

Aus der Klinik für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin  
(Prof. Dr. med. T. Paul)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Regulation des CREB-Koaktivators TORC durch  $\beta$ -adrenerge Signale  
in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten**

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

vorgelegt von  
Helen Wichmann  
aus  
Schwabach

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. Heyo K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. Thomas Paul
Ko-Referent:	Prof. Dr. Wolfram Hubertus Zimmermann
Drittreferent:	Prof. Dr. Thomas Meyer
Promotor:	Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 27. März 2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Regulation des CREB-Koaktivators TORC durch  $\beta$ -adrenerge Signale in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.01.2018

## Inhaltsverzeichnis

---

1. Einleitung .....	1
1.1. Kardiale Hypertrophie .....	1
1.2. Einfluss $\beta$ -adrenerger Signale auf die Herzmuskelhypertrophie .....	3
1.3. Der Transkriptionsfaktor CREB .....	6
1.4. Der transkriptionelle Koaktivator TORC .....	6
1.5. Fragestellung und Modell.....	9
2. Material und Methodik .....	10
2.1. Zellkultur .....	10
2.1.1. Allgemeine Zellkulturtechniken .....	10
2.1.2. Isolierung der Rattenkardiomyozyten.....	10
2.1.3. Kultivierung und Behandlung der Zellen .....	12
2.1.4. Zellernte .....	13
2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration und Umschreibung in cDNA .....	14
2.2.1. Isolierung der RNA .....	14
2.2.2. Konzentrationsbestimmung der RNA.....	14
2.2.3. Umschreibung der RNA in cDNA.....	14
2.2.4. Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time PCR .....	15
2.2.5. Durchführung der Real-Time PCR.....	16
2.2.6. Auswertung und Statistik der semiquantitativen Real-Time PCR.....	17
2.3. Proteincharakterisierung .....	17
2.3.1. Isolierung der Proteine.....	17
2.3.2. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	18
2.3.3. Immunoblot.....	20
2.3.4. Entwicklung der Proteinbanden mit Hilfe spezifischer Antikörper.....	21
2.3.5. Quantifizierung der Proteinexpression – Statistik.....	23
2.4. Immunzytochemische Untersuchung von TORC1 und TORC 3 .....	23
2.4.1. Vorbereitung und Färbung humaner Herzgewebeproben .....	23
2.4.2. Auszählung und Auswertung der humanen Herzgewebeproben.....	25
2.4.3. Vorbereitung und Färbung von neonatalem Rattenherzgewebe .....	26

## Inhaltsverzeichnis

---

2.5. Verwendete Materialien .....	26
2.5.1. Antikörper, Chemikalien, Primer und Puffer .....	26
2.5.2. Einwegartikel, Geräte, Kits .....	28
2.5.3. Zusammensetzung der verschiedenen Puffer und Lösungen .....	29
3. Ergebnisse .....	31
3.1. Einfluss von $\beta$ -Adrenozeptoragonisten und -antagonisten auf die Phosphorylierung von TORC1 in vitro.....	31
3.1.1. Einfluss unterschiedlich langer Inkubationszeiten mit Isoprenalin auf TORC1 ..	31
3.1.2. Einfluss ansteigender Isoprenalinkonzentrationen auf TORC1 nach 10- minütiger und 18-stündiger Isoprenalininkubation .....	33
3.1.3. Wirkung von Propranolol auf die TORC1-Gesamtproteinmenge bzw. den Phosphorylierungszustand von TORC1 .....	35
3.1.4. Auswirkung spezifischer $\beta$ 1- und $\beta$ 2-Adrenozeptorantagonisten auf die TORC1-Proteing Gesamtmenge und den Phosphorylierungsstatus .....	36
3.1.5. Wirkung von Isoprenalin auf die mRNA-Menge von PGC1 $\alpha$ .....	38
3.2. Immunzytochemische Analyse von TORC1 und TORC3 .....	39
3.2.1. Immunzytochemische Analyse von TORC1 im Herzgewebe der Ratte.....	39
3.2.2. Subzelluläre Lokalisation von TORC1 im pathologisch hypertrophierten humanen Myokard .....	39
3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von TORC3 im pathologisch hypertrophierten humanen Myokard .....	41
4. Diskussion .....	43
4.1. Validität des Modells .....	43
4.2. Einfluß $\beta$ -adrenerger Signale auf TORC1.....	43
4.3. PGC1 $\alpha$ als Zielgen von TORC1 am Herz?.....	45
4.4. Immunhistochemischer Status von TORC1 und TORC3 bei kardialen Hypertrophien unterschiedlicher Genese .....	45
5. Zusammenfassung .....	48
6. Literaturverzeichnis .....	49
7. Abkürzungsverzeichnis.....	58

## 1. Einleitung

---

### 1.1. Kardiale Hypertrophie

Die Herzinsuffizienz stellt ein zunehmendes Gesundheitsproblem der alternden Bevölkerung in den westlichen Industriestaaten dar (Daamen et al. 2015, McMurray und Stewart 2000). Laut Daamen et al. (2015) liegt die Prävalenz ab dem fünfundachtzigsten Lebensjahr bereits bei 17,8 %. Zudem lassen Übergewicht, Diabetes und bessere Versorgungsmöglichkeiten nach einem Herzinfarkt die Inzidenz der Herzinsuffizienz über die nächsten Jahrzehnte vermutlich weiter ansteigen (Daamen et al. 2015, Bernardo et al. 2010). Die Herzinsuffizienz stellt per se keine eigene Erkrankung dar, sondern ist die Folge bereits zugrunde liegender Herzerkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit, des Herzinfarktes oder der arteriellen Hypertonie (Steffel und Lüscher 2011). Risikofaktoren – wie beispielsweise die arterielle Hypertonie – können mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels einhergehen, welche möglicherweise das Vorstadium einer sich im klinischen Verlauf entwickelnden Herzinsuffizienz darstellt (Auer 2007).

Mittels Hypertrophie, also einer Vergrößerung des Herzmuskels, passt sich das Herz den erhöhten Druck- und Volumenverhältnissen an, welche pathologisch durch angeborene oder erworbene Herzfehler sowie physiologisch – zum Beispiel durch Herz-Kreislauf-Training – hervorgerufen werden können (Barry und Townsend 2010).

Der physiologischen als auch der pathologischen Hypertrophie ist gemein, dass eine Vergrößerung des Herzmuskels hauptsächlich durch Zunahme der Zellgröße, nicht aber der Zellanzahl erfolgt, da die meisten menschlichen Herzmuskelzellen nach der Geburt ihre Fähigkeit zur Zellteilung, und folglich der Proliferation, verlieren (Bernardo et al. 2010, Soonpaa et al. 1996).

Bei der physiologischen Hypertrophie durch Ausdauersport oder Schwangerschaft kommt es aufgrund des steigenden Blutdrucks zu einer Druck- und Volumenbelastung des linken Ventrikels durch Zunahme des Schlag- und damit des Herzminutenvolumens (Barry und Townsend 2010, Bernardo et al. 2010). Um diesen Zustand zu kompensieren, reagiert das Herz mit einer Hypertrophie und Dilatation des gesamten Herzens, wodurch eine ökonomische Herzarbeit erreicht wird (Barry und Townsend 2010). Diese Form der Hypertrophie ist reversibel und führt normalerweise nicht zu einem fibrotischen Umbau oder Insuffizienz des Herzmuskels (Li et al. 2012, Weeks und McMullen 2011).

Anders als bei der physiologischen Hypertrophie wird eine pathologische Hypertrophie meist durch kardiovaskuläre Erkrankungen oder durch Mutationen in Genen des sarkomeren Apparates hervorgerufen (Weeks und McMullen 2011).

Die pathologische kardiale Hypertrophie stellt einen Schlüsselfaktor für die Herzinsuffizienz dar und ist ein unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod (Bernardo et al. 2010). Ursächlich dafür sind u.a. morphologische Veränderungen der Kardiomyozyten, wie der Zelltod durch Apoptose und Nekrose. Infolgedessen kommt es zu einer massiven Gewebefibrosierung, wodurch der Herzventrikel versteift und sich damit dessen Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit bzw. die elektrische Kopplung der Kardiomyozyten mit Extrazellulärmatrixproteinen verschlechtert (Bernardo et al. 2010). Die mit der Fibrosierung einhergehende verminderte Kapillarisdichte führt zusätzlich zu einer Myokardischämie und begünstigt den Übergang von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz (Bernardo et al. 2010).

Eine Herzmuskelhypertrophie kann pathogen durch eine chronisch erhöhte kardiale Druckbelastung – beispielsweise aufgrund von Klappenstenosen oder arterieller Hypertonie – hervorgerufen werden (Barry und Townsend 2010, Bernardo et al. 2010, Gerdes 1992).

Ein Beispiel für die genetisch bedingte Hypertrophie stellt die meist autosomal dominant vererbte hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) dar (Brouwer et al. 2011). Ursächlich sind hierbei zahlreiche Mutationen in den Strukturproteinen des Sarkomers, der kleinsten kontraktile Einheit des Muskels (Brouwer et al. 2011, Watkins et al. 2011). Die HCM stellt folglich eine vererbte Herzmuskelerkrankung dar, die charakterisiert wird durch eine Myokardhypertrophie ohne sekundäre Ursachen wie Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit oder Adipositas und gilt als häufigste genetische Herz-Kreislauf-Erkrankung (Morita et al. 2010). Sie ist gekennzeichnet durch eine exzessive Verdickung des linksventrikulären, teilweise auch des rechtsventrikulären, Myokards (Prinz et al. 2011). Ist das Septum involviert, kommt es häufig zu einer asymmetrischen Hypertrophie (Prinz et al. 2011). Zusätzlich unterscheidet man bei der HCM eine obstruktive Form (HOCM), welche die linksventrikuläre Ausflussbahn verengt, von einer nicht obstruktiven Kardiomyopathie (HNCM) (Prinz et al. 2011).

Neben den morphologischen Veränderungen der Kardiomyozyten kommt es auch zu Modifikationen von Genen, die den Stoffwechsel regulieren: Im pathologisch hypertrophierten Herz wird die mRNA fetaler Gene hochreguliert, welche normalerweise im adulten Myokard unterdrückt werden, wie  $\beta$ -MHC ( *$\beta$ -myosin heavy chain*), BNP (*brain natriuretic peptide*), atriales MLC-1 (*myosin light chain 1*) und ANP (atriales natriuretisches Peptid) (Ber-

nardo et al. 2010). Gene, die hingegen hauptsächlich im adulten Myokard exprimiert werden, wie  $\alpha$ -MyHC ( *$\alpha$ -myosin heavy chain* = schwere Kette des  $\alpha$ -Myosins) und SERCA2a (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*), werden herunterreguliert, was zu Einbußen in der kontraktilen Funktion führt (Bernardo et al. 2010). Zudem wird der Glukosestoffwechsel auf Kosten des Fettsäurestoffwechsels erhöht, was bei einem hypertrophiertem Herzmuskel mit Sauerstoffmangel von Vorteil sein kann (Heather et al. 2011, van Bilsen et al. 2009).

Der direkte Einfluss der fetalen Genexpression auf die Herzhypertrophie ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass es sich um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, der dem Schutz des Herzens dient (Bernardo et al. 2010).

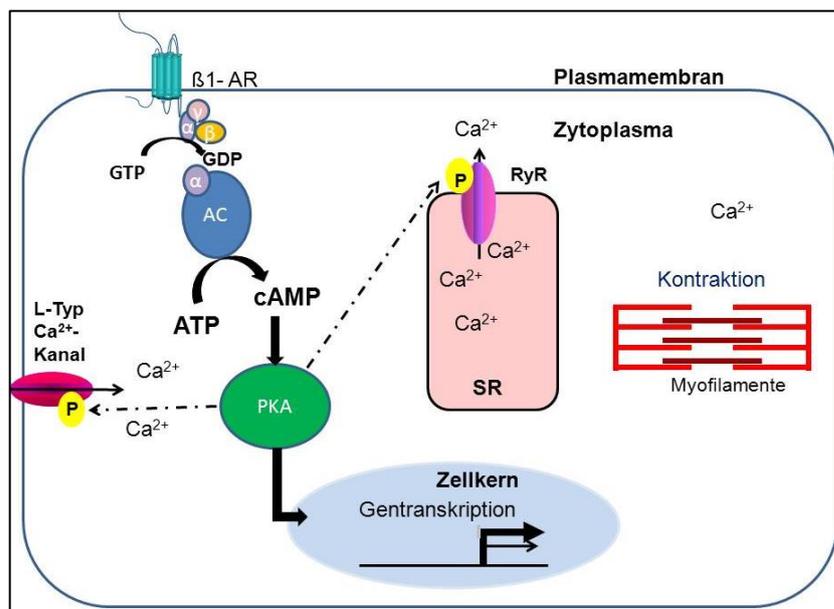
## 1.2. Einfluss $\beta$ -adrenerger Signale auf die Herzmuskelhypertrophie

Einige weitere Studien wiesen bereits auf die Bedeutung der  $\beta$ -Adrenozeptoren in Bezug auf die Pathogenese der Myokardhypertrophie hin.

