± 11,27
TG (Ang-II) n=12	28,11 ± 2,05	1,78 ± 0,05	6,20 ± 0,54	98,33 ± 12,36

Tab. 3.2: Analyse der Herzgewichte von Angiotensin-II-stimulierten und sham-Mäusen. Wildtyp- und Carabin-transgene Mäuse wurden entweder mit Angiotensin-II beladene osmotische Minipumpen, oder als Kontrolle ein gleichgroßes Silikonstück implantiert. Nach 14 Tagen wurden die Körpergewichte gemessen und anschließend die Herzen isoliert und gewogen, sowie die Tibialängen bestimmt. Die Tabelle zeigt die kumulativen Daten aller Interventionsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung zu Körpergewicht, Tibialänge und Herzgewicht. Das Herzgewicht wurde auf Körpergewicht, bzw. Tibialänge normalisiert. Die Herzgewichte zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Sowohl die Herz-/Körpergewicht-Verhältnisse, als auch die Herzgewicht/Tibialänge-Verhältnisse weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und durch Angiotensin-II-Stimulation auf. Die gesteigerte Carabin-Expression hatte keinen Einfluss auf das Herzgewicht der Mäuse.

Nach der Gewichtsmessung, wurde ein Teil des gewonnenen kardioventrikulären Gewebes für eine histologische Untersuchung abgetrennt, fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 6µm dünne histologischen Schnitten mittels Mikrotom wurde eine WGA-Färbung durchgeführt, um die Zellgrenzen zu markieren. Nachfolgend wurden die Schnitte bei 200facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop fotografiert und anschließend die Diameter der Kardiomyozyten ausgemessen und analysiert. Von jedem Tier wurden mindestens 100 Zellen

ausgemessen. Die Anfertigung der Fotos und die Analyse erfolgten verblindet, hinsichtlich der Gruppenzuordnung (Abb. 3.18).

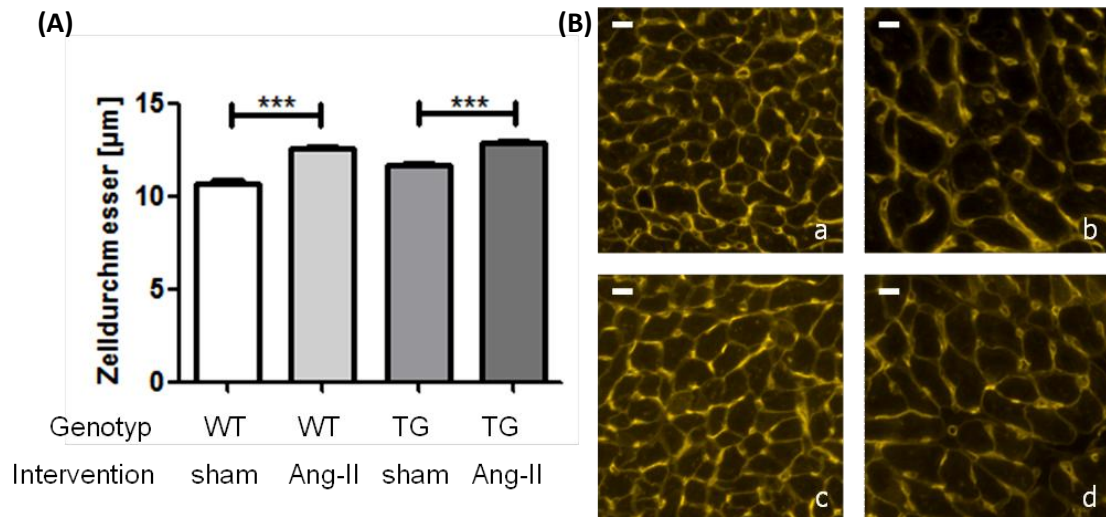


Abb. 3.18: Analyse der Zelldiameter von Angiotensin-II-stimulierten Mauskardiomyozyten mittels WGA-Färbung. Wildtypmäusen und Carabin-transgenen Mäusen wurden Angiotensin-II-beladene osmotische Minipumpen implantiert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine sham-Gruppe gebildet, deren Tieren ein Silikonstück gleicher Größe an gleicher Stelle implantiert wurde. Nach 14 Tagen Stimulation wurde das kardioventrikuläre Gewebe isoliert und histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden nach WGA-Färbung (gelb) mittels Mikroskop fotografiert und analysiert. (A) kumulative Daten. Pro Tier wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet (WT(sham): n=3; WT(Ang-II): n=5; TG(sham): n=5; TG(Ang-II): n=6). Die Zelldiameter wurden durch Angiotensin-II-Stimulation sowohl in Wildtypmäusen, als auch in Carabin-transgenen Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,001$). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von WGA-gefärbten Schnitten aus kardioventrikulärem Mausgewebe: a) WT (sham), b) WT (Ang-II), c) TG (sham), d) TG (Ang-II). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Eichbalken = 10 µm. *** $p < 0,001$.

Die Analyse ergab in der Wildtyp-Gruppe eine signifikante Steigerung des mittleren Zelldiameters von $10,74 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ($n=3$) in den unstimulierten Tieren (sham-Tiere) auf $12,61 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ($n=5$) unter Angiotensin-II-Stimulation ($p < 0,001$).

Auch in der Gruppe der Carabin-transgenen Mäuse wurde eine signifikante Steigerung des mittleren Zelldiameters von $11,67 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ($n=5$) in den unstimulierten Tieren (sham-Tiere) auf $12,93 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ($n=6$) unter Angiotensin-II-Stimulation gemessen ($p < 0,001$).

Die Stimulation mit Angiotensin-II erzielte folglich eine signifikante Erhöhung des mittleren Zelldiameters von ventrikulären Kardiomyozyten in Wildtyp- und Carabin-transgenen Mäusen. Die gesteigerte Carabin-Expression der transgenen Tiere hatte auf diesen Wachstumseffekt keinen messbaren Einfluss.

3.2.3.2. Untersuchung des Calcineurin/NFAT- und des ERK/MAPK-Signalwegs

Zur Untersuchung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs wurde kardioventrikuläres Gewebe aus den Angiotensin-II-stimulierten Mäusen, bzw. den sham-Mäusen isoliert und lysiert. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen für die Western-Blot-Analysen verwendet. Zur Immundetektion wurde ein Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) verwendet. Die Proteinmengen wurden auf die GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.19).

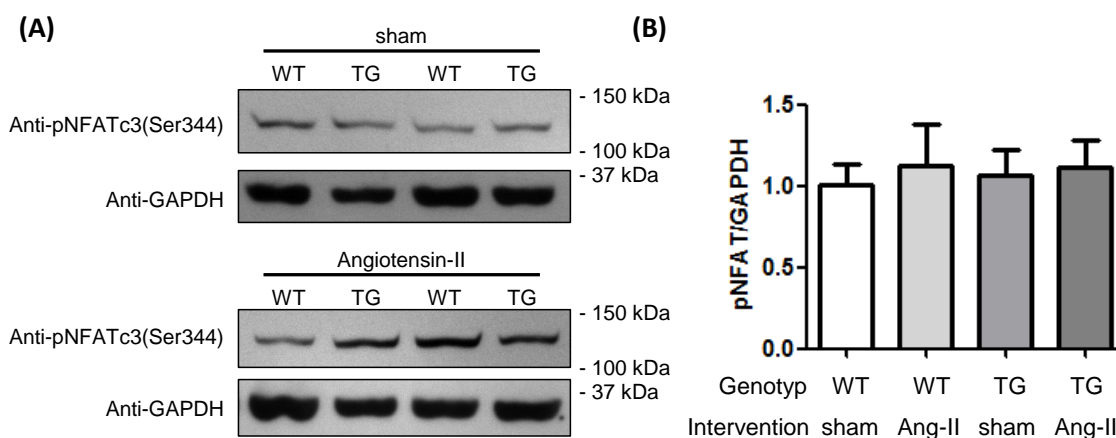


Abb. 3.19: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die pNFATc3-Proteinmenge in stimuliertem kardioventrikulären Mausegewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Angiotensin-II-stimulierten Wildtyp-, bzw. Carabin-transgenen Mäusen isoliert. Die Stimulation erfolgte mithilfe implantierter osmotischer Minipumpen (Ang-II). Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe (sham-Gruppe) gebildet, deren Tieren ein Silikonstück gleicher Größe an gleicher Lokalisation implantiert wurde. Die gewonnenen Gewebeprobe wurden lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Von den Proben wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die Analyse verwendet. Für die Immundetektion wurde ein Anti-pNFATc3(Ser344)-Antikörper (Santa Cruz Biotech., Heidelberg) verwendet. Die Expression wurde auf GAPDH normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-pNFATc3(Ser344)- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. WT(sham): n=6; WT(Ang-II): n=8; TG(sham): n=8; TG(Ang-II): n=8. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge festgestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Analyse ergab eine mittlere normalisierte pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge von $1,01 \pm 0,13$ (n=6) in den Wildtypmäusen der sham-Gruppe und von $1,07 \pm 0,16$ (n=8) in der Carabin-transgenen-Mäusen der sham-Gruppe. Der Unterschied war nicht signifikant.