Anhand von Tiermodellen konnte man feststellen, dass eine Dauerstimulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors durch Katecholamine zu einer Hypertrophie, insbesondere des linken Ventrikels, führen kann und somit einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Osadchii 2007). Der  $\beta$ 1-Rezeptor in den Kardiomyozyten ist hauptsächlich für den positiv chronotropen und inotropen Effekt der Katecholamine verantwortlich (Steinberg 1999). Dadurch können Signale des Sympathikus übermittelt werden, die in diesem Fall die Herzfrequenz und -kraft steigern. Sympathische Signale werden zum Beispiel in Stresssituationen im Sinne einer *fight or flight*-Situation ausgeschüttet und wirken deshalb anregend auf den Organismus (Grimm und Brown 2010). Um diesen Vorgang besser verstehen zu können, soll der für diese Arbeit wichtige Signalweg der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorstimulation durch den  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin genauer erläutert werden:

Laut Amin et al. (2011) exprimieren Kardiomyozyten drei  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). Hierbei stellt der kardiale  $\beta$ 1-Subtyp den stärksten Stimulus für die kardiale Funktion dar (Lohse et al. 2003).  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenozeptoren aktivieren das stimulierende Gs-Protein, während  $\beta$ 2 zusätzlich noch das Adenylatcyclase-inhibierende Gi-Protein stimuliert (Amin et al. 2011, Triposkiadis et al. 2009). Die Bindung von Isoprenalin am kardialen  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor (Abb. 1) katalysiert den Austausch von GTP (Guanosintriphosphat) gegen GDP (Guanosindiphosphat) an der  $G\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen, was zur Dissoziation des Heterotrimers in aktive  $G\alpha$ - und  $G\beta$ - $\gamma$ -Untereinheiten führt und das Enzym Adenylatcyclase aktiviert (Triposkiadis et al. 2009). Die Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP),

wodurch schließlich die Proteinkinase A (PKA) stimuliert wird und ihre Zielproteine phosphorylieren kann (Triposkiadis et al. 2009). Die PKA ist an der Myozytenkontraktion beteiligt, dadurch dass sie spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ, Ryanodinrezeptoren, Phospholamban, Troponin I, das Myosin-bindende Protein C, und den Phosphatasen Inhibitor-1 phosphoryliert (Lohse et al. 2003). Durch die Öffnung der L-Typ-Calciumkanäle und der Ryanodinrezeptoren erhöht sich der Calciumeinstrom (Triposkiadis et al. 2009). Das Protein Phospholamban führt im phosphorylierten Zustand eine schnelle myokardiale Relaxation (positiv lusitrope Wirkung) herbei, indem es die Calciumwiederaufnahme durch die im sarkoplasmatischen Retikulum integrierte Calciumpumpe beschleunigt (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Troponin I und das Myosin bindende Protein-C, welche die Calciumempfindlichkeit der Myofilamente reduzieren, beschleunigen dabei zusätzlich die Relaxation der Myofilamente (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Triposkiadis et al. 2009).



**Abb. 1: Übersicht über die β1-adrenerge Signalkaskade nach Isoprenalinstimulation im Kardiomyozyt.**

**AC: Adenylatcyclase, ATP: Adenosintriphosphat, β1-AR: β1-adrenerger Rezeptor, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, GTP: Guanosintriphosphat, PKA: Proteinkinase A, RyR: Ryanodinrezeptor, SR: sarkoplasmatisches Retikulum, durchgehender Pfeil: Substratfluss, gestrichelter Pfeil: Regulation**

Chronische Stimulation des β-adrenergen Rezeptors spielt eine entscheidende Rolle bei Herzerkrankungen (Sucharov et al. 2006). Durch kardialen Stress, und die damit verbundene Erhöhung der Herzfrequenz und Kontraktilität, wird die Ejektionsfraktion zunächst zwar verbessert, schadet jedoch einem insuffizienten Herz auf Dauer (Sucharov et al. 2006).

Eine schwere Herzinsuffizienz führt zu einer Desensitivierung und Herunterregulation der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren auf bis zu 50 % (Engelhardt et al. 1996, Kiuchi et al. 1993). Folglich werden bei einer Desensitivierung der Rezeptoren immer höhere Dosen des Agonisten notwendig, um eine effektiv gesteigerte myokardiale Kontraktionsfähigkeit zu erlangen (Ho et al. 2010).  $\beta_1$ -Rezeptorstimulation soll zudem die myokardiale Proteinsynthese durch Aktivierung myokardialer Wachstumsfaktoren (Angiotensin II, TGF- $\beta_1$ , IGF-1) hochregulieren (Sucharov et al. 2006). Schließlich konnte man bei chronischer Stimulation an Rattenmodellen eine Verminderung des sarkolemmlen L-Typ-Calciums und eine erhöhte Menge der Phosphodiesterase feststellen (Osadchii 2007). Es entsteht also ein Ungleichgewicht in der für die Herzmuskelkontraktion wichtigen Calciumhomöostase (Barry und Townsend 2010). Die Phosphodiesterase dephosphoryliert Phospholamban, die wiederum die Calciumwiederaufnahmefähigkeit der SERCA hemmt und schließlich die positiv lusitrope Wirkung aufhebt (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

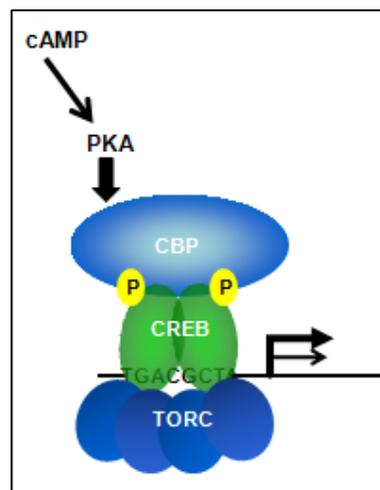
Der Grund dieser Veränderungen ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet einen kompensatorischen Mechanismus, der das Herz vor den Einwirkungen chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation schützen soll (Bernardo et al. 2010). Bei der Behandlung einer chronischen Herzinsuffizienz gehören u.a. deshalb  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten zur Standardtherapiemaßnahme (Streit et al. 2016). Durch den Einsatz von  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten kommt es vermutlich zu einer Resensibilisierung des kardialen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystems und schließlich wieder zu einer Hochregulation von  $\beta$ -Rezeptoren (Bollano et al. 2003, Lohse et al. 2003). Laut Lohse et al. (2003) können sogenannte  $\beta$ -Blocker die durch  $\beta_1$ -Rezeptorstimulation verursachte Hypertrophie, Apoptose und Nekrose an Kardiomyozyten unterbinden. Zudem verhindern sie die Veränderungen der kardialen Genexpression, die im fortgeschrittenen Stadium auftreten können (Lohse et al. 2003). Außerdem wird die Herzfrequenz gesenkt und eine effizientere Füllung während der Diastole gewährleistet (Böhm et al. 1998, Lohse et al. 2003).

Auch wenn die positiven Wirkungen von  $\beta$ -Blockern in der Behandlung der Herzinsuffizienz bislang gut erforscht sind, ist jedoch noch unklar, ob alle Auswirkungen der nachgeschalteten Rezeptorsignalkaskade tatsächlich immer kardiale Vorteile darstellen (Streit et al. 2016). Aus diesem Grund ist das Verständnis von nachgeschalteten Effektoren der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsignalkaskade für die Therapie einer Herzinsuffizienz essentiell, um nützliche von schädlichen Signalwegen besser unterscheiden zu können (Streit et al. 2016)

### 1.3. Der Transkriptionsfaktor CREB

Es wurde bereits eine neue Familie transkriptioneller Kofaktoren beschrieben, welche die Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von cAMP regulieren soll. Um den Einfluss  $\beta$ -adrenerger Stimuli auf die für die folgende Arbeit relevanten Proteine besser verstehen und erforschen zu können, soll zunächst die darauffolgende Signalkaskade erläutert werden.

Laut Altarejos und Montminy (2011) stimulieren erhöhte zelluläre cAMP-Spiegel die PKA, indem cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA bindet und somit die Dissoziation der PKA von den katalytischen Untereinheiten bewirkt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, gelangen die nun freien katalytischen Untereinheiten durch passive Diffusion in den Zellkern und phosphorylieren das *cAMP-responsive element-binding protein* (CREB) am Serin 133 (Altarejos und Montminy 2011). CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der an eine bestimmte Sequenz (*cAMP response element*-Sequenz) bindet und eine verstärkte Gentranskription bewirkt (Conkright et al. 2003).



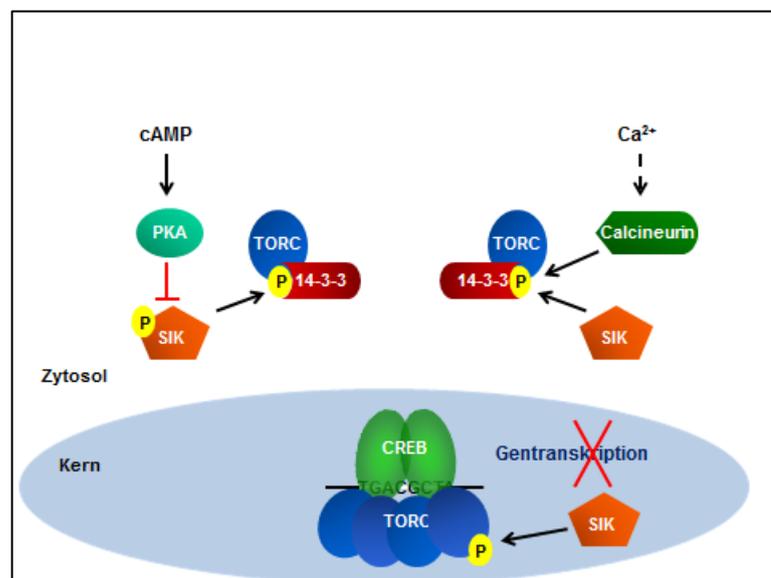
**Abb. 2: Der Transkriptionsfaktor CREB wird durch die Stimulierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren via cAMP-abhängiger Signalkaskade aktiviert.**

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CBP: *CREB-binding protein*, CREB: *CAMP-responsive element-binding protein*, PKA: Proteinkinase A, TORC: *Transducer of regulated CREB*.

### 1.4. Der transkriptionelle Koaktivator TORC

Studien zufolge nimmt CREB zusammen mit dem sogenannten cAMP-regulierten transkriptionellen Koaktivator (CRTC) Einfluss auf die mitochondriale oxidative Kapazität im Muskel, indem es die Expression des nukleären Hormonrezeptor Koaktivators PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*) hochreguliert (Altarejos und Montminy 2011). PGC1 $\alpha$  reguliert die mitochondriale Biogenese und spielt eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus (Wu et al. 2006).

Die Aktivität von CRTCs – auch als *transducer of regulated CREB* (TORC) bekannt – ist von seinem Phosphorylierungszustand abhängig (Spencer und Weiser 2010). Im inaktiven phosphorylierten Zustand befindet es sich im Zytoplasma (Abb. 3), besetzt von 14-3-3 Proteinen (Spencer und Weiser 2010). Verschiedene Mitglieder der Familie der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK, SIK, MARK) von Serin/ Threonin-Proteinkinasen phosphorylieren TORC und halten es so in einem inaktiven Zustand (Spencer und Weiser 2010). Zyklisches AMP und die Aktivierung der calciumabhängigen Phosphatase Calcineurin bewirken eine Dephosphorylierung von TORC, indem es zum einen zu einer Hemmung der *salt-inducible*-Kinasen (SIKs) kommt, die normalerweise TORC phosphorylieren und dadurch inaktivieren (Altarejos und Montminy 2011). Zum anderen wird die TORC-Phosphatase Calcineurin, welche die Dephosphorylierung von TORC bewirkt, aktiviert (Altarejos und Montminy 2011). Dephosphoryliertes bzw. aktiviertes TORC kann nun in den Zellkern einwandern, an die Dimerisierungs- und DNA-bindenden Bereiche von CREB binden und schließlich dessen Aktivität stimulieren (Altarejos und Montminy 2011). Es ermöglicht die Einstellung des Präinitiationskomplexes und verstärkt dadurch die transkriptionelle Aktivität der CREB-abhängigen Gene (Altarejos und Montminy 2011). Die N-terminale Region von TORC formt eine *coiled-coil*-Struktur, welche mit der *Basic Leucine Zipper* Domäne von CREB interagiert und eine tetramere Anordnung von TORC vermittelt (Altarejos und Montminy 2011).



**Abb. 3: Dynamische Regulierung von TORC**

—| : Hemmung      —> : Induktion      - -> : Regulation

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CREB: *cAMP-responsive element-binding protein*, PKA: Proteinkinase A, SIK: *Salt-inducible kinase*, TORC: *Transducer of regulated CREB*.

Zur TORC-Familie gehören drei Isoformen: TORC1, 2 und 3 (Wu et al. 2006). TORC1-mRNA wird hauptsächlich im ZNS exprimiert, wo es u.a. die Wirkung von hormonellen und nahrungsbedingten Signalen auf den Energiehaushalt vermittelt (Altarejos und Montminy 2011, Song et al. 2010, Wu et al. 2006). Im Zusammenspiel mit CREB ist TORC1 im Hypothalamus unter anderem an der Regulation des Appetits beteiligt (Altarejos und Montminy 2011). Hier fördert sowohl das aus dem Fettgewebe stammende Hormon Leptin als auch eine durch Nahrungsaufnahme bedingte Steigerung der zirkulierenden Glukose die Dephosphorylierung, und damit Aktivierung von TORC1 (Altarejos und Montminy 2011). Leptin verstärkt über den Hypothalamus die Aktivität des Sympathikus, wodurch Katecholamine an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren der weißen Fettzellen binden und dadurch die Adenylatcyclase, und folglich die cAMP-Synthese, stimulieren (Altarejos und Montminy 2011). Über die Aktivierung der Proteinkinase A werden der Energieumsatz und die Lipolyse gesteigert (Altarejos und Montminy 2011). Weitere Befunde geben Hinweise dafür, dass TORC1 notwendig für die Induktion und Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung im Hippocampus, und somit wesentlich an der Gedächtnisleistung sowie an Lernvorgängen, beteiligt ist (Spencer und Weiser 2010). Umgekehrt soll dessen Funktionsstörung bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen (Xue et al. 2015).

TORC2 spielt insbesondere in der Leber eine entscheidende Rolle, wo es als Stellglied der CREB-Aktivität an der Regulation der hepatischen Glukoneogenese beteiligt ist (Altarejos und Montminy 2011, Song et al. 2010). Altarejos und Montminy (2011) beschrieben die Regulation folgendermaßen: Durch Anstieg des zirkulierenden Glucagons während einer Nahrungskarenz fördert die durch Proteinkinase A induzierte Phosphorylierung und Blockierung von SIK2 die Dephosphorylierung und die Migration von TORC2 in den Zellkern, was schließlich zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität von CREB-abhängigen Genen führt. Die G-Protein-abhängige Dephosphorylierung von TORC2 scheint also bei Nahrungskarenz Einfluss auf die Regulation der Glukoneogenese zu haben (Altarejos und Montminy 2011). Bei Wiederaufnahme der Nahrung wird die Glukoneogenese, und damit die hepatische Glukose, durch den Insulinanstieg heruntergefahren, sodass das nukleäre TORC2 durch die nun aktive SIK2 phosphoryliert wird und schließlich aus dem Zellkern zurück ins Zytoplasma gelangt (Dentin et al. 2007). Man vermutet, dass die Inhibierung von TORC2 einen Schutz vor zu hohem Blutglukoseanstieg durch die Glukoneogenese bieten soll (Dentin et al. 2007).

Die höchste TORC3-Expression findet man hingegen im weißen und im braunen Fettgewebe, in welchen es durch Katecholamine über die Proteinkinase stimuliert wird und zur Insulinresistenzentwicklung beitragen soll (Altarejos und Montminy 2011, Song et al. 2010). Laut Altarejos und Montminy (2011) fördert normalerweise das von den Adipozyten stammende Leptin den Energieumsatz, indem es an den hypothalamischen Zentren

eingreift, welche die sympathischen Efferenzen erhöhen (Altarejos und Montminy 2011). Eine erhöhte sympathische Nervenaktivität durch Ausschüttung von Katecholaminen fördert, wie bereits beschrieben, die Lipolyse, da sie an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren binden und damit die intrazelluläre cAMP-Synthese stimulieren (Altarejos und Montminy 2011). Laut Song et al. (2010) schwächt TORC3 die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignalwirkung im Fettgewebe und fördert somit Fettleibigkeit. Der Einfluss von TORC3 konnte bislang bei TORC3-Knockout-Mäusen festgestellt werden und könnte in ähnlicher Wirkweise auch zur Fettleibigkeit von Menschen beitragen (Song et al. 2010).

Bruno et al. (2014) zeigten anhand von Mausmodellen, dass eine anhaltende  $\beta$ -adrenerge Stimulation bzw. körpereigene Katecholamine während intensiven Trainings zu einer CREB-vermittelten Gentranskription durch Aktivierung von TORC2 und TORC3 im Skelettmuskel führen. Eine Überexprimierung induzierte sogar eine Muskelfaserhypertrophie (Bruno et al. 2014).

## **1.5. Fragestellung und Modell**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, TORC und dessen Funktion, Aktivierung und zelluläre Lokalisation im Herzmuskel nachzuweisen und seine Beteiligung an maladaptiven Prozessen im Sinne einer Hypertrophie zu beleuchten.

Es wurde untersucht, ob TORC durch  $\beta$ -adrenerge Signale aktiviert wird. Für diese Untersuchungen wurde ein Modell, bestehend aus neonatalen Rattenkardiomyozyten, verwendet, in welchem der Effekt von Isoprenalin im Sinne einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation auf die Proteinexpression von TORC1 getestet wurde. Hierzu wurde in Konzentrations-Wirkungskurven sowie Zeit-Wirkungskurven der Effekt des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin auf den Phosphorylierungszustand von TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge untersucht.

Als mögliches Zielgen von TORC1 wurde die Expression der PGC1 $\alpha$  mRNA mittels Real-Time PCR untersucht.

Um zu klären, ob TORC in der Pathogenese der maladaptiven Hypertrophie eine Rolle spielt, wurden Herzgewebeproben von Patienten mit angeborenen genetisch bedingten und erworbenen myokardialen Herzerkrankungen mittels Immunhistochemie auf die subzelluläre Lokalisation von TORC1 und TORC3 untersucht und verglichen.

## 2. Material und Methodik

---

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Zu Beginn der Isolierung der Kardiomyozyten wurden alle vorbereiteten Medien im Brutschrank (Fa. Sanyo Fisher Sales, München) oder im Wasserbad (Fa. GFL 1083 mbH, Burgwedel) bei 37 °C vorinkubiert. Die Zellen, die unter einer sterilen Werkbank (Fa. CleanAir, Palastine, USA) und mit sterilen Gefäßen isoliert wurden, sind im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert worden.

Außerdem wurden Zellkulturplatten (ø 3,5 cm, Nunclon® Surface, Fa. Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) für die Aussaat vorbereitet. Um ein optimales Anwachsen der Kardiomyozyten zu gewährleisten, mussten die Zellkulturplatten vor der Ausplattierung mit Gelatine beschichtet werden. Dafür wurden 10 g Gelatine (Fa. Sigma, Deishofen) in 500 ml 0,1 M HCl mit einem Magnetrührer im Wasserbad auf 80 °C erwärmt, wieder abgekühlt und schließlich steril filtriert. Die Gelatine konnte dann bei -20 °C gelagert werden. Zur Beschichtung wurde die Gelatine ca. 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und unter der sterilen Werkbank auf Zellkulturplatten (Ø 3,5 cm) verteilt, wobei pro Platte 2 ml Gelatine benötigt wurde. Nach mindestens einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank konnte die Gelatine abgenommen werden und mit je 2 ml DMEM-Medium (Fa. Invitrogen, Paisley, UK) pro Platte aufgefüllt werden. Das Medium wurde sofort wieder abgenommen, verworfen und erneut dazugegeben, um die Platten von Resten der Salzsäurelösung zu befreien. Die nun mit DMEM-Medium gefüllten Gelatineplatten wurden bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank aufbewahrt.

#### 2.1.2. Isolierung der Rattenkardiomyozyten

Für das Anlegen einer neuen Kultur wurden in der Regel 10-15 weibliche und männliche Wistar-Ratten im Alter von ein bis zwei Tagen verwendet. Der Vorteil bei neonatalen Rattenkardiomyozyten ist, dass sich diese im Gegensatz zu Kardiomyozyten von adulten Ratten in der Kultur noch teilen und dabei einen schlagenden Monolayer in der Kulturschale bilden können. Der zu etwa 80 % geschlossene schlagende Monolayer ist bereits 24 Stunden nach Aussaat stark ausgeprägt.

Um die Kardiomyozyten zu isolieren, wurden die Ratten durch Dekapitation getötet, anschließend die Herzen steril herauspräpariert und in einem autoklaviertem Becherglas mit

calcium- und magnesiumfreien PBS (Fa. Invitrogen, Paisley, UK) aufbewahrt. Unter der Sterilwerkbank wurden die Herzen dann mit einer sterilen Pinzette aus dem Becherglas herausgenommen und in einer Zellkulturplatte mit einer Schere zerkleinert, bis die Herzgewebezellen mit einer 5 ml-Pipette aufnehmbar waren und schließlich in 10 ml Dissoziationspuffer (Zusammensetzung siehe Tab. 1) überführt werden konnten. Der Dissoziationspuffer, welcher vor Verwendung in ein 50 ml-Röhrchen (Fa. BioChemica GmbH, Flacht) sterilfiltriert wurde, sollte die Zellen aus dem Gewebeverband lösen.

**Tab. 1: Zusammensetzung des Dissoziationspuffers**

Substanz	Menge
Collagenase Type 2	50 mg
Trypsin	100 mg
PBS-Puffer, calcium-/magnesiumfrei	ad 50 ml

Die im Dissoziationspuffer befindlichen Herzgewebezellen wurden nun in einem 37 °C warmen Wasserbad mit Hilfe eines Magnetrührstabes gewaschen, um die Zellen von Erythrozyten zu befreien. Dafür wurde der Überstand der Lösung mit den Erythrozyten nach 5 Minuten abgenommen und verworfen. Hiernach wurden erneut 10 ml des auf 37 °C vorgewärmten Dissoziationspuffers zugegeben und im Wasserbad so lange gerührt, bis eine deutliche Trübung der Lösung zu erkennen war (ca. 20-45 Minuten).

Der Überstand mit den nun vereinzelt Zellen (ca. 9 ml) konnte dann mit einer 1ml-Pipette aufgenommen und in ein auf 37 °C vorgewärmtes 50 ml-Röhrchen mit 30 ml Medium überführt werden. Dadurch wurden die Verdauungsenzyme des Dissoziationspuffers gehemmt und die Zellen mit entsprechenden Nährstoffen versorgt. Anschließend wurde die Lösung bei 37 °C im Brutschrank bis zur weiteren Verarbeitung inkubiert und die verbliebenen Herzgewebezellen wieder mit 10 ml des Dissoziationspuffers aufgefüllt und gerührt.

Um möglichst alle Herzzellstückchen im Dissoziationspuffer auflösen zu können, wurde dieser Vorgang noch dreimal wiederholt. Danach konnten alle vier Röhrchen für 5 Minuten bei 21 °C mit 56 g zentrifugiert werden, so dass sich die Zellen deutlich am Boden jedes Röhrchens absetzten und der Überstand vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette abgenommen werden konnte. Um die Pellets vom Boden zu lösen, wurde in jedem Röhrchen jeweils 5 ml 37 °C vorgewärmtes Medium (Tab. 2) vorsichtig auf- und abpipettiert und dann schließlich in einem Röhrchen vereinigt.

**Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums**

Substanz	Menge
FCS	10 %
P/S	1 %
DMEM/F12	ad 30ml

Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension enthielt neben den Kardiomyozyten auch Herzfibroblasten. Um die Anreicherung der Kardiomyozyten und gleichzeitig die Abtrennung von Fibroblasten zu ermöglichen, wurde nun ein sogenanntes „Pre-Plating“ durchgeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension auf eine große unbeschichtete Zellkulturplatte (Ø 10 cm Falcon®, Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) ausplattiert. Auf einer unbeschichteten Platte heften sich bevorzugt Fibroblasten an, was schließlich zu einer Anreicherung der Kardiomyozyten im Überstand der Kulturschale führt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C im Brutschrank wurde der mit Kardiomyozyten angereicherte Überstand abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 Minuten haben sich die verbliebenen, unverdauten Gewebereste am Grund des Röhrchens angesammelt und konnten mit Hilfe einer Pipette vorsichtig entfernt werden. Ausgezählt wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer'schen Zählkammer (Fa. Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) und entsprechend für die Aussaat verdünnt. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 110.000 Zellen/cm<sup>2</sup> mit je 2 ml in die vorbereiteten, mit Gelatine beschichteten, kleinen Zellkulturplatten ausgesät. Um die Zellproliferation verbliebener Fibroblasten zu unterdrücken, wurde 100 µM 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) der Firma Sigma dem Medium zugegeben (Tab.3).

**Tab. 3: Zusammensetzung des Waschmediums**

Substanz	Menge
FCS	5 %
P/S	1 %
BrdU	100 µM
DMEM/F12	95 %

### 2.1.3. Kultivierung und Behandlung der Zellen

Nach Inkubation der Kardiomyozyten im Brutschrank über Nacht hatten sich die Zellen am Boden der Kulturschale abgesetzt und konnten am nächsten Morgen mit Waschmedium gewaschen werden. Dadurch sollten tote Zellen entfernt werden. Die verbliebenen Kardiomyozyten wurden für weitere 10 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Kardiomyozyten für 48 Stunden in Abwesenheit des fötalen Kälberserums (FCS, Fa. Biochrom AG, Berlin) inkubiert (Hungerphase). Dies war not-

wendig, da FCS eine undefinierte Menge an Katecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin) enthalten kann, welche den zu untersuchenden Einfluss der  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten und -antagonisten hätte stören können. Um den durch FCS-Entzug entstandenen Proteinverlust im Waschmedium auszugleichen wurde bovines Serumalbumin (Fa. Biochrom AG, Berlin) in einer Konzentration von 2 g/l F12-Medium zugesetzt (Tab. 4). Nach Beginn der Hungerphase kam es aufgrund des fehlenden FCS zu keiner mikroskopisch sichtbaren Zellproliferation mehr. Zudem war eine Abnahme bzw. eine Unregelmäßigkeit der Schlagfrequenz erkennbar.

**Tab. 4: Medium für die Hungerphase**

Substanz	Menge
BSA	2 g/l
P/S	1 %
BrdU	100 $\mu$ M
DMEM/F12	ad 2 ml/ Zellkulturplatte

Nach der 48-stündigen Hungerphase konnten die entsprechenden  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten/-antagonisten (Tab. 5) zugesetzt und die Zellen schließlich geerntet werden.

**Tab. 5: Konzentration der  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten/-antagonisten**

Substanz	Menge (ad 2 ml Medium/ Zellkulturplatte)
Isoprenalin	0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M
Propranolol	10 $\mu$ M
ICI-118,551	1 $\mu$ M
CGP-20712A	1 $\mu$ M

#### 2.1.4. Zellernte

Für die Zellernte wurden die Zellen zunächst mit D-PBS (Fa. Invitrogen, Paisley, UK) gewaschen und anschließend durch Zugabe von 900  $\mu$ l TRIZOL-Reagenz (Fa. Invitrogen, Paisley, UK) lysiert. Ungelöste Reste wurden mit der Pipettenspitze abgeschabt und schließlich in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Fa. STARLAB GmbH, Höltigbaum) überführt und eingefroren.

## **2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration und Umschreibung in cDNA**

### **2.2.1. Isolierung der RNA**

Aus dem TRIZOL-Reagenz wurde die RNA mit Hilfe einer Chloroformextraktion isoliert. Hierzu wurde zunächst in jedes Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zugegeben und danach ca. 30 Mal geschwenkt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch dann zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20-45 Minuten bei 4 °C und 5.600 g in einer Tischzentrifuge (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert. Dadurch entstand eine Auftrennung in drei Phasen. Die obere klare wässrige Phase enthielt die RNA, die untere rot gefärbte Phenol-/Chloroformphase, die Proteine. Die chromosomale DNA befand sich in der Interphase zwischen RNA und Proteinphase. Die obere Phase (ca. 400 µl) wurde dann zur weiteren Aufreinigung in ein separates RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNA in der mittleren Phase abgenommen, verworfen und schließlich die verbliebene organische Phase mit den Proteinen eingefroren. Für die weitere Aufreinigung und Konzentrierung der RNA wurde zunächst je 600 µl Isopropanol (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zu der RNA enthaltenden Phase zugegeben. Diese Lösung wurde dann auf eine Säule (Rneasy® Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden) pipettiert. Diese Säule besitzt eine Siliziummembran, welche RNA-Moleküle bindet, während Proteinreste und andere Moleküle durch die Zentrifugalkraft durch die Membran hindurchgeschleust werden. Nach unterschiedlichen Waschschrritten konnte die RNA mit entsprechendem Volumen an RNase-freiem Wasser von der Membran gelöst werden. Die einzelnen Waschschrritte erfolgten dann gemäß dem Herstellerprotokoll (Rneasy® Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden).