Die pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge in den Angiotensin-II-stimulierten Wildtypmäusen betrug $1,12 \pm 0,26$ (n=8) und in den stimulierten Carabin-transgenen Mäusen $1,12 \pm 0,17$ (n=8). Es gab folglich keinen signifikanten Unterschied.

Auch zwischen den unstimulierten (sham) und stimulierten Mäusen gab es keine signifikanten Unterschiede. Folglich konnten durch Stimulation mit Angiotensin-II keine signifikanten

Unterschiede in der pNFATc3(Ser344)-Proteinmenge gemessen werden. Ein Effekt der gesteigerte Carabin-Expression auf die NFAT-Phosphorylierung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

In denselben Proben wurde der Einfluss von Carabin auf den MEK/ERK-Signalweg untersucht. Hierzu wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt und mithilfe eines Anti-pMEK1/2-Antikörpers die pMEK1/2-Proteinmengen bestimmt und verglichen. Nach der Analyse wurden die Nitrocellulosemembranen von Antikörpern bereinigt und mit einem Anti-MEK1/2-Antikörper neu inkubiert. Die Messergebnisse wurden auf die Gesamt-MEK1/2-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.20).

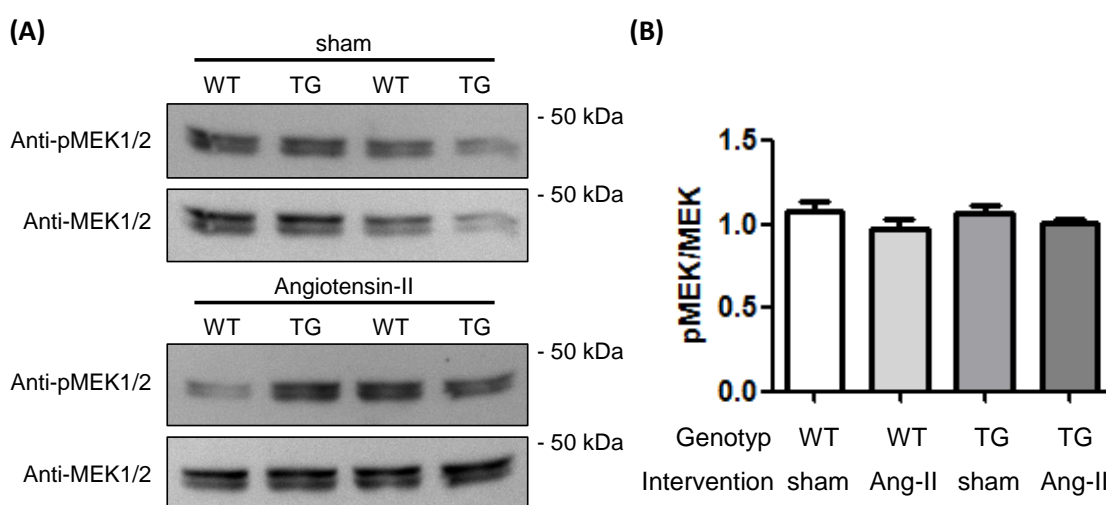


Abb. 3.20: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Carabin auf die pMEK-Proteinmenge in stimuliertem kardioventrikulären Mausgewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Angiotensin-II-stimulierten Wildtyp-, bzw. Carabin-transgenen Mäusen isoliert. Die Stimulation erfolgte mithilfe implantierter osmotischer Minipumpen (Ang-II). Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe (sham-Gruppe) gebildet, deren Tieren ein Silikonstück gleicher Größe an gleicher Lokalisation implantiert wurde. Für die Immundetektion wurde ein Anti-pMEK1/2-Antikörper verwendet. Nach Bereinigung der Nitrocellulosemembran von den Antikörpern wurde diese mit einem Anti-MEK1/2-Antikörper neu inkubiert. Die Expression wurde auf die MEK1/2-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-pMEK1/2- und Anti-MEK1/2-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die Gesamt-MEK1/2-Proteinmenge. WT(sham): n=6; WT(Ang-II): n=8; TG(sham): n=8; TG(Ang-II): n=8. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der pMEK1/2-Proteinmenge gemessen werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In der sham-Gruppe wurde in den Wildtypmäusen eine mittlere, auf die MEK1/2-Proteinmenge normalisierte pMEK1/2-Proteinmenge von $1,08 \pm 0,05$ (n=6) und in den Carabin-transgenen Mäusen von $1,07 \pm 0,04$ (n=8) gemessen, so dass kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde.

In der Angiotensin-II-stimulierten Gruppe ergab die Analyse in den Wildtypmäusen eine mittlere, normalisierte pMEK1/2-Proteinmenge von $0,97 \pm 0,06$ (n=8) und in den Carabin-transgenen

Mäusen von $1,01 \pm 0,02$ (n=8). Somit konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Angiotensin-II-Stimulation erzielte weder in Wildtypmäusen, noch in Carabin-transgenen Mäusen, einen messbaren, signifikanten Unterschied in der pMEK1/2-Proteinmenge. Es ließ sich folglich kein Stimulationseffekt 14 Tage nach Implantation einer Angiotensin-II beladenen osmotischen Minipumpe nachweisen. Eine gesteigerte Carabin-Expression bewirkte ebenfalls, sowohl in der sham-Gruppe als auch unter Angiotensin-II-Stimulation, keinen Unterschied in der pMEK1/2-Proteinmenge.

3.3. Untersuchungen zur Regulation von Carabin *in vivo*

3.3.1. Einfluss von Calcineurin auf die Expression von Carabin in Calcineurin-transgenen Mäusen

Pan et al. beschrieben Carabin als negativen Feedback-Inhibitor für den Calcineurin/NFAT-Signalweg in T-Lymphozyten (Pan et al., 2007). Sie zeigten, dass eine erhöhte Calcineurin-Aktivität eine gesteigerte Expression von Carabin zur Folge hat.

Um zu untersuchen, ob auch in Kardiomyozyten eine entsprechende Regulation von Carabin stattfindet, wurde aus Calcineurin-transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistern kardioventrikuläres Gewebe isoliert und lysiert. Die Tiere wurden von Dr. med. Tim Seidler (Abteilung Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden jeweils gleiche Proteinmengen für Western-Blot-Analysen verwendet. Zur Immundetektion wurde ein Anti-Carabin-Antikörper verwendet. Die gemessenen Proteinmengen wurden auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.21).

Die Auswertung ergab in Wildtypmäusen ein mittleres Carabin/GAPDH-Verhältnis von $0,73 \pm 0,07$ (n=3) und in Calcineurin-transgenen Mäusen von ebenfalls $0,73 \pm 0,11$ (n=3). Eine chronisch gesteigerte Expression von aktiviertem Calcineurin scheint in Kardiomyozyten der Maus nicht zu einer gesteigerten Expression von Carabin zu führen.

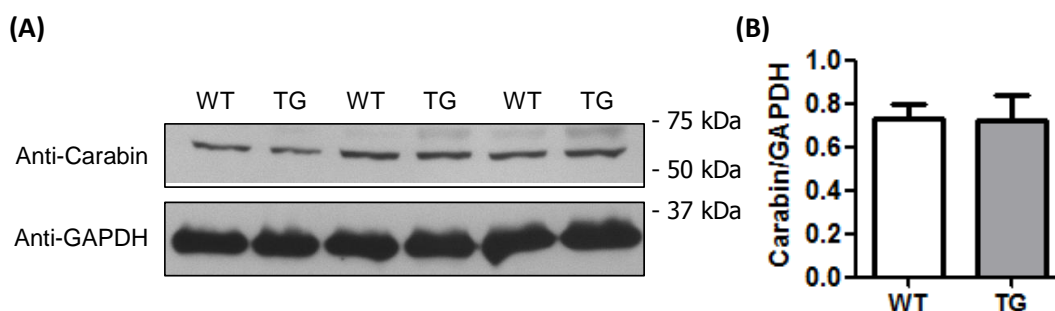


Abb. 3.21: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Calcineurin auf die Carabin-Expression in kardioventrikulärem Mausgewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Wildtyp-, bzw. Calcineurin-transgenen Mäusen isoliert. Für die Immundetektion wurde ein Anti-Carabin-Antikörper verwendet. Die Expression wurde auf die GAPDH-Proteinmenge normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-Carabin- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. WT: n=3; TG: n=3. Die Carabin-Proteinmenge zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,97$). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.3.2. Einfluss von Angiotensin-II-Stimulation auf die Expression von Carabin in Wildtypmäusen

In den Proben aus dem unter 3.2.3 erläuterten Versuch wurde ebenfalls eine mögliche Carabin-Regulation untersucht. Hierzu wurden Mäuse analysiert, die für 14 Tage kontinuierlich mit 3mg/kg/d Angiotensin-II über osmotische Minipumpen appliziert bekommen haben. Zusätzlich wurden Wildtypmäuse der sham-Gruppe analysiert, die zur Kontrolle an gleicher Lokalisation ein Silikonstück gleicher Größe implantiert bekommen hatten. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt. Die Immundetektion von Carabin erfolgte mit einem Anti-Carabin-Antikörper. Die ermittelten Carabin-Proteinmengen wurden auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen normalisiert (Abb. 3.22).

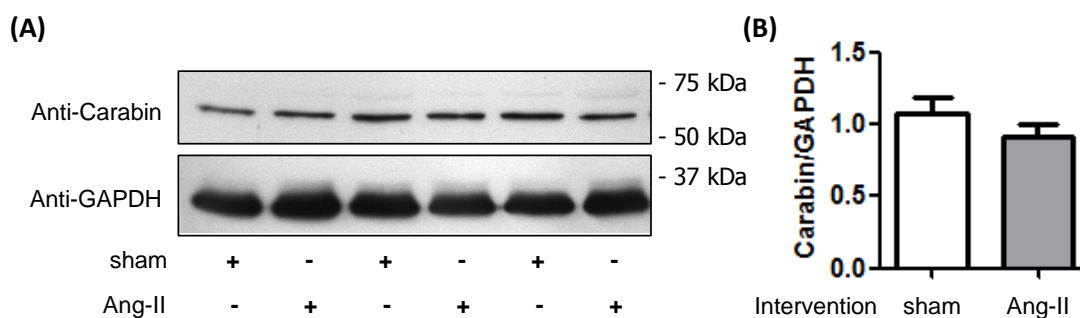


Abb. 3.22: Western-Blot zur Untersuchung des Einflusses von Angiotensin-II-Stimulation auf die Carabin-Expression in kardioventrikulärem Mausgewebe. Für die Untersuchung wurde kardioventrikuläres Gewebe aus Wildtypmäusen isoliert. Den Tieren wurden entweder Angiotensin-II-beladene, osmotische Minipumpen (Ang-II), oder ein Silikonstück gleicher Größe an gleicher Lokalisation implantiert (sham). Nach 14 Tagen post-OP wurde das Gewebe isoliert. Für die Immundetektion wurde ein Anti-Carabin-Antikörper verwendet. Die Expression wurde auf die jeweiligen GAPDH-Proteinmengen normalisiert. (A) Western-Blot mit Anti-Carabin- und Anti-GAPDH-Immundetektion. (B) Quantitative, densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt sind die kumulativen Daten normalisiert auf die GAPDH-Proteinmenge. WT: n=5; TG: n=4. Die Carabin-Proteinmenge zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Untersuchung ergab in den Wildtyp-sham-Mäusen ein mittleres Carabin/GAPDH-Verhältnis von $1,08 \pm 0,11$ (n=5) und in den Angiotensin-II-stimulierten Wildtypmäusen von $0,92 \pm 0,08$ (n=4). Eine Angiotensin-II-Stimulation erzielte keinen Unterschied in der Carabin-Proteinmenge, somit konnte auch unter Angiotensin-II-Stimulation auf Proteinebene keine Expressionssteigerung von Carabin festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Protein Carabin in Kardiomyozyten der Maus und der Ratte exprimiert wird. Mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie wurde gezeigt, dass Carabin sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert ist. Zusätzlich konnte die Carabin-Expression *in vitro*, mithilfe eines im Vorfeld dieser Arbeit hergestellten Carabin-Adenovirus und auch *in vivo*, in einer ebenfalls im Vorfeld der Arbeit hergestellten Carabin-transgenen Mauslinie, signifikant gesteigert werden, wobei das exogene Carabin ein vergleichbares subzelluläres Verteilungsmuster zeigte.

Die planimetrische Analyse der Oberflächen isolierter Kardiomyozyten neonataler Ratten ergab, dass die Zelloberflächen durch Stimulation mit 5µM PE, bzw. mit 50nM Ang-II signifikant vergrößert werden konnte. Sowohl das PE-induzierte, als auch das Ang-II-induzierte Zellwachstum konnte durch eine adenoviral vermittelte Expressionssteigerung von Carabin signifikant inhibiert werden.

Weiterhin wurde die subzelluläre NFATc3-Lokalisation in Abhängigkeit der Carabin-Expression mithilfe eines NFATc3-GFP-Adenovirus in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht. Hierbei zeigte sich zunächst, dass die prozentuale nukleäre NFATc3-Lokalisation durch Transduktion mit einem Calcineurin-Adenovirus von 8,5% in den Kontrollzellen auf 75,4% signifikant gesteigert werden konnte. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche adenoviral vermittelte Expressionssteigerung von Carabin signifikant auf 55,9% NFATc3-Kernlokalisation gesenkt werden. Eine alleinige adenovirale Carabin-Transduktion erzielte keinen signifikanten Unterschied der nukleären NFATc3-Lokalisation im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Mittels Western-Blot-Analysen konnte kein Effekt von Carabin auf die Phosphorylierung von NFATc3(Ser344) und von MEK1/2 gezeigt werden. Zusätzlich wurde die Kinetik der MAPK-Aktivierung untersucht. Hierzu wurden isolierte Kardiomyozyten adulter Ratten für unterschiedliche Zeitdauern mit PE behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von MEK1/2 durch PE-Stimulation signifikant zunimmt. Die Kinetik der MEK1/2-Phosphorylierung konnte durch eine gesteigerte Carabin-Expression aber nicht beeinflusst werden.

Die Carabin-transgenen Mäuse wurden zunächst morphologisch untersucht. Hierbei waren die echokardiographisch ermittelten Septumdicken zwischen Wildtypmäusen und transgenen Mäusen nicht unterschiedlich. Auch die Körpergewichte und die Herzgewichte wiesen keine Unterschiede auf.

Die histologische Untersuchung hinsichtlich der Kardiomyozytengröße erfolgte mittels WGA-Färbung. Dieser Versuch ergab signifikant kleinere Zelldurchmesser in den Carabin-transgenen Mäusen, allerdings war der Unterschied quantitativ sehr gering.

Des Weiteren wurden proteinbiochemische Untersuchungen mithilfe von Western-Blot-Analysen durchgeführt. Diese ergaben keinen Einfluss der gesteigerten Carabin-Expression auf die Phosphorylierung von NFATc3(Ser344) oder MEK1/2.

Um den Einfluss von Carabin auf eine Hypertrophieentwicklung zu untersuchen, wurden Tiere mithilfe von mikroosmotischen Minipumpen über 14 Tage kontinuierlich mit Ang-II stimuliert. Hierzu wurden Wildtyptieren und Carabin-transgenen Tieren entsprechende Pumpen implantiert. Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls Wildtypmäuse und Carabin-transgene Mäuse verwendet, denen im gleichen Operationsverfahren größenäquivalente Silikonstücke implantiert wurden (sham-Gruppe). 10 Tage *post operationem* wurden die Tiere echokardiographisch untersucht. Sowohl die Wildtyptiere, als auch die Carabin-transgenen Tiere wiesen eine signifikant unterschiedliche Septumdicke im Vergleich zu den jeweiligen sham-Tieren auf. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Carabin-transgenen Tieren und den Wildtyptieren gemessen.

14 Tage *post operationem* wurden die Tiere getötet. Sowohl die Körpergewichte und Tibialängen, als auch die absoluten und die auf das Körpergewicht, bzw. auf und Tibialänge normalisierten Herzgewichte wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die histologische Untersuchung der kardiomyozytären Zelldiameter mithilfe der WGA-Färbung zeigte analog zu den echokardiographischen Daten eine signifikante Zunahme der Zelldurchmesser sowohl in den Wildtyptieren, als auch in den Carabin-transgenen Tieren im Vergleich der sham-Gruppen zur jeweiligen Interventionsgruppe, jedoch nicht zwischen den Carabin-transgenen Tieren und Wildtyptieren.

Auf proteinbiochemischer Ebene ergaben die Western-Blot-Analysen keinen Unterschied in den Proteinmengen von phosphoryliertem NFATc3(Ser344) oder phosphoryliertem MEK1/2.

Zuletzt wurde untersucht, ob die endogene Carabin-Expression einer Regulation unterliegt. Hierzu wurden zum Einen die Carabin-Proteinmengen mittels Western-Blot zwischen Wildtypmäusen mit Calcineurin-transgenen Mäusen verglichen. Dieser Versuch ergab keine signifikanten

Unterschiede. Zum Anderen wurden Wildtypmäuse, die entweder mit einer mikroosmotischen Pumpe kontinuierlich über 14 Tage mit Ang-II stimuliert wurden, oder Mäuse, die aus der entsprechenden sham-Gruppe stammten bezüglich ihrer Carabin-Proteinmengen mittels Western-Blot analysiert. Auch diese Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede.

4.2. Einfluss von Carabin auf die Phosphorylierung und die subzelluläre Lokalisation von NFAT *in vitro* und *in vivo*

Der Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionsweg ist nach aktueller Forschungslage ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung kardialer Hypertrophie und Insuffizienz (Ritter et al., 2002; Molkentin et al., 1998). Eine herzspezifisch gesteigerte Calcineurin-Expression führt in Mäusen zu einer konzentrischen Hypertrophie, die rasch, d.h. mit ca. 10 Wochen, in eine Herzinsuffizienz mündet (Molkentin et al., 1998). Ein Calcineurin-knockout führt unter Wachstumsstimulation mittels transaortaler Konstriktion, bzw. Katecholaminapplikation zu einer verminderten Ausprägung einer kardialen Hypertrophie im Vergleich zu Wildtypgeschwistern (Bueno et al., 2002).