### **2.2.2. Konzentrationsbestimmung der RNA**

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 95 µl 10 mM TRIS pH 7,5 (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 5 µl der extrahierten RNA in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte in einem Eppendorf-Photometer (BioPhotometer®, Fa. Eppendorf AG, Hamburg), wobei der reine Puffer als Leerwert diente.

### **2.2.3. Umschreibung der RNA in cDNA**

Da in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nur DNA, jedoch keine RNA verwendet werden kann, muss die RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden, was mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase geschieht. Die dabei erhaltene DNA wird als *complementary DNA* (cDNA) bezeichnet.

Bei der Umschreibung von RNA in cDNA wurde zunächst RNase-freies Wasser in je ein kleines Reaktionsgefäß (Fa. STARLAB GmbH, Hamburg) pipettiert. Danach kamen je 2 µl eines Gemisches aus je 1 µl Nukleotiden (dNTP-Gemisch) und 1 µl Random-Hexamer-Primer hinzu (Zusammensetzung siehe Tab. 6).

**Tab. 6: Substanzen für die reverse Transkription (1)**

Substanz	Menge
Random Primer (3 µg/µl) = 1:10 verd. 300 ng/µl	1 µl
dNTP-Gemisch	1 µl
- 10 µl dATP (100 mM Stock)	
- 10 µl dCTP (100 mM Stock)	
- 10 µl dGTP (100 mM Stock)	
- 10 µl dTTP (100 mM Stock)	
- 60 µl RNase-freies H <sub>2</sub> O	

Auf die Zugabe von 1 µg RNA folgte eine fünfminütige Inkubation bei 60 °C im PCR-Gerät (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf). Nach Ablauf dieser Zeit wurden jeweils weitere 7 µl eines Gemisches aus 5x Puffer, DTT und einem RNase-Inhibitor (RNase Out) hinzugefügt (Zusammensetzung siehe Tab. 7).

**Tab. 7: Substanzen für die reverse Transkription (2)**

Substanz	Menge
5x Puffer	4 µl
100 mM DTT	2 µl
RNase Out	1 µl

Es folgten weitere 2 Minuten Inkubation bei 42 °C. Für die Umschreibung der RNA selbst wurde je 1 µl der Reversen Transkriptase (Superscript II, Fa. Invitrogen, Paisley, UK) hinzupipettiert und wiederum 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu stoppen wurde der Ansatz im Anschluss für 15 Minuten auf 72 °C erhitzt. Die cDNA konnte nun für die Real-Time PCR verwendet werden.

#### 2.2.4. Verwendete Oligonukleotide für die Real-Time PCR

Die Bestimmung der mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene erfolgte mit Hilfe der Real-Time PCR. Hierzu mussten zunächst PCR-Assays für die entsprechenden Gene etabliert werden.

Die Sequenzen für die verwendeten Primer wurden mit entsprechender Software gesucht. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen Sense- und Antisense-Primer mindestens ein Intron lag, um Messungenauigkeiten durch Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen (Tab. 8).

**Tab. 8: Sense- und Antisense-Primer**

Gen	Sense	Antisense
TORC1	5'-AGGTCATGAAGGACCTGAGC-3'	5'-TGCCACGCTCACGATATACT-3'
PGC1 $\alpha$	5'-AACCATGCAAACCACACCC-3'	5'-CATTGTCTCTGCTGCTGTTTC-3'
GAPDH	5'-GGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA-3'	5'-TGCCGTTGAACTTGCCGTGGG-3'

Um die Spezifität der Primer zu testen, wurde die molekulare Größe des amplifizierten PCR-Produktes in einem Agarosegel überprüft.

### 2.2.5. Durchführung der Real-Time PCR

Für die Durchführung der Real-Time PCR wurde ein vorgefertigter Reaktionsmix der Firma Bio-Rad (iQ™SYBR®Green Supermix) verwendet, zu dem die entsprechenden Primer und die cDNA gegeben wurden (Zusammensetzung siehe Tab. 9).

**Tab. 9: Real-Time PCR Ansatz**

Substanz	Menge
iQ™SYBR®Green Supermix	18 $\mu$ l
Sense-Primer 10 nmol/l	1 $\mu$ l
Antisense-Primer 10 nmol/l	1 $\mu$ l
verdünnte cDNA	5 $\mu$ l

„SYBR-Green“ setzt sich zwischen die Basenpaare der im Verlauf der PCR-Reaktion gebildeten PCR-Produkte. Dadurch beginnt das „SYBR-Green“ zu fluoreszieren. Je mehr PCR-Produkt bei jedem PCR-Zyklus entsteht, desto stärker ist die Fluoreszenz, welche vom Gerät gemessen und aufgezeichnet werden kann, was schließlich zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der gebildeten Menge führt. Der PCR-Zyklus, bei dem dieser Anstieg erfolgt, wird als *cycle threshold* oder Ct-Wert bezeichnet. Je mehr mRNA-Kopien von einem bestimmten Gen in einer entsprechenden Probe vorliegen, desto früher wird dieser Ct-Wert erreicht. Durch den Vergleich des Ct-Wertes zweier Proben kann dann errechnet werden, um wie viel Prozent sich die Expression der zu untersuchenden mRNA in den Proben unterscheidet. Im Idealfall bedeutet ein

Unterschied von einem Ct, dass sich die mRNA-Kopien eines bestimmten Gens in zwei verschiedenen Reaktionsansätzen um den Faktor 2 unterscheiden.

Dafür musste in einem Vorversuch zunächst getestet werden, wie viel cDNA im entsprechenden Reaktionsmix eingesetzt werden muss. Dies ist für jedes zu untersuchende Gen unterschiedlich und hängt von seiner Expressionsstärke ab. Um die optimale Verdünnung der cDNA zu finden, musste daher für jedes Primerpaar zunächst eine sogenannte Verdünnungsreihe gemessen werden. Diese setzte sich aus sechs verschiedenen Reaktionsansätzen zusammen, welche cDNA in einer Verdünnung von 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320 enthielten. Idealerweise sollte sich der Ct-Wert zwischen zwei Verdünnungsstufen um jeweils ein Ct unterscheiden. Je nach Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens erwies sich hierbei eine Verdünnung von 1:40 bis 1:160 als ideal.

### **2.2.6. Auswertung und Statistik der semiquantitativen Real-Time PCR**

Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Ct-Werte bei den einzelnen Proben nicht durch Fehler bei der Umschreibung oder der RNA-Konzentrationsbestimmung in einzelnen Proben verfälscht waren, wurde von allen Proben der Ct-Wert eines Kontrollgens (*Housekeeping-Gen*) ermittelt. Als Kontrollgen wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die in den einzelnen Proben gemessenen Ct-Werte für ein bestimmtes Gen wurden dann um den Ct-Wert für GAPDH in dieser Probe korrigiert. Die weitere Berechnung erfolgte schließlich mit diesen korrigierten Ct-Werten (=  $\delta$ -Ct-Werte). Für die grafische Darstellung wurden die für die einzelnen Behandlungszeitpunkte einer Kultur ermittelten Ct-Werte in Prozentwerte umgerechnet und zueinander in Verhältnis gesetzt, wobei der Ct-Wert aus den Kontrollen als 100 % gesetzt wurde. Die Prozentwerte aus den verschiedenen Kulturen konnten dann gemittelt werden. Für die statistische Auswertung wurden die errechneten  $\delta$ -Ct-Werte verwendet.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte mittels *SPSS Statistics 19.0* (Fa. IBM). Die Diagramme wurden mit Excel (Fa. Microsoft) erstellt.

## **2.3. Proteincharakterisierung**

### **2.3.1. Isolierung der Proteine**

Um die Proteine nach der mRNA-Aufreinigung aus der verbliebenen Phenol-/Chloroformphase auszufällen, wurde je 1 ml Isopropanol zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und darauf folgender 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 9.500 g wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurde jeweils 1 ml 0,3 M Guanidin/ HCl-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) hinzupipettiert, für 20 Minuten bei Raumtempe-

ratur inkubiert und im Anschluss 20 Minuten bei 4 °C und 9.500 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach konnte abermals der Überstand verworfen werden. Dieser Waschvorgang war noch zweimal zu wiederholen. Im Anschluss wurde je 1 ml unvergällter 100 %-iger Ethanol (Fa. GeReSo mbH, Einbeck) hinzugegeben und wie in den drei vorherigen Schritten inkubiert und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands kamen die Reaktionsgefäße für 30-40 Minuten bei Raumtemperatur in die Vakuumzentrifuge um die verbliebenen Pellets zu trocknen und alle Ethanolreste zu entfernen.

In jedes Reaktionsgefäß wurden dann 50 µl Proteinpuffer (Zusammensetzung für 1 ml Proteinpuffer siehe Tabelle 10) pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, damit sich die Proteinpellets lösten.

**Tab. 10: Proteinpuffer**

Substanz	Menge
Puffer	750 µl mit 1,33 % SDS (1,33 g SDS in 100 ml Ampuwa®)
Phosphostop	100 µl (1 Tablette in 1 ml 100 mM PBS, pH 7,2 lösen)
Complete	150 µl (1 Tablette in 1,5 ml 100 mM PBS pH 7,2 lösen)

Um die ungelösten Reste in den Reaktionsgefäßen zu pelletieren, wurden die Proben noch einmal für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 9.500 g zentrifugiert und der erhaltene Überstand mit den gelösten Proteinen nach erfolgter Konzentrationsbestimmung bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinprobe 1:6 mit Ampuwa® (Fa. Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) verdünnt. Hinzu kam außerdem ein Bicinchoninsäure-Reagenz (BCA-Reagenz, Fa. Pierce, Rockford, USA) im Verhältnis 1:20. Nach 30-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37 °C konnte die Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda = 562$  nm mit Hilfe des Eppendorf-Fotometers gemessen werden, wobei der Proteinpuffer als Leerwert diente.

### 2.3.2. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sollten die Proteine mittels SDS denaturiert und nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Das negativ geladene SDS lagert sich an Proteine an und führt eine negative Gesamtladung herbei. Dadurch gewährleistet es die Wanderung im elektrischen Feld. Hier wurde mit dem SDS-PAGE-System nach Laemmli (Laemmli 1970) gearbeitet. Bei dieser Methode verwendet man ein Trenngel (unten) und ein Sammelgel (oben), die sich in ihrer Porengröße, dem pH und der Ionenstärke unterscheiden.

Das Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tab. 11) wurde zunächst mittels eines Kamms in zehn gleichgroße Taschen unterteilt, in die der Marker und die Proteinprobe aufgetragen wurden.

Da das Sammelgel eine geringere Dichte (d.h. einen geringeren Prozentsatz an Acrylamid) als das Trenngel vorweist, sammeln sich die Proteine an der Trennfront zwischen Sammel- und Trenngel, bevor sie zusammen in das Trenngel einwandern. Auf diese Weise stellt man unter anderem die Entstehung klar umrissener Proteinbanden sicher. Das Trenngel (Zusammensetzung siehe Tab. 12) sollte im Anschluss die Proteine mittels eines elektrischen Feldes der Größe nach auftrennen.

**Tab. 11: 4 %-iges Sammelgel**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
40 % Acrylamid	300 µl
0,5 M TRIS pH 6,8	380 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,3 ml
20 % SDS	15 µl
10 % APS	15 µl
TEMED	3 µl

**Tab. 12: 10 %-iges Trenngel**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
40 % Acrylamid	2,50 ml
1,5 M TRIS pH 8	3,7 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,75 ml
20 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Um Proteine in ihrer Primärstruktur zu erhalten, wurde nicht nur ein denaturierendes Gel verwendet sondern auch Auftragspuffer (Zusammensetzung siehe Tab. 13), der insbesondere Sekundärstrukturen lösen sollte. Die Sekundärstruktur entsteht durch Disulfidbrückenbindungen von Cysteinen. Durch Mercaptoethanol werden diese zu SH-Gruppen reduziert und dadurch gebrochen. Zusätzlich sorgt Glycerol dafür, dass das Gemisch auf den Grund der Geltaschen sinkt.

**Tab. 13: Zusammensetzung des Auftragspuffers**

Substanz	Menge
0,5 M TRIS pH 6,8	2,5 ml
Glycerol	5,0 ml
20 % SDS	2,0 ml
1 % Bromphenolblau	0,2 ml
Mercaptoethanol	15 % (v/v)

Nach Durchmischen von 10 µl Auftragspuffer mit 50 µg Protein und Ampuwa® (hochreines, hypotonisches Wasser) zu einer Probe von 30 µl wurde diese 7 Minuten auf 97°C im PCR-Gerät (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) denaturiert. Dadurch konnten die Proteine denaturiert werden. Währenddessen wurde die Apparatur für die Gelelektrophorese aufgebaut und mit Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 3,5 mM SDS in H<sub>2</sub>O bidest.) gefüllt (Tab. 14). Danach konnte jede Geltasche mit 30 µl Probe befüllt werden. Zur Größenbestimmung der Proteine im aufgetrennten Proteinlysate wurde in einer der Geltaschen ein Marker aufgetragen, der aus farbigen markierten Proteinen mit einer definierten Größe bestand (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH). Die Elektrophorese konnte dann bei 90 Volt gestartet werden. Nachdem die Banden nach circa 15 Minuten das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht, bis anhand des Markers eine ausreichende Auftrennung zu erkennen war.

**Tab. 14: Zusammensetzung des Laufpuffers**

Substanz	Menge
TRIS pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
0,1 % SDS	3,5 mM in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst

### 2.3.3. Immunoblot

Um spezifische Proteine nachweisen zu können, müssen sie zuerst von dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Fa. Whatman GmbH, Dassel) übertragen (geblottet) werden. Dazu wurden das Acrylamidgel und die Nitrozellulosemembran in eine Blotklammer gespannt, welche mit Transferpuffer (247 mM TRIS, 192 mM Glycin und 20 % (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst) gefüllt war und mit Eis gekühlt wurde (Tab. 15). Der Proteintransfer benötigte bei 400 mA mindestens 3 Stunden.

Die nachfolgenden Schritte des Färbens, Waschens und Blockens wurden allesamt auf einem Schwenktisch vollzogen.