Zu den Zielproteinen von Calcineurin gehört unter anderem der Transkriptionsfaktor NFAT. NFAT wurde erstmalig in T-Lymphozyten als Regulator des Interleukin-2-Promotors beschrieben (Shaw et al., 1988). Mittlerweile sind Mitglieder der NFAT-Familie als Regulatoren in zahlreichen weiteren Prozessen anderer Zellen bekannt, wie z.B. der Lungenreifung (Dave et al., 2006) oder der Chondrogenese (Ranger et al., 2000), sowie der Regulation kardialer Hypertrophie und Insuffizienz (Molkentin, 2000). Die subzelluläre Lokalisation von NFAT ist abhängig von dessen Phosphorylierung, wobei NFAT phosphoryliert im Zytosol vorliegt und dephosphoryliert im Zellkern. NFAT kann durch die kalziumabhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert werden, wodurch es in den Zellkern transloziert und in Kardiomyozyten zu einer Aktivierung prohypertropher Gene führt (Wilkins und Molkentin, 2004; Crabtree und Olson, 2002; Molkentin, 2000). Durch eine Inhibition des Calcineurin/NFAT-Wegs in Kardiomyozyten konnte entsprechend ein hypertrophes Wachstum verhindert werden (Bueno et al., 2002; de Windt et al., 2001; Molkentin et al., 1998). Aus allen Mitgliedern der NFAT-Familie scheint NFATc3 eine besonders wichtige Rolle bei der Regulation myokardialer Hypertrophie zu haben (Wilkins et al., 2002; van Rooij et al., 2002). Ein NFATc3-knockout führte in Mäusen unter Ang-II-Infusion, sowie nach TAC-OP zu einer signifikant milderen Myokardhypertrophie als bei den entsprechenden Wildtypgeschwistern (Wilkins et al., 2002). Ebenso führte ein NFATc3-knockout in Calcineurin-transgenen Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Calcineurin-induzierten Hypertrophie (Wilkins et al., 2002).

Aufgrund dieser Hinweise für eine wesentliche Beeinflussung der myokardialen Hypertrophie, besteht ein reges Interesse an neuen Möglichkeiten, die Calcineurin-Aktivität therapeutisch zu beeinflussen. Bekannte Calcineurin-Inhibitoren sind FK-506 und Ciclosporin A, die therapeutisch intensiv als Immunsuppressiva genutzt werden. Aufgrund dieser immunsuppressiven Eigenschaften sind diese Substanzen zur Hypertrophiereduktion nicht geeignet. Die Entdeckung neuer Modulatoren der Calcineurin-Aktivität könnte alternative Angriffsmöglichkeiten in der Calcineurin/NFAT-Signaltransduktion ergeben.

Pan et al. (2007) beschrieben den inhibierenden Einfluss von Carabin auf Calcineurin und Ras in T-Lymphozyten. Diese Effekte sollten in dieser Arbeit in Kardiomyozyten untersucht werden. Hierzu wurde in unterschiedlichen Experimenten die subzelluläre Lokalisation bzw. die Phosphorylierung des Calcineurin-Substrats NFAT untersucht. Mithilfe eines NFATc3-GFP-Fusionsproteins, das mittels adenoviraler Transduktion überexprimiert wurde, konnte die subzelluläre Lokalisation von NFATc3 untersucht werden. Die GFP-Markierung von Zielproteinen zur Lokalisation ist eine gut etablierte und vielfach verwendete Methode, die auf die Arbeiten von Shimomura, Chalfie und Tsien zurückzuführen ist, die hierfür 2008 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet wurden (Shimomura et al., 1962; Chalfie et al., 1994; Tsien, 1998; Gurda et al., 2008; Pan et al., 2007). In Versuch 3.1.3 wurde bestätigt, dass die Lokalisation von NFATc3 durch Calcineurin beeinflusst wird und die NFATc3-Lokalisation phosphorylierungsabhängig ist. Eine adenoviral vermittelte Expressionssteigerung von konstitutiv aktivem Calcineurin A führte zu einer signifikanten NFATc3-Translokation von zytosolisch nach nukleär. Dieser Effekt konnte durch adenovirale Kotransduktion von Carabin signifikant reduziert werden. Dies zeigt, dass der von Pan et al. (Pan et al., 2007) in T-Zellen vorgeschlagene Mechanismus auch in Kardiomyozyten zutrifft und bestätigt die Hypothese, dass eine gesteigerte Carabin-Expression *in vitro* Einfluss auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg und die subzelluläre Lokalisation von NFAT in Kardiomyozyten nimmt.

Hallhuber et al. konnten zeigen, dass Calcineurin ebenfalls in den Zellkern translozieren kann und die nukleäre Lokalisation essenziell für die NFAT-Wirkung und die Entstehung myokardialer Hypertrophie zu sein scheint. Durch Inhibition der nukleären Translokation von Calcineurin konnte eine myokardiale Hypertrophie verhindert werden (Hallhuber et al., 2006; Hallhuber und Ritter, 2007). Der Effekt einer gesteigerten Carabin-Expression in Kardiomyozyten ist möglicherweise auch dadurch erklärt, dass Carabin ebenfalls auch nukleär lokalisiert ist (3.1.1, 3.2.2.1).

In den Untersuchungen mittels Western-Blot konnten *in vitro* und *in vivo* keine Unterschiede in der NFATc3(Ser344)-Phosphorylierung festgestellt werden (3.1.4, 3.2.2.3 und 3.2.3.2). Isolierte Kardiomyozyten wurden wie in Versuch 3.1.4 mit einem Ad-Calcineurin-Adenovirus behandelt und anschließend mittels Western-Blot hinsichtlich der pNFATc3(Ser344)-Proteinmengen untersucht. Es konnte trotz Stimulation mit Calcineurin kein Effekt auf die pNFAT(Ser344)-Proteinmenge gemessen werden. Entsprechend zeigte auch eine adenovirale Carabin-Kotransduktion keinen Effekt.

Auch unter 14tägiger, kontinuierlicher Ang-II-Stimulation von Carabin-transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistern konnte kein Effekt von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung im Western-Blot festgestellt werden. Allerdings konnte ebenfalls auch kein Unterschied der pNFAT(Ser344)-Proteinmengen durch die Stimulation gezeigt werden (3.2.3.2). Aufgrund dieser überraschenden Ergebnisse wurden letztlich fünf verschiedene Anti-pNFAT-Antikörper, die gegen unterschiedliche Phospho-Bindungsstellen von NFAT gerichtet sind, untersucht (3.1.4), allerdings konnte mit keinem ein signifikanter Unterschied der pNFAT-Proteinmengen ermittelt werden, wobei teilweise die Antikörper-Spezifität fraglich war.

Aufgrund der soliden Ergebnisse der NFATc3-GFP-Lokalisationsbestimmung ist jedoch ein Effekt auf die NFAT-Phosphorylierung zu erwarten. Die Stimulation der Mäuse mit Ang-II war sehr wahrscheinlich ausreichend hoch, um einen Unterschied der NFAT-Phosphorylierung zu erzeugen, da die Zelldiameter und die Septumdicken unter der Stimulation signifikant zunahm (3.2.3.1). Möglicherweise ist aber der Einfluss von Carabin auf die NFAT-Phosphorylierung so gering, bzw. die Sensitivität des Western-Blots nicht ausreichend, um einen signifikanten Unterschied messen zu können. Es ließ sich bislang auch nicht erschöpfend klären, ob der verwendete Antikörper hinreichend sensitiv auf Unterschiede der NFAT-Phosphorylierung reagiert. Es ist auch denkbar, dass andere Phospho-Bindungsstellen des NFAT beeinflusst werden. Vielleicht wurde die Analysen auch zeitlich außerhalb des Stimulationsmaximums von NFAT durchgeführt. Phosphorylierungen sind schnelle Prozesse, die auch einer Gegenregulation unterliegen, so dass eventuell nach 14 Tagen bereits eine Kompensation stattgefunden hat. Der Analyse-Zeitpunkt wurde jedoch so gewählt, dass die Manifestation einer kardialen Hypertrophie zu erwarten ist. Letztlich sind weitere Versuche notwendig, um die biologische Signifikanz dieses Versuches besser bewerten zu können, wie z.B. die Untersuchung der Kinetik der Phosphorylierung von NFAT unter verschiedenen Stimulationen, die Untersuchung anderer Phospho-Bindungsstellen, oder die Analyse der NFAT-Proteinmengen in Zellkernfraktionen.