**Tab. 15: Transferpuffer für den Immunoblot**

Substanz	Menge
TRIS	247 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v) in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst

Nach dem *Blotting*-Vorgang wurden die Membranen zunächst 20 Minuten mit Ponceau-Rot (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gefärbt. Damit wurde überprüft, ob die Proteine gleichmäßig auf die Nitrozellulose-Membran transferiert wurden. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Membranen im Anschluss mit Aqua dest. gespült, bis ausschließlich die gefärbten Banden zu sehen waren. Zur Eliminierung des gesamten Ponceau-Rots auf den Banden wurden die Membranen anschließend zweimal für 5 Minuten in TBS (50 mM TRIS/HCl pH 7,6 und 150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst) gewaschen (Tab.16). Zur Absättigung proteinfreier Zonen auf der Nitrozellulosemembran wurden die Membranen für zwei Stunden in TBS mit 5 %-igem Milchpulver (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert (geblockt). Die Absättigung der proteinfreien Membranoberfläche mit Milchproteinen sollte eine unspezifische Antikörperbindung mit folglich unspezifischer Nachweisreaktion vermeiden.

**Tab. 16: Zusammensetzung des TBS-Puffers**

Substanz	Menge
TRIS/HCl pH7,6	50 mM
NaCl	150 mM in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst

### 2.3.4. Entwicklung der Proteinbanden mit Hilfe spezifischer Antikörper

Um das zu untersuchende Protein auf der Membran sichtbar zu machen, wurden die Membranen schließlich zum Inkubieren mit dem Antikörper über Nacht in eine Kühlkammer bei 4 °C gestellt. Dieser für das zu untersuchende Protein spezifische Antikörper wird als Primärantikörper bezeichnet. Die verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tab. 17: Primärantikörper des Immunoblots**

Primärantikörper	Verdünnung (in TBS + 5 % Milchpulver + 0,1 % Tween )
Monoclonal rabbit anti-TORC1, clone EPR3382	1:1.000
Polyclonal rabbit anti-Phospho (SER151)-TORC1	1:500
Monoclonal anti-GAPDH, clone 14C10	1:4.000

Am folgenden Morgen wurden die Membranen erneut 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer (50 mM TRIS/ HCL pH 7,6, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween 20 in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst) gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen (Tab. 18).

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Membranen mit an Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 19).

**Tab. 18: TBST-Puffer**

Substanz	Menge
TRIS/HCl pH 7,6	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 % (v/v) in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst

**Tab. 19: Sekundärantikörper für den Immunoblot**

Sekundärantikörper	Verdünnung in TBS + 5 % Milchpulver + 0,1 % Tween
HRP-Polymer Goat anti-rabbit Ig (TORC1)	1:2.000
HRP-Polymer Goat anti-rabbit Ig (TORC1-P)	1:2.000
HRP-Polymer Goat anti-rabbit Ig (GAPDH)	1:150.000

Die Sekundärantikörper binden spezifisch an bestimmte Bereiche (meist Fc-Bereiche) des Primärantikörpers. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die entstehende Chemilumineszenz kann so detektiert werden. Nach der Detektion folgte abermals ein Waschschrift für 3 x 15 Minuten in TBST. Um die Banden darstellen zu können, wurden die Membranen 5 Minuten in einer abgedunkelten Box mit Lumineszenzlösung (Chemilumineszenz SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, Rockford, USA) inkubiert.

Die gebildete Chemilumineszenz wurde dann mit Hilfe eines Detektionsgeräts (LAS-300 Imaging System, Fuji) aufgezeichnet. Aus der Stärke des Signals konnte auf die Menge des entsprechenden Proteins in der Probe geschlossen werden.

Die oben genannten Vorgänge der Proteincharakterisierung (SDS-Page, Immunoblot) wurden für TORC1 sowie TORC1-P (mit jeweils GAPDH) getrennt voneinander durchgeführt. Auf das Ablösen der entsprechenden TORC1-Antikörper mittels *Stripping Buffer* und darauffolgender Inkubation mit dem TORC1-P-Antikörper wurde verzichtet.

### **2.3.5. Quantifizierung der Proteinexpression – Statistik**

Zur Quantifizierung der Proteinexpression von TORC1 und TORC1-P wurde die optische Dichte der einzelnen Banden (Quantity One, Fa. Bio-RadLaboratories GmbH, München) ermittelt und jeweils um diejenige des Ladekontroll-Antikörpers GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normiert sowie anschließend ins Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle gesetzt. Um die Menge an aktivem dephosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge zu ermitteln, wurde nachfolgend der Quotient aus TORC1-P und TORC1 gebildet. Die ermittelten Mittelwerte aus allen Kulturen wurden dann jeweils auf eine Normalverteilung hin untersucht und parametrisch mittels Einstichproben-t-Tests auf Mittelwertunterschiede überprüft. Bei Mittelwertvergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde die Varianzanalyse für Messwiederholungen (ANOVA) verwendet und anschließend zur Überprüfung von signifikanten Mittelwertunterschieden Post-Hoc-Paarvergleiche durchgeführt. Die Diagramme wurden mit Excel (Fa. Microsoft) erstellt.

## **2.4. Immunzytochemische Untersuchung von TORC1 und TORC 3**

Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von TORC wurden an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Herzgewebezellen durchgeführt. Im Falle von TORC1 erfolgten die Analysen an Rattengewebebelegen und für TORC1 und TORC3 an intraoperativ entnommenen humanen Proben.

### **2.4.1. Vorbereitung und Färbung humaner Herzgewebezellen**

Für die immunzytochemische Bestimmung von TORC1 und TORC3 wurden Myokardproben von jeweils zehn Patienten mit einer erworbenen Aortenstenose und einer angeborenen hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) verwendet, welche von der Herz-Thorax-Gefäßchirurgie in Göttingen intraoperativ entnommen worden waren und für die aktuelle Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Formalin fixiert und in Paraffinblöcke gegossen.

Hierzu wurden die fixierten Proben mittels eines Einbettautomaten (Leica EG 1150 H, Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 60-100 %-igem Ethanol und Xylol (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) entwässert und schließlich in Paraffin eingegossen. Von diesen Paraffinblöcken wurden dann mit Hilfe eines Mikrotoms je 1 µm dicke Scheiben abgeschnitten, auf einen Superfrostobjektträger (Fa. Gebhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) aufgetragen und über Nacht bei 37 °C bzw. für eine Stunde bei 55 °C getrocknet. Um die Schnitte wieder zu entparaffinieren, wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 3 x je 8 Minuten Xylol, 2 x 5 Minuten je 100 %-iger Ethanol

und je 1 x 5 Minuten in 96-, 70-, 50, und 30 %-igem Ethanol inkubiert. Zum Schluss wurde abermals 5 Minuten mit destilliertem Wasser inkubiert. Für die Vorbehandlung hat sich nach verschiedenen Vorversuchen ein Puffer mit hohem pH-Wert etabliert (Target Retrieval Puffer high pH aus Kit Flex (50x), Fa. DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark). Eine solche Vorbehandlung ist wichtig, um durch die Formalinfixierung eventuell unzugänglich gewordene Epitope des Zielproteins für den Antikörper wieder zugänglich zu machen. In diesem wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 90 °C nochmals inkubiert. Danach wurde 5 x 2 Minuten in TBST (TBS + 0,1 % Tween) gewaschen. Um Fehlfärbungen in den Präparaten zu verhindern, wurde die endogene Peroxidase mit einem Peroxidase Blocking Reagent (Fa. DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark) geblockt und danach bei Raumtemperatur für 12 Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 2 x 5 Minuten TBST und eine 30-minütige Inkubation mit dem Antikörper-Diluent, um Stellen, die eine unspezifische Bindung des Antikörpers herbeiführen können, zu blockieren. Als Primärantikörper wurde ein humaner TORC1-Antikörper bzw. TORC3-Antikörper verwendet. Parallel dazu wurde jeweils eine zu TORC1 bzw. TORC3 gehörige Negativkontrolle verwendet (siehe Tab. 20). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger 5 x für 2 Minuten in TBST gewaschen und der Sekundärantikörper für TORC1 und TORC3 aufgetragen (siehe Tab. 21) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneutem Waschschrift mit TBST (TBS + 0,025 % Tween) für 2 x 5 Minuten sollten die Bindungsstellen durch ein Substrat-Chromogensystem mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Fa. DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark) sichtbar gemacht werden.

Nach 5 bis 30 Minuten Inkubationszeit sollte eine deutliche Färbung zu sehen sein. Danach wurde mit Aqua dest. (4 x 1 Minute und 1 x 5 Minuten) gewaschen. Es folgte eine kurze Gegenfärbungsphase (15 Sekunden bis 1 Minute) mit Hämalaun, welches eine Blaufärbung der Kerne bewirkte. Anschließend wurden die Objektträger für 7 Minuten unter fließendes lauwarmes Leitungswasser gestellt. Um die Objektträger letztendlich mit Entellan eindecken zu können, folgte eine Entwässerungsphase über eine aufsteigende Alkoholreihe (1 x 1 Minute 96 % Ethanol, 2 x 2 Minuten 100 % Alkohol und 1 x 3 Minuten Xylol).

Zur Auswertung und Beurteilung des Gewebes und dessen Färbung wurden die Objektträger mittels eines Olympus Dotslide Scanning Microscops (Fa. Olympus GmbH, Hamburg) eingescannt und gespeichert.

**Tab.20: Primäre humane Antikörper für die Immunzytochemie**

Primärer humaner Antikörper	Verdünnung
Monoclonal Rabbit anti-TORC-1-human	1:50 in Antikörper-Diluent
Monoclonal Rabbit anti-TORC-3-human	1:250 in Antikörper-Diluent
IsotypeControl Rabbit IgG (TORC1 Negativkontrolle)	1:50 in Antikörper-Diluent
IsotypeControl Rabbit IgG (TORC3 Negativkontrolle)	1:250 in Antikörper-Diluent

**Tab. 21: Sekundärer humaner Antikörper für die Immunzytochemie**

Sekundärer humaner Antikörper	Verdünnung
Zytochem Plus HRP Polymer anti-rabbit (TORC1)	unverdünnt
Zytochem Plus HRP Polymer anti-rabbit (TORC3)	unverdünnt

#### 2.4.2. Auszählung und Auswertung der humanen Herzgewebeproben

Um Aufschluss darüber zu erhalten, wie stark TORC bei unterschiedlichen Krankheitsbildern exprimiert wird bzw. in welchen Zellen TORC hauptsächlich lokalisiert ist, wurden die verschiedenen mit TORC1 und TORC3 gefärbten Präparate eingescannt. Danach konnten die Kardiomyozyten am Computer mit Hilfe des dot slide 2.1 Systems ausgezählt und ausgewertet werden. Dazu wurden in jedes Präparat zehn gleichgroße Rechtecke mit je 63.000  $\mu\text{m}^2$  gelegt. In diesen Rechtecken wurde zunächst das Zytoplasma je nach Stärke der Färbung von TORC1 und TORC3 (und somit nach Vorhandensein von TORC1 und TORC3) anhand einer Skala von 0 (gar keine Färbung) bis 3 (kräftige Färbung) semi-quantitativ bewertet. Danach wurden die Gesamtzahl der Kardiomyozyten und schließlich die Anzahl an Kardiomyozyten der mit TORC1 und TORC3 deutlich angefärbten Kerne ausgezählt. Im Anschluss wurde dann der Durchschnitt der in den zehn Rechtecken eines Präparats bewerteten Färbintensität errechnet und die Anzahl der gefärbten Kerne aller Rechtecke ins Verhältnis zu der Gesamtkernzahl gesetzt. Die verschiedenen Ergebnisse konnten dann mit den Krankheitsbildern in Bezug gesetzt und verglichen werden. Anschließend wurden die Werte auf eine Normalverteilung hin überprüft. Bei Nachweis einer signifikanten Abweichung von der Normalverteilung wurde nicht-parametrisch getestet und die Werte mittels eines Mann-Whitney-U-Tests bzw. exakten  $\text{Chi}^2$ -Tests auf signifikante Zusammenhänge überprüft. Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte mittels *SPSS Statistics 19.0* (Fa. IBM). Hierbei erfolgte eine Beratung sowie teilweise Überprüfung der Umsetzung der Datenanalyse durch die medistat GmbH Kiel.

### 2.4.3. Vorbereitung und Färbung von neonatalem Rattenherzgewebe

Für die Immunzytochemie an neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden 24 Stunden alte Rattenherzen aus der laufenden Kultur verwendet. Diese wurden in Formalin fixiert und schließlich in Paraffin eingebettet. Die einzelnen Wasch-/Blocking- und Inkubationsschritte können dem Protokoll der Färbung humaner Kardiomyozyten entnommen werden. Als Primärantikörper wurde Monoclonal Rabbit anti-TORC1-Rat (Fa. Epitomics, Burlingame, USA) und als Sekundärantikörper Rabbit on Rodent HRP Polymer (Fa. Biocare GmbH, Urbach) verwendet. Die jeweilige Verdünnung der Antikörper ist in Tabelle 22 und 23 dargestellt.