4.3. Einfluss von Carabin auf die MAPK-Signalkaskade *in vitro* und *in vivo*

Die Signalübertragung und Modulation der Signaltransduktion erfolgt über kaskadenartige Phosphorylierungen, die unter anderem zur Aktivierung von MEK und ERK führen (Widmann et al., 1999; Garrington und Johnson, 1999). Die Aktivierung dieser Kaskaden führt letztlich auch zu einer Aktivierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren (Heineke und Molkentin, 2006). Besonders MEK1 und ERK1/2 spielen eine große Rolle bei der Entstehung kardialer Hypertrophie (Heineke und Molkentin, 2006; Ueyama et al., 2000; Thorburn et al., 1994; Post et al., 1996; Ramirez et al., 1997). Eine herzspezifisch gesteigerte MEK1-Expression in Mäusen führte zu einer Hochregulation und Aktivierung von ERK1/2, sowie zu einer konzentrischen Herzhypertrophie (Bueno et al., 2000). ERK akkumuliert nach Aktivierung für einige Minuten nukleär und aktiviert prohypertrophe Transkriptionsfaktoren (Pouyssegur et al., 2002; Sharrocks, 2001).

Die MAPK-Kaskaden werden durch viele Faktoren reguliert, darunter die durch Ang-II oder durch α -adrenerge Katecholamine aktivierbaren G_q -Proteine (Clerk und Sugden, 1999; LaMorte et al. 1993).

Pan et al. zeigten, dass die Stimulation von T-Zellen mit Ionomycin und TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 führt, die durch Carabin inhibiert werden kann. Analog wurde dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit in Kardiomyozyten untersucht (3.1.5). Hierzu wurden Rattenkardiomyozyten mit PE stimuliert, da bekannt ist, dass eine Stimulation kardiomyozytärer Adrenozeptoren unter anderem zu einer Aktivierung der MAPK-Signalwege führt (Bogoyevitch et al., 1993; Bogoyevitch et al., 1995; Yamazaki et al., 1997; Clerk et al., 1998; Lazou et al., 1998; Aggeli et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zeitverlauf der MEK1/2-Phosphorylierung nach PE-Exposition untersucht. Da ERK1/2 durch MEK1/2 phosphoryliert wird, wurde auch der Zeitverlauf der ERK1/2-Phosphorylierung untersucht (Bueno et al., 2000; Garrington und Johnson, 1999). Durch eine Stimulation mit 5 μ M PE konnte eine Phosphorylierung von MEK1/2 dargestellt werden (während ERK1/2 in diesem Experiment nicht gesteigert phosphoryliert war). Durch eine gesteigerte Carabin-Expression wurde lediglich zum Zeitpunkt 2,5 min ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt, wobei die pMEK-Proteinmenge in den Ad-Carabin-transduzierten Zellen signifikant höher war. Allerdings muss die biologische Signifikanz in Frage gestellt werden, da zu keinem anderen untersuchten Zeitpunkt ein Unterschied festzustellen war. Durch eine adenoviral vermittelte Steigerung der Carabin-Expression wurde somit die MEK-Aktivierung nicht beeinflusst, so dass die Erkenntnisse von Pan et al. in Kardiomyozyten nicht bestätigt werden konnten. Auch *in vivo* wurde mittels Western-Blot-Analysen die Phosphorylierung von MEK in Carabin-transgenen Tieren unter basalen Bedingungen

und nach 14tägiger kontinuierlicher Ang-II-Stimulation untersucht (3.2.2.3, 3.2.3.2). Es konnte ebenfalls kein Einfluss von Carabin im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen werden und auch kein Unterschied in der MEK-Phosphorylierung durch die Stimulation.

Die von Pan et al. beschriebene Ras-inhibitorische Wirkung von Carabin in T-Lymphozyten scheint in Kardiomyozyten auf Grundlage dieser Ergebnisse keine biologische Signifikanz zu haben (Pan et al., 2007). Möglicherweise ist diese Carabin-Wirkung also zellspezifisch. Ähnliches ist auch für andere Proteine, wie z.B. für DYRK1A bekannt, dessen Einfluss auf die MAPK-Signalkaskade in PC12-Zellen, aber nicht in COS-7-, oder HELA-Zellen gezeigt werden konnte (Kelly und Rahmani, 2005). Da Ras jedoch auch weitere molekulare Ziele besitzt, wäre es auch möglich, dass eine Ras-Inhibition vorliegt, jedoch deutlicher in anderen Signalkaskaden zu messen ist. Da MEK nicht nur über Ras aktiviert werden kann, könnte ein möglicher Effekt durch Carabin eventuell auch durch andere MEK-Aktivatoren kompensiert werden. Überdies wäre denkbar, dass der Effekt von Carabin zu gering ist, um mittels Western-Blot einen signifikanten Unterschied messen zu können. Letztlich sind weitere Experimente, wie z.B. Ras-Aktivierungs-Assays und die Untersuchung anderer Ras-Effektoren notwendig um einen möglichen Einfluss von Carabin näher zu untersuchen. Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit *in vitro* wäre die direkte Messung der Ras/Raf-Interaktion z.B. mittels Mammalian-2-Hybrid-Versuchen oder Ko-Immunpräzipitationen.

4.4. Einfluss von Carabin auf die Wachstumsregulation von Kardiomyozyten

Kardiomyozyten sind durch verschiedene Stimuli zum Wachstum anzuregen. In dieser Arbeit wurden hierzu PE und Ang-II verwendet (Prasad und Inesi, 2009; Sadoshima und Izumo, 1993).

Das Sympathomimetikum Phenylephrin ist ein nicht-spezifischer Agonist am α_1 -Adrenozeptor (Endoh und Blinks, 1988; Hartmann et al., 1988). Dieser Rezeptor findet sich neben β_1 -Adrenozeptoren im Myokard (Brodde und Michel, 1999). Eine dauerhafte kardiale α -adrenerge Stimulation führt zur Entwicklung einer Hypertrophie (Waspé et al., 1990; Lee et al., 1988). Auch an Gefäßen befinden sich α_1 -Adrenozeptoren und wirken vasokonstriktorisch und damit Blutdruck- und Nachlasterhöhend und dadurch ebenfalls prohypertroph (Navarro-Sobrinó et al., 2010; Civantos und Aleixandre de Artiñano, 2001; Abboud et al., 1968). Pharmakologisch kann die vasokonstriktive Wirkung von PE z.B. topisch zur Abschwellung der Nasenschleimhaut verwendet werden (Higgins et al., 2011).

Das endogene Peptidhormon Ang-II wirkt an Angiotensinrezeptoren (AT-Rezeptoren). Hierzu gehört der AT₁-Rezeptor, der z.B. an Gefäßen vorkommt und dort vasokonstriktiv und damit blutdruckerhöhend wirkt. Dieser Umstand wird pharmakologisch z.B. in Form von ACE-Inhibitoren oder AT₁-Blockern zur Therapie der Hypertonie genutzt. Auch Kardiomyozyten exprimieren AT₁-Rezeptoren. Es ist bekannt, dass eine chronische kardiale Stimulation mit Ang-II zu einem hypertrophen Wachstum führt (Sadoshima und Izumo, 1993; Sadoshima et al., 1995; Baker et al., 1993). Auch in der Therapie der Herzinsuffizienz gehört die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems heute zum Standard, da hierdurch das kardiale Remodeling, also Hypertrophie und Zellnekrose, vermindert werden kann (Hoppe et al., 2005; Lijnen und Petrov, 2003).

Sowohl der α_1 -Adrenozeptor, als auch der AT₁-Rezeptor sind G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung zur Phospholipase-C-vermittelter Spaltung von Inositol-4,5-Bisphosphat zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt (Scheuer, 1999; Wilkins und Molkentin, 2004; Sadoshima et al., 1995). DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), während IP₃ durch Bindung an IP₃-Rezeptoren zu einer vermehrten Freisetzung von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Zellkern führt. Die vermehrte Ca²⁺-Freisetzung führt unter anderem zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft. Zusätzlich führt die gesteigerte Ca²⁺-Konzentration zu einer erhöhten PKC-Aktivität und zu einer Aktivierung von Ras und Calcineurin (Wilkins und Molkentin, 2004). Taigen et al. zeigten, dass sowohl PE, als auch Ang-II zu einer gesteigerten Calcineurin-Aktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten führen (Taigen et al., 2000). Weiterhin werden durch Aktivierung von G_q-Proteinen auch die MAPK-Signalkaskaden aktiviert, wobei der genaue Mechanismus PKC-vermittelt, aber noch nicht gänzlich geklärt ist (Clerk und Sugden, 1999; LaMorte et al., 1993). Grundsätzlich scheint es jedoch trotz der Gemeinsamkeit einer G_q-vermittelten Stimulation Unterschiede in der Wirkung einer PE- und einer Ang-II-Stimulation. Aoki et al. zeigten z.B., dass beide Stimulatoren eine vergleichbare Wirkung auf eine ERK1- und ERK2-Stimulation haben, wobei jedoch die Ang-II-vermittelte Aktivierung transienter war als die durch PE (Aoki et al., 2000). Die Aktivierung von p38 und JNK hingegen war signifikant stärker unter PE-Stimulation (Aoki et al., 2000).

Da Pan et al. in T-Lymphozyten zeigten, dass Carabin sowohl auf Calcineurin, als auch auf Ras inhibierend wirkt und beide Proteine einen hohen Stellenwert bei der Wachstumsregulation von Kardiomyozyten besitzen, wurde untersucht, ob eine gesteigerte Carabin-Expression hemmend auf das PE-, bzw. Ang-II-induzierte Zellwachstum wirkt. Im Versuch 3.1.2 wurden isolierte Rattenkardiomyozyten durch Stimulation mit PE und auch durch Stimulation mit Ang-II signifikant zum Wachstum angeregt, sodass deren mittlere Zelloberfläche signifikant zunahm im Vergleich zu

den Kontrollzellen. Sowohl der PE- als auch der Ang-II-induzierte Wachstumseffekt konnte durch adenoviral vermittelte Steigerung der Carabin-Expression signifikant inhibiert werden.

Dies bestätigt die These, dass eine gesteigerte Carabin-Expression *in vitro* modulierend auf die Wachstumsregulation in Kardiomyozyten wirkt.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der NFATc3-GFP-Lokalisation (3.1.3) ist der wachstumshemmende Effekt in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch eine Inhibition der NFAT-Dephosphorylierung zu erklären. Zusätzlich zeigten Abdellatif et al., dass die Hochregulation von Protein- und mRNA-Produktion durch PE-Stimulation in Kardiomyozyten durch adenoviralen Transfer von dominant-negativem Ras signifikant inhibiert werden konnte (Abdellatif et al., 1998). Somit scheint die PE-Wirkung von Ras abhängig zu sein, was indirekt möglicherweise eine inhibitorische Wirkung von Carabin auf Ras vermuten lässt. Andererseits scheint die MEK/ERK-vermittelte Hypertrophie zumindest teilweise abhängig von einer NFAT-Aktivierung zu sein (Sanna et al., 2005). Sanna et al. zeigten, dass eine Calcineurin-Inhibition das MEK1-induzierte hypertrophe Wachstum im Herzen und in kultivierten Kardiomyozyten inhibierte. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine Carabin-Interaktion mit Ras, bzw. einen Einfluss von Carabin auf den ERK/MAPK-Signalweg zu klären, bzw. um den inhibitorischen Effekt von Carabin vollständig zu erklären.

Das *in vitro* Ergebnis sollte auch *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden Carabin-transgene Mäuse und Wildtypgeschwister mithilfe einer mikroosmotischen Pumpe über 14 Tage kontinuierlich mit Ang-II stimuliert, wodurch eine signifikante Zunahme der Zelldurchmesser und der Septumdicken im Vergleich zu den sham-Tieren erzielt wurde (3.2.3.1). Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen den Carabin-transgenen Tieren und den Wildtyp-Kontrolltieren gemessen werden, so dass sich der inhibierende Effekt von Carabin in der Zellkultur nicht in Mäusen bestätigen ließ. Lediglich die Zelldiameter wurden basal signifikant kleiner in Carabin-transgenen Tieren gemessen, während sie in den Carabin-transgenen sham-Tieren eher größer waren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Dies scheint allerdings einer biologischen Variabilität zu unterliegen, da in weiterführenden Versuchen in TAC-(transaortic banding) und MI-(Myokardinfarkt)-behandelten Tieren diese Beobachtung nicht bestätigt wurde.

Die Diskrepanz zwischen der effektiven Hemmung der Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten (*in vitro*) und in Mäusen (*in vivo*) ist noch nicht abschließend geklärt. Es ist denkbar, dass die inhibitorische Wirkung von Carabin nur akut von Bedeutung ist und dass eine Dauerstimulation nicht signifikant inhibiert werden kann. Vielleicht ist der Effekt von Carabin in Kardiomyozyten auch beschränkt auf die Entwicklungsphase, da ein wachstumshemmender Effekt

nur in neonatalen, nicht aber in adulten Kardiomyozyten gezeigt werden konnte. Eventuell liegt auch eine Speziespezifität der kardialen Carabin-Wirkung vor, so dass Carabin möglicherweise in Ratten eine größere Rolle spielt, als in Mäusen. Weiterhin führt eine chronisch gesteigerte Carabin-Expression möglicherweise zu einer Aktivierung von Kompensationsmechanismen, so dass ein Effekt durch Carabin mit den verwendeten Methoden nicht festzustellen war. Dies wurde bereits für einen weiteren Inhibitor des Calcineurin/NFAT-Signalwegs gezeigt. Die DYRK-Kinase (DYRK1A) vermag bei akuter Expressionssteigerung in isolierten Kardiomyozyten NFAT potent zu hemmen. Eine chronische Expressionssteigerung *in vivo* in transgenen Mäusen ist aber ineffektiv hinsichtlich der Hypertrophiehemmung, unter anderem durch unzureichende NFAT-Hemmung *in vivo* (Grebe et al., 2011). Ein solcher chronischer Effekt könnte z.B. durch ein induzierbares Mausmodell zur Carabin-Expressionssteigerung umgangen werden. So könnte gegebenenfalls auch die Carabin-Wirkung in unterschiedlichen Lebensabschnitten untersucht werden.

4.5. Untersuchung einer möglichen Regulation der Carabin-Expression

Pan et al. zeigten, dass die Carabin-Expression in humanen T-Zellen von der Calcineurin-Aktivität abhängig ist. Durch Stimulation der Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 konnte eine zeitabhängige Zunahme der Carabin-mRNA-Menge und der Carabin-Proteinmenge gemessen werden, die sich durch zusätzliche Calcineurin-Inhibition mittels Ciclosporin A dosisabhängig reduzieren ließ (Pan et al., 2007). Auch Datta et al. beschrieben, dass die Carabin-Expression in REC- und in 786-0-Zellen durch Ciclosporin-A-Behandlung inhibiert wurde.

Dieser Feedback-Inhibitions-Mechanismus sollte *in vivo* in Kardiomyozyten untersucht werden. Hierzu wurden im Western-Blot die Carabin-Proteinmengen in Calcineurin-transgenen Mäusen (3.3.1), sowie in Wildtypmäusen unter Ang-II-Stimulation (3.3.2) untersucht. Die Carabin-Proteinmengen unterschieden sich in den Calcineurin-transgenen Tieren, sowie in den Ang-II-stimulierten Tieren, jedoch nicht im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Somit konnten die Erkenntnisse von Pan et al. und Datta et al. in Kardiomyozyten nicht bestätigt werden. Daher muss die Funktion von Carabin als Feedback-Inhibitor in Kardiomyozyten zunächst angezweifelt werden und bedarf weiterer Experimente, wie z.B. der Analyse auf mRNA-Ebene. Möglicherweise ist hier eine Zunahme der Carabin-mRNA-Menge festzustellen, da mRNA-Mengen nicht zwingend mit den entsprechenden Proteinmengen korrelieren (Roy und Sarkar, 1982; Guo et al., 2008). Vielleicht werden andere Kompensationsmechanismen aktiviert, welche die eventuell gesteigerte Carabin-Synthese reduzieren. Weiterhin sollten Untersuchungen der Carabin-Proteinmengen

unter Calcineurin-Inhibition, z.B. mittels Ciclosporin A, oder mittels direkten Inhibitoren wie Cabin1 (Sun et al., 1998) oder CN585 (Erdmann et al., 2010) durchgeführt werden.

4.6. Perspektiven

Die Funktion von Carabin wurde in Kardiomyozyten bisher nicht beschrieben, sodass zukünftig weitere Forschungsarbeiten hierzu zu erwarten sind, um die Bedeutung von Carabin bei der Wachstumsregulation von Kardiomyozyten und der Entstehung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz zu charakterisieren.

Die vorliegenden ersten Erkenntnisse sind unter anderem dadurch limitiert, dass sie auf künstliche gesteigerter Expression beruhen. Daher sind weitere Untersuchungen in Modellen der geminderten oder ausgeschalteten Expression (knockdown-, knockout-Modelle) notwendig.

Die Funktion von Carabin sollte ebenfalls in weiteren Modellen des Herzwachstums untersucht werden, wie z.B. in operativen Modellen, wie dem transaortic banding (TAC), dem Myokardinfarkt (MI), oder dem shunt-Modell. Entsprechende Untersuchungen finden derzeit durch die Arbeitsgruppe statt.

Letztendlich könnten auch Experimente in humanem Herzgewebe durchgeführt werden, um Einblicke in die biologische Signifikanz im Menschen zu erlangen. Beispielsweise sollte die Carabin-Expression in gesundem Myokard mit der Expression in hypertrophem, bzw. insuffizientem Myokard verglichen werden.

5. Zusammenfassung

Die kardiale Hypertrophie ist ein Kompensationsmechanismus eines erhöhten transmuralen Ventrikeldrucks, der zunächst als benigner Prozess betrachtet wird. Jedoch korreliert eine anhaltende Hypertrophie auch mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und deren Folgen, daher sind die Regulationsmechanismen im Rahmen der Herzhypertrophie und -insuffizienz Gegenstand aktueller Forschungen.