**Tab. 22: Primärantikörper gegen TORC1 für die Immunzytochemie (Ratte)**

Primärantikörper gegen TORC1	Verdünnung
Monoclonal Rabbit anti-TORC-1-Rat	1:100 in Antikörper-Diluent

**Tab. 23: Sekundärantikörper gegen TORC1 für die Immunzytochemie (Ratte)**

Sekundärantikörper gegen TORC1	Verdünnung
Rabbit on Rodent HRP Polymer	1:76

## 2.5. Verwendete Materialien

### 2.5.1. Antikörper, Chemikalien, Primer und Puffer

**Tab. 24: Chemikalien, Primer und Puffer**

Ampuwa	Fa. Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
BCA-Reagenz	Fa. Pierce, Rockford, USA
$\beta$ 1-Adrenozeptorantagonist	CGP20712A, Fa. Sigma, Deisenhofen
$\beta$ 2-Adrenozeptorantagonist	ICI118551, Fa. Sigma, Deisenhofen
BrdU	Fa. Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA	Fa. Biochrom AG, Berlin
CGP-20712A	Fa. Sigma, Deishofen
Chloroform	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete	Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen
Collagenase Type 2	Fa. Worthington, Lakewood, USA
DAB	Fa. DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
DNTP-Gemisch	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DTT	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Essigsäure	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethanol	Fa. GeReSo mbH, Einbeck
F12/ DMEM	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
FCS	Fa. Biochrom AG, Berlin
Fish-Skin-Gelatine	Gelatin from cold water fish skin, 45 %, Fa. Sigma, Deishofen
Formalin	Roti ®-Histofix 4 %, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gelantine	Fa. Sigma, Deishofen
Glycerol	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidin	Fa. Merck, Darmstadt
HCL	Fa. Merck, Darmstadt
ICI-118,551	Fa. Sigma, Deishofen
Isoprenalin	Fa. Sigma, Deishofen
Isopropanol	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lumineszenzlösung	Chemilumineszenz SuperSignal ® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Fa. Pierce, Rockford, USA
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, Fa. Merck, Darmstadt
Milchpulver	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Negativkontrolle Immunzytochemie TORC1	IsotypeControl Rabbit IgG ISO-2745, Fa. Epitomics Inc., Burlingame, USA
Negativkontrolle Immunzytochemie TORC3	IsotypeControl Rabbit IgG ISO-2670, Fa. Epitomics Inc., Burlingame, USA
PBS	D-PBS, Fa. Invitrogen, Paisley, UK
PBS w/o CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Penicillin/ Streptomycin	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Peroxidase Blocking Reagent	Fa. DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Phosphostop	Fa. Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Ponceau-Rot	Ponceau S ®, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Primärantikörper GAPDH (Proteinnachweis)	Monoclonal anti GAPDH, clone 14C10, Cell Signalling Inc., Boston, USA
Primärantikörper TORC1 (Proteinnachweis)	Monoclonal rabbit anti-TORC1, clone EPR3382, Fa. Epitomics Inc., Burlingame, USA
Primärantikörper TORC1-P (Proteinnachweis)	Polyclonal rabbit anti-Phospho(SER151)-TORC1, Cell Signaling Technology Inc., Boston, USA
Primärantikörper TORC1 (Immunzytochemie Human)	Monoclonal Rabbit anti-TORC-1-human, Fa. Epitomics 3331-1 Lot, Burlingame, USA

Primärantikörper TORC3 (Immunzytochemie Human)	Monoclonal Rabbit anti-TORC-3-human, Fa. Epitomics 2670-1, Burlingame, USA
Primärantikörper TORC1 (Immunzytochemie Ratte)	Monoclonal Rabbit anti-TORC1-Ratte, Fa. Epitomics 2745-1, Burlingame, USA
Primer Sense und Antisense	Fa. Biomers.net GmbH, Ulm
Propranolol	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Random Primer	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Reaktionspuffer Real-Time PCR	Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien
Reaktionspuffer 5x (gehört zu Superskript II)	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Reverse Transkriptase	Superskript II, Fa. Invitrogen, Paisley, UK
RNase out	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Sammelgel für SDS-Gelelektrophorese	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS ultra pure	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sekundärantikörper GAPDH (Proteinnachweis)	Goat anti-rabbit Ig, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg
Sekundärantikörper TORC1 (Proteinnachweis)	Goat anti-rabbit Ig, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg
Sekundärantikörper TORC1-P (Proteinnachweis)	Goat anti-rabbit Ig, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg
Sekundärantikörper TORC1 und TORC3 (Immunzytochemie Human)	Zytochem Plus HRP Polymer anti-Rabbit, ZUC032-006, Fa. Zytomed Systems GmbH, Berlin
Sekundärantikörper TORC1 (Immunzytochemie Ratte)	Rabbit on Rodent HRP Polymer Detection Biocare RMR622 + XR Factor Biocare XRF964, Fa. Biocare GmbH, Urbach
SYBR-Green Reaktionspuffer	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TEMED	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trenngel für SDS-Gelelektrophorese	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton	Triton X 100, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIZOL® Reagenz	Fa. Invitrogen, Paisley, UK
Trypsin	Fa. Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylol	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### 2.5.2. Einwegartikel, Geräte, Kits

**Tab. 25: Einwegartikel, Geräte, Kits**

Brutschrank	Fa. Sanyo Fisher Sales, München
Einbettautomat	Leica EG 1150H, Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Elektrophoresekammer	Mini-Protean ® 3 Cell System, Fa. Bio-Rad

Fotometer	Laboratories GmbH, München BioPhotometer ®, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Kit für Proteinbestimmung	BCA-Protein-Assay-Kit, Fa. Pierce, Rockford, USA
Kit für RNA-Aufreinigung	Rneasy ® Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden
Neubauer'sche Zählkammer	Fa. Paul Marienfeld GmbH & co. KG
Nitrozellulosemembran	Potran ® Nitrocellulose Transfer Membrane, Fa. Whatman GmbH, Dassel
Olympus Dotslide Scanning Microscope	Fa. Olympus GmbH, Hamburg
PCR-Gerät	I Cycler ® Thermal Cycler, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Plastikröhrchen (15 ml und 50 ml)	Fa. BioChemica GmbH, Flacht
Proteinmarker für Western Blot	Precision Plus Protein ® Kaleidoscope ® Standards (10-250 kDa), Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Fa. STARLAB GmbH, Höltigbaum
Spannungsgeber für Elektrophoresekammer	Power Pac 300 ®, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	Fa. CleanAir, Palatine, USA
Superfrostobjektträger	Fa. Gebhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Tischzentrifuge	Fa. Hereaus Holding GmbH, Hanau
Transferkammer	Mini Trans-Blot ® Electrophoretic Transfer Cell System, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasserbad	Fa. GFL 1083, Burgwedel
Zellkulturschalen klein (Ø 3,5 cm)	Nunclon ® Surface, Fa. Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen groß (Ø 10 cm)	Falcon ®, Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

### 2.5.3. Zusammensetzung der verschiedenen Puffer und Lösungen

**Tab. 26: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer und Lösungen**

Nährmedium	5 % FCS, 1 % P/S, ad 30 ml DMEM/F12-Medium
Proteinpuffer	Puffer: 750 µl mit 1,33 % SDS (1,33 g SDS in 100 ml Ampuwa®), Phosphostop: 100 µl (1 Tablette in 1 ml 100 mM PBS, pH7,2 lösen), Complete: 150 µl (1 Tablette in 1,5 ml 100 mM PBS pH7,2 lösen)

Ansatz für Umschreibung der RNA in cDNA (1)	Random Primer: 1 µl, dNTP-Gemisch: 1 µl (je 10 µl dATP, dCTP, dGTP, dCTP, 60 µl RNase-freies H <sub>2</sub> O)
Ansatz für Umschreibung der RNA in cDNA (2)	4 µl 5x Buffer, 2 µl DTT (100 mM) und 1 µl RNase Out
Auftragspuffer für SDS-Gelelektrophorese	2,5 ml 0,5 M TRIS, 5,0 ml Glycerol, 2,0 ml 20 % SDS, 0,2 ml 1 Bromphenolblau, 15 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Dissoziationspuffer	50 mg Collagenase Type 2, 100 mg Trypsin, 50 ml PBS-Puffer (calcium-/magnesiumfrei)
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	25 mM TRIS, 19 mM Glycin, 3,5 mM SDS in H <sub>2</sub> O bidest.
Medium für Hungerphase	2 g/l BSA, 1 % P/S, 10 µM BrdU ad DMEM/F12
Real-Time PCR Ansatz	18 µl iQ™SYBR®Green Supermix, 1 µl Sense-Primer (10 nmol/l), 1 µl Antisense-Primer (10 nmol/l), 5 µl verdünnte cDNA
Sammelgel für SDS-Gelelektrophorese	300 µl 40 % Acryl, 380 µl 0,5 M TRIS pH 6,8, 2,3 ml dd H <sub>2</sub> O, 15 µl 20 % SDS, 15 µl 10 % APS, 3 µl TEMED
TBS-Puffer	50 mM TRIS/HCL pH 7,6, 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst
TBST-Puffer	50 mM TRIS/HCL pH 7,6, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween 20 in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst
Transferpuffer für Immunoblot	247 mM TRIS, 192 mM Glycin und 20 % (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst
Trenngel für SDS-Gelelektrophorese	2,50 ml 40 % Acryl, 3,7 ml 1,5 M TRIS pH 8, 3,75 ml dd H <sub>2</sub> O, 50 µl 20 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED
Waschmedium	5 % FCS, 1 % P/S, 10 µM BrdU ad 95 % DMEM/F12

### **3. Ergebnisse**

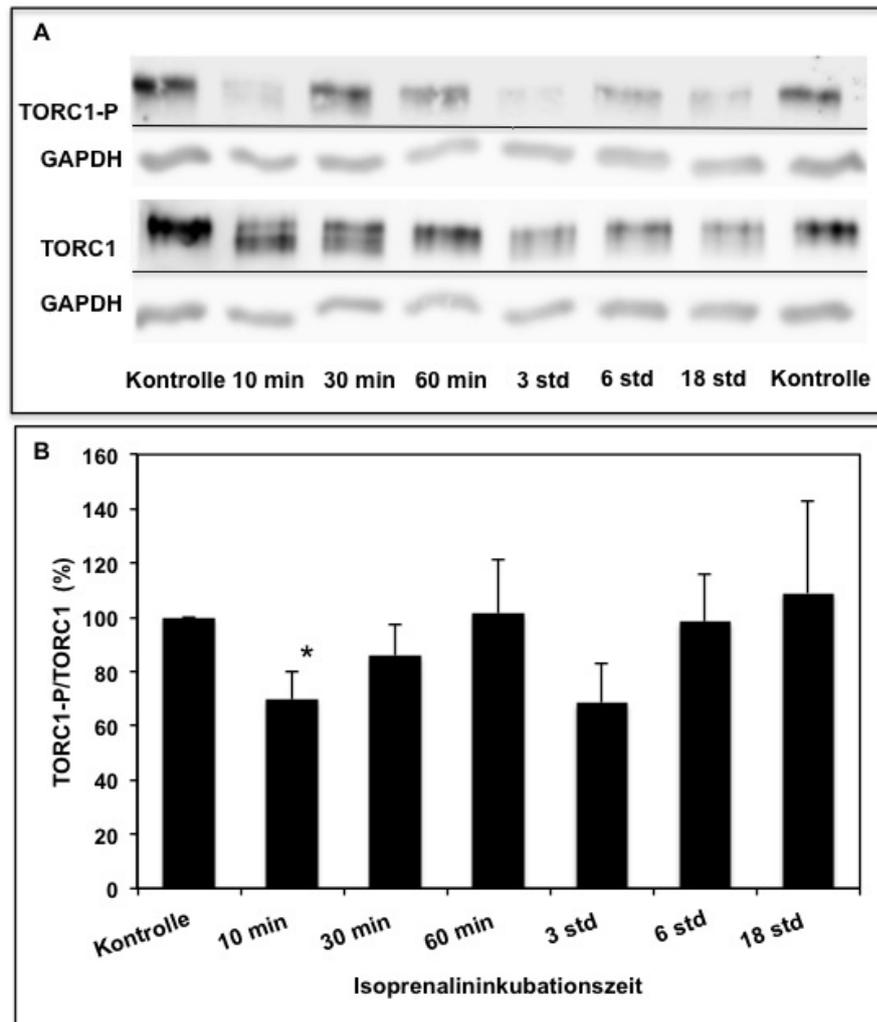
---

#### **3.1. Einfluss von $\beta$ -Adrenozeptoragonisten und -antagonisten auf die Phosphorylierung von TORC1 in vitro**

Ziel war es zu untersuchen, ob die durch den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor ausgelöste Signalkaskade den Phosphorylierungszustand von TORC1 in Kardiomyozyten beeinflusst. Dazu wurden die Zellkulturen, bestehend aus neonatalen Rattenkardiomyozyten, zunächst mit dem  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin behandelt.

##### **3.1.1. Einfluss unterschiedlich langer Inkubationszeiten mit Isoprenalin auf TORC1**

Um die Auswirkungen einer Isoprenalinbehandlung auf die Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge feststellen zu können, wurde eine Pharmakokinetik für die Behandlung mit Isoprenalin erstellt (Abb. 4). Die Inkubationszeiten mit 10  $\mu$ M Isoprenalin betragen 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 18 Stunden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten.



**Abb. 4: Wirkung von Isoprenalin auf die Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur Gesamtmenge von TORC1 nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten.**

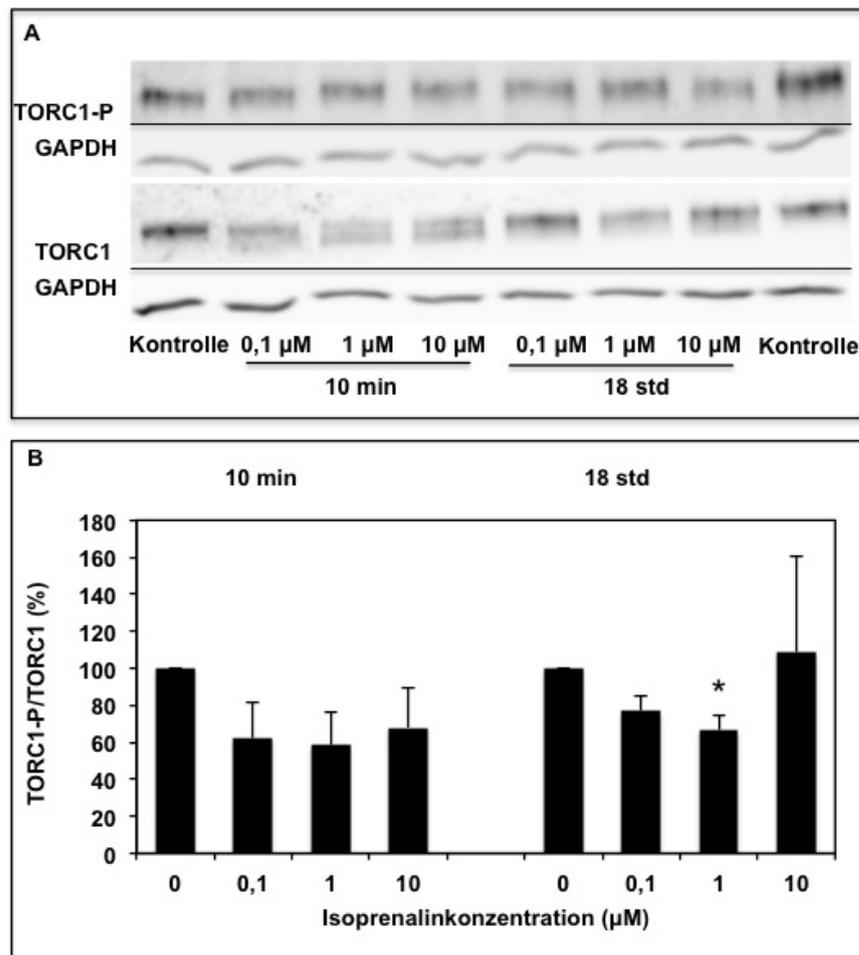
**A:** Beispielhaftes Bild eines Immunoblots der Gesamtmenge von TORC1 sowie der Menge an phosphoryliertem TORC1 nach Inkubation der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit jeweils 10  $\mu$ M Isoprenalin.