Ein relativ gut erforschter Signalweg im Rahmen der Herzhypertrophie ist der Calcineurin/NFAT-Weg. Die aktivierte Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, welcher daraufhin in den Zellkern transloziert und die Transkription prohypertropher Gene induziert. Ein weiterer Signalweg ist der ERK/MAPK-Signalweg. Durch Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signalwege. Darunter zur Aktivierung von Raf, welches wiederum zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 führt. ERK transloziert daraufhin in den Zellkern und aktiviert ebenfalls die Transkription prohypertropher Gene. Knockout-Studien belegen, dass der Calcineurin/NFAT-Signalweg und der ERK/MAPK-Signalweg sowohl hinreichend als auch notwendig für eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sind.

2007 wurde durch Pan et al. das *Calcineurin and ras binding* protein (*Carabin*) in T-Lymphozyten als dual-inhibitorisches Protein von Ras und Calcineurin beschrieben (Pan et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Carabin in Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es wurde gezeigt, dass Carabin in kultivierten Rattenkardiomyozyten und Mausekardiomyozyten exprimiert wird und sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert ist.

In kultivierten Rattenkardiomyozyten konnte eine adenoviral-vermittelte, gesteigerte Carabin-Expression sowohl ein PE- als auch ein Ang-II-induziertes hypertrophes Zellwachstum inhibieren. Des Weiteren konnte in kultivierten Rattenkardiomyozyten gezeigt werden, dass eine adenoviral-vermittelte Steigerung der Calcineurin-Expression zu einem 75,4%igem Anteil an Zellen mit nukleär lokalisiertem NFATc3-GFP führt, wobei dieser Anteil durch eine gleichzeitige adenoviral-vermittelte Carabin-Expressionssteigerung signifikant auf 55,9% inhibiert werden konnte. Carabin inhibiert also *in vitro* die nukleäre Translokation von NFATc3. Mittels Western-Blot-Analysen konnte im Gegensatz zu einer Arbeit in T-Lymphozyten kein Effekt auf die pNFAT-Proteinmenge gemessen werden und auch kein Einfluss auf die MEK1/2-Phosphorylierung festgestellt werden.

Der Einfluss von Carabin auf die kardiale Wachstumsregulation im Rahmen der Hypertrophie *in vivo* wurde in transgenen Mäusen untersucht, die Carabin herzspezifisch gesteigert exprimierten.

Zur Stimulation eines hypertrophen Herzwachstums wurden mikroosmotische Minipumpen in Mäuse implantiert, die kontinuierlich Ang-II applizierten. Die Tiere wurden echokardiographisch, histologisch und hinsichtlich der Organgewichte untersucht. Des Weiteren wurden Western-Blot-Analysen der pNFATc3(Ser344)- und der pMEK1/2-Proteinmengen durchgeführt. Es konnte kein protektiver Effekt einer gesteigerten Carabin-Expression *in vivo* festgestellt werden.

Da Carabin von Pan et al. als Feedback-Inhibitor von NFAT beschrieben wurde, sind Western-Blot-Untersuchungen der Carabin-Proteinmengen in Calcineurin-transgenen und in Ang-II-stimulierten Mäusen durchgeführt worden. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Carabin-Expression unter gesteigerter Calcineurin-Aktivität, bzw. unter Ang-II-Stimulation gemessen werden, so dass ein Feedback-Mechanismus in diesen Experimenten nicht bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass in Kardiomyozyten ein inhibierender Effekt von Carabin auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg vorliegt, dass jedoch eine chronisch gesteigerte, herzspezifische Carabin-Expression Kompensationsmechanismen induziert, die einen Hypertrophie-protaktiven Effekt von Carabin limitieren könnten.

6. Literaturverzeichnis

Abboud FM, Schmid PG, Eckstein JW (1968): Vascular responses after alpha adrenergic receptor blockade I. Responses of capacitance and resistance vessels to norepinephrine in man. *J Clin Invest* 47, 1-9

Abdellatif M, Packer SE, Michael LH, Zhang D, Charng MJ, Schneider MD (1998): A Ras-dependent pathway regulates RNA polymerase II phosphorylation in cardiac myocytes: implications for cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* 18, 6729-6736

Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I (2002): Alpha(1)- and beta-adrenoceptor stimulation differentially activate p38-MAPK and atrial natriuretic peptide production in the perfused amphibian heart. *J Exp Biol* 205, 2387-2397

Aoki H, Richmond M, Izumo S, Sadoshima J (2000): Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Biochem J* 347, 275-284

Avruch J, Khoklatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001): Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56, 127-155

Baker KM, Booz GW, Dostal DE (1992): Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 54, 227-241

Barbacid M (1987): Ras Genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827

Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JC, Stricker BH (2004): Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 25, 1614-1619

Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH (1993): Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett* 317, 271-275

Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH (1995): Cellular stresses differentially activate the c-Jun N-terminal protein kinases and the extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270, 29710-29717

Bonow RO, Bennett S, Casey DE Jr, Ganiats TG, Hlatky MA, Konstam MA, Lambrew CT, Normand SL, Pina IL, Radford MJ, Smith AL, et al. (2005): ACC/AHA Clinical Performance Measures for Adults with Chronic Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to Develop Heart Failure Clinical Performance Measures): endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 112, 1853-1887

Booz GW, Baker KM (1996): Role of Type 1 and Type 2 Angiotensin Receptors in Angiotensin II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Hypertension* 28, 635-640

Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molkentin JD (2003): Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin–NFAT signaling. *J Clin Invest* 111, 1475-1486

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S et al. (1986): Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59, 297-309

Brodde OE (1991): Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43, 203-242

Brodde OE, Michel MC (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651-690

Bueno OF, Molkentin JD (2002): Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 91, 776-781

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF et al. (2000): The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19, 6341-6350

-
- Bueno OF, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ (2002): Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res* 53, 806-821
- Burlew BS, Weber KT (2000). Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin* 18, 435-442
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805
- Civantos CB, Aleixandre de Artiñano A (2001): Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* 44, 195-208
- Clerk A, Sugden PH (1999): Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am J Cardiol* 83, 64H-69H
- Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH (1994): Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269,32848-32857
- Clerk A, Michael A, Sugden PH (1998): Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 142, 523-535
- Crabtree GR, Olson EN (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109, S67-79
- Datta D, Contreras AG, Basu A, Dormond O, Flynn E, Briscoe DM, Pal S (2009): Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res* 69, 8902-8909
- Davé V, Childs T, Xu Y, Ikegami M, Besnard V, Maeda Y, Wert SE, Neilson JR, Crabtree GR, Whitsett JA (2006): Calcineurin/Nfat signalling is required for perinatal lung maturation and function. *J Clin Invest* 116, 2697-2609

de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, et al. (1998): Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392, 182-186

Deschamps AM, Spinale FG (2006): Pathways of matrix metalloproteinase induction in the heart: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 69, 666-676

DIMDI: ICD-10-GM 2011 Systematisches Verzeichnis - Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision - German Modification. Bearbeitet von B. Graubner, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2010

De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, et al. (2001): Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3322-3327

Dickhuth HH, Röcker K, Mayer F, König D, Korsten-Reck U (2004): Ausdauersport und kardiale Adaptation (Sportherz). *Herz* 29, 373-380

Downward J (1996): Control of Ras activation. *Cancer Surv* 27, 87-100

Elliott P, McKenna WJ (2004): Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 363, 1881-1891

Endoh M, Blinks JR (1988): Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transient and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res* 62, 247-265

Erdmann E: Klinische Kardiologie. 7. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2009

Erdmann F, Weiwad M, Kilka S, Karanik M, Pätzelt M, Baumgrass R, Liebscher J, Fischer G (2010): The novel calcineurin inhibitor CN585 has potent immunosuppressive properties in stimulated human T cells. *J Biol Chem* 285, 1888-1898

Garrington TP, Johnson GL (1999): Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218

- Grebe C, Klingebiel TM, Grau SP, Toischer K, Didié M, Jacobshagen C, Dullin C, Hasenfuss G, Seidler T (2011): Enhanced expression of DYRK1A in cardiomyocytes inhibits acute NFAT activation but does not prevent hypertrophy in vivo. *Cardiovasc Res* 90, 521-528
- Grossmann W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64
- Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, et al. (2008): How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 426-436
- Gurda GT, Guo L, Lee SH, Molkenin JD, Williams JA (2008): Cholecystokinin activates pancreatic calcineurin-NFAT signaling in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* 19, 198-206
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006): A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441, 646-550
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D (1998): Increased Left Ventricular Mass and Hypertrophy Are Associated With Increased Risk for Sudden Death. *J Am Coll Cardiol* 32, 1454-1459
- Hallhuber M, Ritter O (2007): New approach to prevent myocardial hypertrophy: the import blocking peptide. *Future Cardiol* 3, 91-98
- Hallhuber M, Burkard N, Wu R, Buch MH, Engelhardt S, Hein L, Neyses L, Schuh K, Ritter O (2006): Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res* 99, 626-635
- Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ (2004): Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 110, 718-723
- Hartmann HA, Mazzocca NJ, Kleiman RB, Houser SR (1988): Effects of phenylephrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 255, 1173-1180