**B:** Evaluation der zeitabhängigen Wirkung von Isoprenalin auf das Verhältnis von phospho-TORC1 zur Gesamtmenge von TORC1. Die Ordinate zeigt die relativen prozentualen Veränderungen der Proteinmenge des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses in den Kardiomyozyten, welche durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten (Abszisse) mit 10  $\mu$ M Isoprenalin induziert wurden. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4-6 Versuchen. \* $p \leq 0,05$  (Einstichproben-t-Test): signifikanter Unterschied im Verhältnis TORC1-P/TORC1 gegenüber dem Verhältnis der unbehandelten Kontrolle.

Bei den Versuchen (Abb. 4) zeigte sich nach 10-minütiger Isoprenalininkubation eine signifikante Abnahme (70 %  $\pm$  10 %,  $n = 6$ ,  $p = 0,03$ ) des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle (100 %,  $n = 6$ ). Nach 30-minütiger (86 %  $\pm$  12 %,  $n = 5$ ), einstündiger (101 %  $\pm$  20 %,  $n = 5$ ), dreistündiger (68 %  $\pm$  14 %,  $n = 5$ ), sechsstündiger (98 %  $\pm$  18 %,  $n = 4$ ) und 18-stündiger (109 %  $\pm$  34 %,  $n = 4$ ) Isoprenalininkubation ergaben sich keine Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zu dem Verhältnis der Kontrolle.

### 3.1.2. Einfluss ansteigender Isoprenalinkonzentrationen auf TORC1 nach 10-minütiger und 18-stündiger Isoprenalininkubation

Wie in Abb. 4 gezeigt, führt in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine zehnminütige Inkubation mit Isoprenalin zu einer Dephosphorylierung von TORC1. Es wurde nun eine Konzentrations-Wirkungskurve für Isoprenalin aufgenommen (Abb. 5). Dafür wurden die Kulturen jeweils 10 Minuten oder 18 Stunden mit ansteigenden Isoprenalinkonzentrationen inkubiert und die Auswirkung auf den GAPDH-normierten Quotienten des phosphorylierten TORC1-Proteins zur gesamten TORC1-Expression untersucht.



**Abb. 5: Wirkung ansteigender Isoprenalinkonzentrationen auf die Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge nach 10-minütiger und 18-stündiger Inkubation der neonatalen Rattenkardiomyozyten.**

**A:** Beispielhafter Immunoblot von TORC1-P und TORC1 nach 10-minütiger und 18-stündiger Inkubation mit 0,1 μM, 1 μM und 10 μM Isoprenalin.

**B:** Konzentrations-Wirkungskurve nach 10-minütiger (links) und 18-stündiger (rechts) Isoprenalininkubation zum zugehörigen Immunoblot.

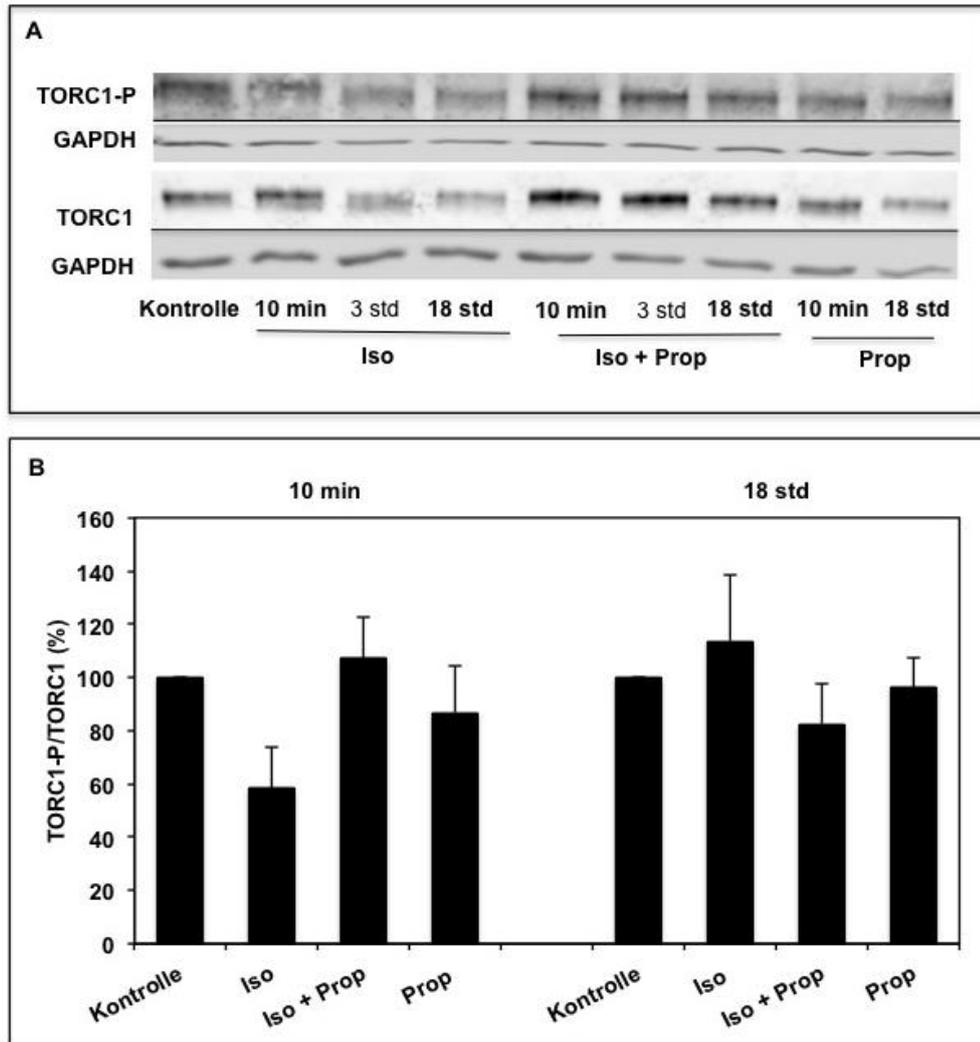
Die Ordinate zeigt die relativen prozentualen Veränderungen der Proteinmenge des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses in den Kardiomyozyten, welche durch ansteigende Isoprenalinkonzentrationen (Abszisse) nach 10 Minuten bzw. 18 Stunden induziert wurden. Das TORC1-P/TORC1-Verhältnis der unbehandelten Kontrollen wurde jeweils als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4 Versuchen. \* $p \leq 0,05$  (Einstichproben-t-Test): signifikanter Unterschied im Verhältnis TORC1-P/TORC1 gegenüber dem Verhältnis der unbehandelten Kontrolle.

Nach einer 10-minütigen Isoprenalininkubation (Abb. 5B links) mit 0,1  $\mu\text{M}$  ( $62 \% \pm 19 \%$ ,  $n = 4$ ), 1  $\mu\text{M}$  ( $59 \% \pm 17 \%$ ,  $n = 4$ ) und 10  $\mu\text{M}$  ( $68 \% \pm 22 \%$ ,  $n = 4$ ) Isoprenalin fand sich keine konzentrationsabhängige Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle (100 %,  $n = 4$ ).

Bei der Untersuchung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses nach einer 18-stündigen Isoprenalininkubation (Abb. 5B rechts) zeigte sich bei 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin ( $67 \% \pm 8 \%$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0,022$ ) eine signifikante Abnahme des Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle (100 %,  $n = 4$ ). Nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  ( $109 \% \pm 52 \%$ ,  $n = 4$ ) und 0,1  $\mu\text{M}$  ( $77 \% \pm 8 \%$ ,  $n = 4$ ) Isoprenalin fand sich keine Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zu dem Verhältnis der Kontrolle. Eine lineare konzentrationsabhängige Abnahme des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses bei ansteigender IsoprenalinKonzentration konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.3. Wirkung von Propranolol auf die TORC1-Gesamtproteinmenge bzw. den Phosphorylierungszustand von TORC1

Um zu untersuchen, ob die Wirkung von Isoprenalin auf das TORC1-P/TORC1-Verhältnis von  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelt wird, wurde der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenozeptorantagonist Propranolol eingesetzt (Abb. 6). Die Inkubation mit Propranolol (10  $\mu$ M) erfolgte jeweils eine halbe Stunde vor Isoprenalingabe (10  $\mu$ M).



**Abb. 6: Wirkung des  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten Propranolol auf die Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge nach 10-minütiger und 18-stündiger Inkubation mit und ohne nachfolgender Isoprenalinbehandlung.**

**A:** Beispielhafte Immunoblots der TORC1-Gesamtmenge sowie der Menge an phosphoryliertem TORC1 nach 10-minütiger, 3- und 18-stündiger Inkubation der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 10  $\mu$ M Isoprenalin (Iso) und/oder 10  $\mu$ M Propranolol (Prop).

**B:** Die quantitative Auswertung des Immunoblots erfolgte für die 10-minütige und 18-stündige Isoprenalin- und/oder Propranololinkubation. Die Ordinate zeigt die prozentualen Veränderungen des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses, welche durch Inkubation mit 10  $\mu$ M Isoprenalin und/oder 10  $\mu$ M Propranolol (Abszisse) nach 10 Minuten bzw. 18 Stunden induziert wurden. Das TORC1-P/TORC1-Verhältnis der unbehandelten Kontrolle wurde jeweils als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3-6 Versuchen.

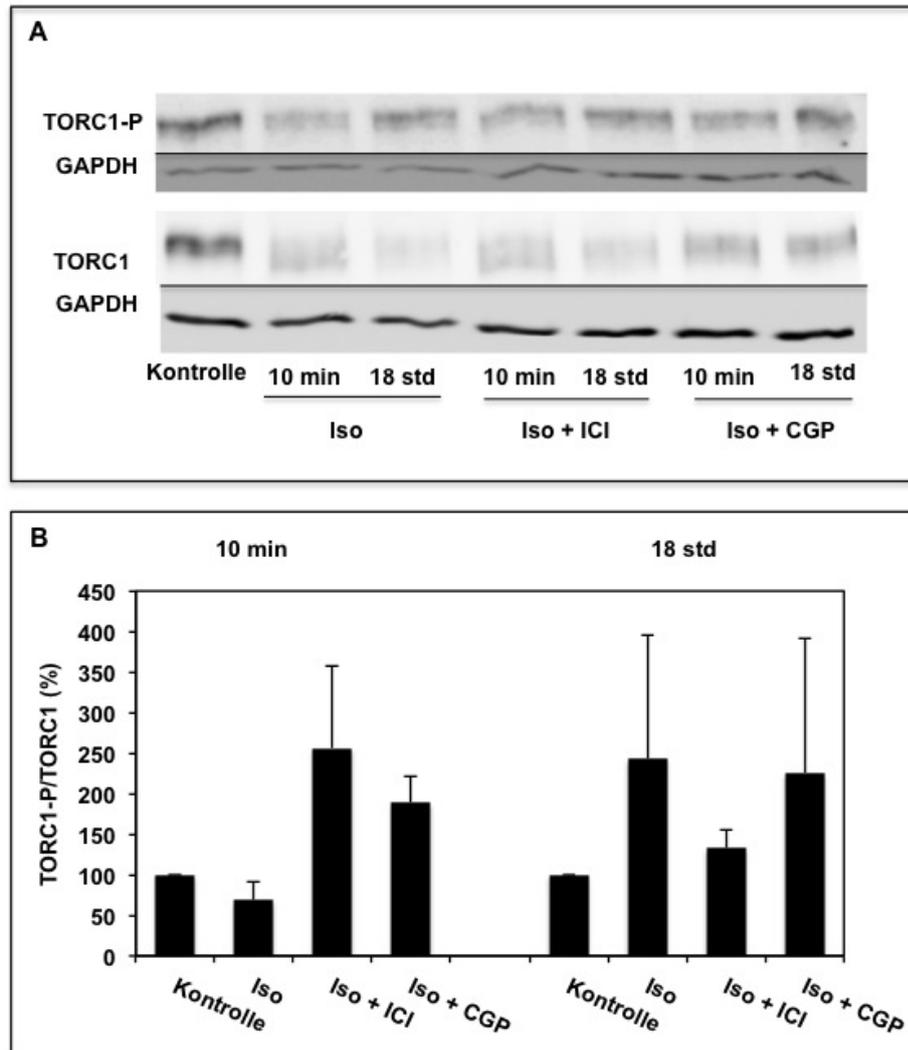
Abb. 6B zeigt, dass eine 10-minütige Isoprenalininkubation zu keiner Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses ( $58 \% \pm 15 \%$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0,054$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \%$ ,  $n = 6$ ) führt. Eine Signifikanz wurde hier jedoch knapp verfehlt. Blockierte man die  $\beta$ -Rezeptoren vor Isoprenalingabe mit Propranolol, ergab sich nach 10-minütiger Inkubation ( $107 \% \pm 16 \%$ ,  $n = 5$ ) keine signifikante Veränderung im Vergleich zu dem TORC1-P/TORC1-Verhältnis der Kontrolle und der alleinigen Isoprenalingabe. Zur weiteren Kontrolle wurden die Kardiomyozyten ausschließlich mit Propranolol inkubiert. Auch hier zeigte sich keine Veränderung ( $87 \% \pm 18 \%$ ,  $n = 3$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Eine 18-stündige Inkubation mit Isoprenalin bewirkte keine Veränderung der Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge ( $113 \% \pm 25 \%$ ,  $n = 5$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $100 \%$ ,  $n = 6$ ). Auch nach vorheriger Inkubation mit Propranolol fand sich kein signifikanter Unterschied ( $83 \% \pm 15 \%$ ,  $n = 5$ ) im Vergleich zur Kontrolle und der alleinigen Isoprenalingabe. Eine alleinige Gabe von Propranolol ( $96 \% \pm 11 \%$ ,  $n = 3$ ) ergab abermals keine Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle.