- Heineke J, Molkentin JD (2006): Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600
- Higgins TS, Hwang PH, Kingdom TT, Orlandi RR, Stammberger H, Han JK (2011): Systematic review of topical vasoconstrictors in endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 121, 422-432
- Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, Urdal DL, Conlon PJ (1988): A short polypeptide sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nat Biotechnol* 6, 1204-1210
- Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005): Guidelines for therapy of chronic heart failure. *Z Kardiol* 94, 488-509
- Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, et al. (2001): ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 104, 2996-3007
- Hunter J, Tanaka N, Rockman H, Ross J, Chien KR (1995): Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 270, 23173-23178
- Kelly PA, Rahmani Z (2005): DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol Biol Cell* 16, 3562-3573
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ (1988): Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 61, 149-200
- Kolch W (2005): Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837

- Kuhn C, Frank D, Will R, Jaschinski C, Frauen R, Katus HA, Frey N (2009): DYRK1A Is a Novel Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy. *J Biol Chem* 284, 17320-17327
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LaMorte VJ, Throburn J, Absher D, Spiegel A, Brown JH, Chien KR, Feramisco JR, Knowlton KU (1993): G_q- and Ras-dependent Pathways Mediate Hypertrophy of Neonatal Rat Ventricular Myocytes following α_1 -Adrenergic Stimulation. *J Biol Chem* 269, 13490-13496
- Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch* 61, 291-332
- Lazou A, Sugden PH, Clerk A (1998): Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem J* 332, 459-465
- Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR (1988): Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263, 7352-7358
- Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkentin JD (2003): c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J* 22, 5079-5089
- Lijnen PJ, Petrov VV (2003): Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25, 541-564
- Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA (2003): Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 24, 883-896
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 23, 807-815

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: The Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068-3072

Lorell BH, Carabello BA (2000): Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470-479

Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ (2009): A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15, 75-83

Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ (1997): Differential regulation of Raf-1, A-Raf and B-Raf by oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 272, 4378-4383

Markou T, Hadzopoulou-Cladaras M, Lazou A (2004): Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK 1 and PKA signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 37, 1001-1011

Maron BJ, Pelliccia A (2006): The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risk of sports, including sudden death. *Circulation* 114, 1633-1644

Marsh NA (1979): Langendorff and the perfused heart [proceedings]. *J Physiol* 291, 3P-4P

Molkentin JD (2000): Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res* 87, 731-738

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228

Morrison DK (2001): KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?. *J Cell Sci* 114, 1609-1612

Morrison DK, Cutler RE (1997): The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 174-179

Mudd JO, Kass DA (2008): Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928

Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Penalba A, Ribo M, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Montaner J (2010): Catecholamine-induced heart injury in mice: differential effects of isoproterenol and phenylephrine. *Histol Histopathol* 25, 589-597

Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, Lopez-Sendon J, Mebazaa A, Metra M, et al. (2005): Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: The Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26, 384-416

Pan F, Sun L, Kardian DB, Whartenby KA, Pardoll DM, Liu JO (2007): Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* 445, 433-436

Parsons JN, Wiederrecht GJ, Salowe S, Burbaum JJ, Rokosz LL, Kincaid RL, O'Keefe SJ (1994): Regulation of Calcineurin Phosphatase Activity and Interaction with the FK-506-FK-506 Binding Protein Complex. *J Biol Chem* 269, 19610-19616

Post GR, Goldstein D, Thuerauf DJ, Glembotski CC, Brown JH (1996): Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271, 8452-8457

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002): Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763

Prasad AM, Inesi G (2009): Effects of thapsigargin and phenylephrine on calcineurin and protein kinase C signaling functions in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C992-C1002

Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M (1995): Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6430-6442

Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH (1997): The MEKK-JNK pathway is stimulated by α_1 -adrenergic receptor and ras activation and is associated with *in vitro* and *in vivo* cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272, 14057-14061

Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH (1998): The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186-190

Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravallesse EM, Glimcher MJ, Glimcher LH (2000): The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191, 9-22

Ritt DA, Daar IO, Morrison DK (2006): KSR regulation of the Raf-MEK-ERK cascade. *Methods Enzymol* 407, 224-237

Ritter O, Hack S, Schuh K, Röthlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD, Neyses L (2002): Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 105, 2265-2269

Roy RK, Sarkar S (1982): Correlation between the protein and mRNA levels for myosin light chains and tropomyosin subunits during chick fast muscle development in vivo. *FEBS Lett* 149, 22-28

Sadoshima J, Izumo S (1993): Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73, 413-423

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S (1995): Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res* 76, 1-15

Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD (2005): Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* 25, 865-878

Scheuer J (1999): Catecholamines in Cardiac Hypertrophy. *Am J Cardiol* 83, 70H-74H

Sharrocks AD (2001): The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 827-837

-
- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988): Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 8, 202-205
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239
- Shimoyama M, Hayashi D, Zou Y, Takimoto E, Mizukami M, Monzen K, Kudoh S, Hiroi Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2000): Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension. *Circulation* 102, 1996-2004
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85
- Statistisches Bundesamt (2008): Pressemitteilung Nr.095 vom 06.03.2008
- Statistisches Bundesamt: Gesundheit: Todesursachen in Deutschland 2009. Fachserie 12, Reihe 4, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010a, 3-35
- Statistisches Bundesamt: Gesundheit: Krankheitskosten 2002, 2004, 2006, 2008. Fachserie 12, Reihe 7.2, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010b, 36-40
- Stemmer PM, Klee CB (1994): Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33, 6859-6866
- Sun L, Youn HD, Loh C, Stelow M, He W, Liu JO (1998): Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 8, 703-711
- Sussman MA, Lim HW, Gude N (1998): Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281, 1690-1693
- Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenkin JD (2000): Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1196-1201

The Criteria Committee of the New York Heart Association; Diseases of the Heart and Blood Vessels: Nomenclature and Criteria for Diagnosis, 6. Auflage; Little, Brown, Boston. 1964

Thorburn A, Thorburn J, Chen SY, Powers S, Shubeita HE, Feramisco JR, Chien KR (1993): H-Ras dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 268, 2244-2249

Thorburn J, Frost JA, Thorburn A (1994): Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *J Cell Biol* 126, 1565-1572

Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544

Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Yamashita T, Ishido S, Hotta H, Yokoyama M (2000): Requirement of Activation of the Extracellular Signal-regulated Kinase Cascade in Myocardial Cell Hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 32, 947-960

Vanhaesebroeck B und Alessi DR (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346, 561-576

van Rooij E, Doevendans PA, de Theije CC, Babiker FA, Molkenin JD, de Windt LJ (2002): Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 277, 48617-48626

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC (1990): The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85, 1206-1214

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003): A mechanistic role of cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111, 1497-1504

WHO: Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians. World Health Organisation, Genf 1995

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999): Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180
- Wilkins BJ, Molkentin JD (2004): Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1178-1191
- Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, Molkentin JD (2002): Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 22, 7603-7613
- Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotsu S, Asahi M, Tanike M, et al. (2004): Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 114, 937-943
- Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno Z, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y (1997): Norepinephrine induces raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both alpha 1- and beta-adrenoceptors. *Circulation* 95, 1260-1268
- Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y (1999): Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 83, 53H-57H
- Zhong W, Mao S, Tobis S, Angelis E, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, de Alborán IM, MacLellan WR (2006): Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway. *EMBO J* 25, 3869-3879
- Zou Y, Hiroi Y, Uozumi H, Takimoto E, Toko H, Zhu W, Kudoh S, Mizukami M, Shimoyama M, Shibasaki F, et al. (2001): Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 104, 97-101

Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung sehr breite wissenschaftliche Erfahrungen auf modernstem Niveau zu sammeln und auf dieser Grundlage diese Dissertation anfertigen zu können. Insbesondere danke ich ihm für seine konstruktive Kritik und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Dr. med. Tim Seidler danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine Betreuung und ständige Motivation und Hilfestellung in schwierigen Phasen meiner Forschung und für sein Vertrauen in meine Arbeit und die Möglichkeit, auch eigene Ideen umsetzen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Cornelia Grebe, die stets ein offenes Ohr für alle Probleme und Ideen hatte und mich durch ihre konstruktive Kritik stets weiter zum Ziel gesteuert hat. Ganz besonders während der Ausarbeitung der Dissertation nahm sie sich stets Zeit für Fragen und Korrekturen. Vielen Dank!

Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. Nadine Kramann, die mich insbesondere in die Arbeit an der Sterilbank einarbeitete und mir mit Rat und Tat und ihrer Erfahrung bei Problemen zur Seite stand. Ebenso danke ich ihr dafür, dass auch sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und sich stets Zeit für mich genommen hat, wenn ich darauf angewiesen war.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich für die tolle Arbeit der TA's Jessica Spitalieri, Karina Zimmermann, Gudrun Müller und Kirsten Koschel. Durch sie habe ich zahlreiche Forschungsmethoden erlernen dürfen und ohne ihre Bereitschaft mich zu unterstützen und ohne ihr Know-How wäre diese Arbeit undenkbar gewesen.

Ein großer Dank gilt den (zum Teil ehemaligen) Doktoranden Simon Grau, Dr. med. Theda-Maria Klingebiel, Moritz Sabrow und Christian Böcker für das freundschaftliche und kollegiale Arbeitsklima und die ständige gegenseitige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Motivation.