Die geringe Anzahl der Messwiederholungen ließ bei 10-minütiger und 18-stündiger Isoprenalininkubation keine signifikanten Unterschiede zu.

#### **3.1.4. Auswirkung spezifischer $\beta$ 1- und $\beta$ 2-Adrenozeptorantagonisten auf die TORC1-Proteingesamtmenge und den Phosphorylierungsstatus**

Isoprenalin spricht als Arzneistoff aus der Klasse der nicht-selektiven Betasympathomimetika sowohl  $\beta$ 1-als auch  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren an (Kimotsuki et al. 2010). Um zu untersuchen, welcher der beiden Rezeptoren die Aktivität von TORC beeinflusst bzw. ob TORC durch beide Rezeptoren beeinflusst wird, wurden spezifische Antagonisten eingesetzt (Abb. 7). Als  $\beta$ 1-Rezeptorantagonist wurde hierbei CGP-20712A in den Konzentrationen  $0,3 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,6 \mu\text{mol/l}$  und  $3 \mu\text{mol/l}$  verwendet. Zur Blockierung des  $\beta$ 2-Rezeptors kam ICI-118.551 in den Konzentrationen  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,2 \mu\text{mol/l}$  und  $1 \mu\text{mol/l}$  zum Einsatz.

Die Zellen wurden nach vorheriger Behandlung mit den Rezeptorantagonisten jeweils 10 Minuten und 18 Stunden mit Isoprenalin inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und ausschließlich mit Isoprenalin behandelte Kardiomyozyten. Untersucht wurde der Einfluss der spezifischen Inhibitoren auf das TORC1-P/TORC1-Verhältnis nach 10-minütiger Isoprenalininkubation sowie nach 18-stündiger Isoprenalininkubation.



**Abb. 7: Auswirkung der spezifischen  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenozeptorantagonisten CGP-20712A (CGP) und ICI-118.551 (ICI) auf die Menge an phosphoryliertem TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge nach 18 Stunden bzw. 10 Minuten.**

**A:** Beispielhafte Immunoblots der Gesamtmenge von TORC1 und der Menge an TORC1-P nach 10-minütiger bzw. 18-stündiger Isoprenalininkubation bzw. mit vorheriger Zugabe der spezifischen  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten CGP und ICI.

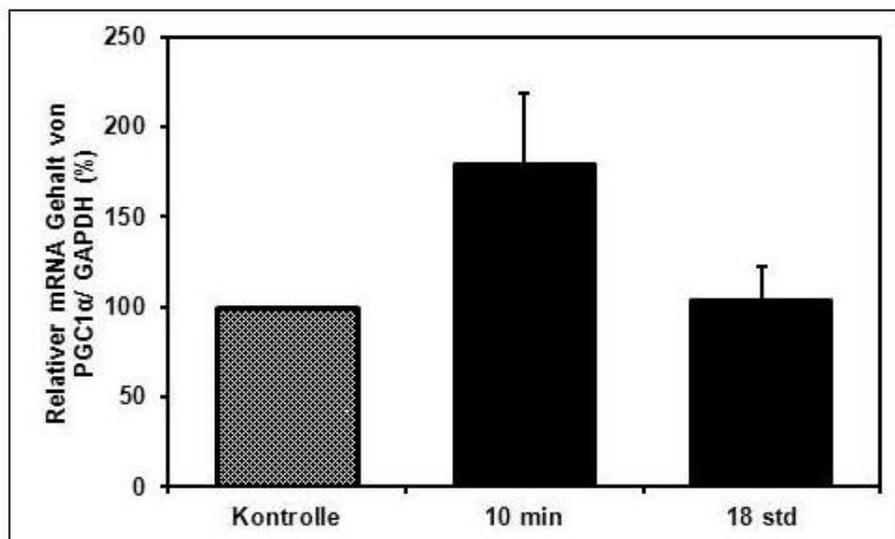
**B:** Quantitative Auswertung der Immunoblots nach 10-minütiger (links) und 18-stündiger (rechts) Isoprenalininkubation mit und ohne vorheriger Inkubation mit CGP/ICI. Die Ordinate zeigt die prozentualen Veränderungen des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses in den Kardiomyozyten, welche durch Inkubation mit 10  $\mu$ M Isoprenalin mit/ohne CGP/ICI (Abszisse) nach 10 Minuten bzw. 18 Stunden induziert wurden. Das TORC1-P/TORC1-Verhältnis der unbehandelten Kontrolle wurde jeweils als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen.

Nach 10-minütiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Isoprenalin (Abb. 7B links) zeigte sich keine signifikante Veränderung des phosphorylierten TORC1 im Verhältnis zur TORC1-Gesamtmenge (69 %  $\pm$  22 %, n = 3) im Vergleich zur Kontrolle (100 %, n = 3). Durch die Zugabe des  $\beta$ 2-Rezeptorantagonist ICI (256 %  $\pm$  102 %, n = 3) und des  $\beta$ 1-Rezeptorantagonist CGP (189 %  $\pm$  34 %, n = 3) ergaben sich abermals keine signifikanten Unterschiede zu dem TORC1-P/TORC1-Verhältnis der unbehandelten Kontrolle und dem Verhältnis nach alleiniger Isoprenalingabe.

Eine 18-stündige Inkubation mit Isoprenalin (Abb. 7B rechts) führte zu keiner Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses ( $243 \% \pm 152 \%$ ,  $n = 3$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $100 \%$ ,  $n = 3$ ). Nach vorheriger Inkubation mit dem  $\beta$ 2-Rezeptorantagonisten ICI ( $133 \% \pm 22 \%$ ,  $n = 3$ ) und dem  $\beta$ 1-Rezeptorantagonist CGP ( $226 \% \pm 166 \%$ ,  $n = 3$ ) konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zu dem TORC1-P/TORC1-Verhältnis der unbehandelten Kontrolle und nach alleiniger Isoprenalingabe festgestellt werden.

### 3.1.5. Wirkung von Isoprenalin auf die mRNA-Menge von PGC1 $\alpha$

Als mögliches Zielgen von TORC1 wurde die Wirkung von Isoprenalin auf die mRNA-Menge von PGC1 $\alpha$  untersucht (Abb. 8).



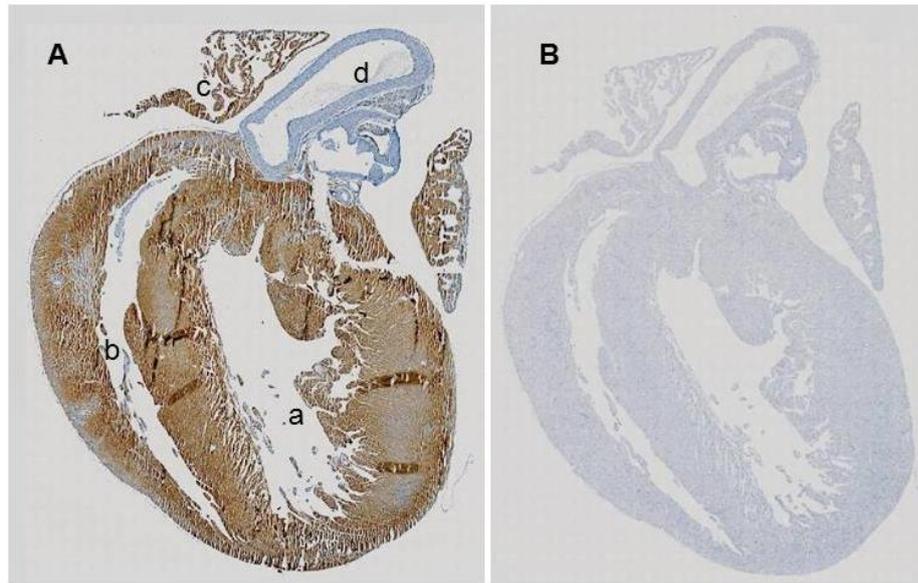
**Abb. 8: PGC1 $\alpha$ -mRNA Expression nach Isoprenalinbehandlung in neonatalen Rattenkardiomyozyten.**

Die Ordinate stellt die prozentuale Veränderung des relativen PGC1 $\alpha$  mRNA-Gehalts dar. Der mRNA-Gehalt der unbehandelten Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Die Abszisse beinhaltet die Inkubationszeit von 10 Minuten und 18 Stunden mit jeweils 10  $\mu$ M Isoprenalin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus jeweils 7 Versuchen (Einstichproben-t-Test).

Betrachtet man den mRNA-Spiegel von PGC1 $\alpha$  in Abhängigkeit von der Zeit, lassen sich nach 10-minütiger ( $179 \% \pm 39 \%$ ,  $n = 7$ ) und 18-stündiger ( $103 \% \pm 19 \%$ ,  $n = 7$ ) Isoprenalinstimulation keine signifikanten Unterschiede der PGC1 $\alpha$ -Menge im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ( $100 \%$ ,  $n = 7$ ) darstellen.

### 3.2. Immunzytochemische Analyse von TORC1 und TORC3

#### 3.2.1. Immunzytochemische Analyse von TORC1 im Herzgewebe der Ratte



**Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis.**

**A:** Von TORC1 an einem in Formalin fixierten, 24 Stunden alten Rattenherz (16fach vergrößert). Der braun gefärbte Bereich stellt den mit dem TORC1-Antikörper gefärbten Bereich dar (DAB-Färbung), **a:** Linker Ventrikel, **b:** Rechter Ventrikel, **c:** Atrium, **d:** Blutgefäß

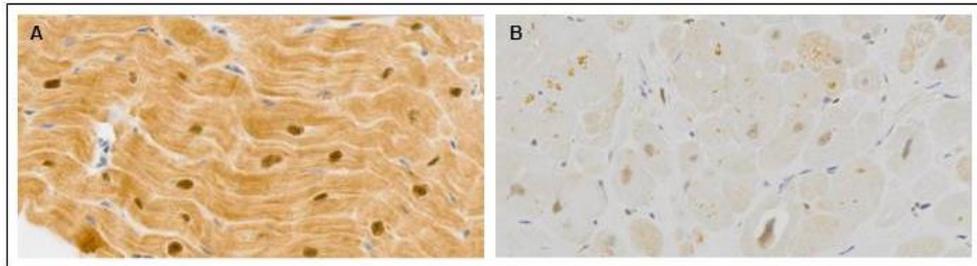
**B:** Substitutionskontrolle

Um sich ein generelles Bild über die Verbreitung und Lokalisation von TORC im Herzen machen zu können, wurde zunächst ein Längsschnitt durch ein neonatales Rattenherz durchgeführt und der Schnitt mit einem Antikörper gegen TORC1 gefärbt (Abb. 9). Hierbei zeigte sich, dass TORC1 in den Kardiomyozyten des Herzmuskels zu finden ist.

#### 3.2.2. Subzelluläre Lokalisation von TORC1 im pathologisch hypertrophierten humanen Myokard

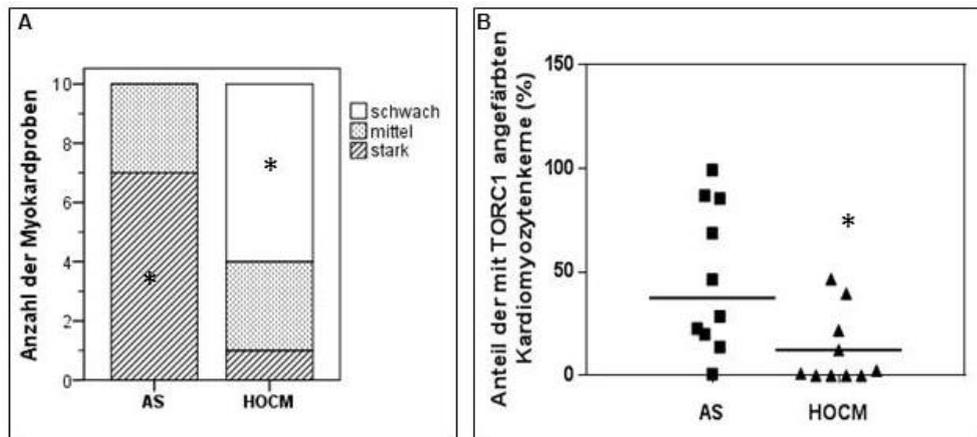
Mit der Frage nach der Gesamtexpression und der subzellulären Lokalisation von TORC1 und TORC3 im hypertrophierten Herzen sind zwei verschiedene Krankheitsbilder, die mit einer pathogenen Hypertrophie des Myokards einhergehen, untersucht und miteinander verglichen worden.

Vergleicht man die Herzgewebeproben der Aortenstenosen (AS) mit jenen der angeborenen hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathien (HOCM) bei TORC1 (Abb. 10), lassen sich sowohl beim Anteil der gefärbten Kerne (Abb. 11 B) als auch in der Färbeintensität des Zytoplasmas (Abb. 11 A) deutliche Unterschiede erkennen.



**Abb. 10: Darstellung der subzellulären Lokalisation von TORC1 im menschlichen hypertrophen Herzen (100fach vergrößert).**

Typisches Schnittbild des Herzens eines Patienten mit erworbener Aortenstenose (A) bzw. hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (B).



**Abb. 11: Intensität und subzelluläre Lokalisation von TORC1 bei kardialer Hypertrophie.**

**A:** Die Ordinate gibt die Anzahl der jeweils ausgewerteten Kardiomyozytenschnitte wieder. Die Abszisse stellt die jeweilige Gruppe mit der Diagnose erworbene Aortenstenose (AS) bzw. angeborene hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) dar. Die Balken enthalten den Anteil der Myokardproben mit der jeweiligen TORC1-Färbintensität im Zytoplasma. \* $p \leq 0,05$  (Chi<sup>2</sup>-Test): Signifikanter Unterschied zwischen AS und HOCM bzgl. der jeweiligen Färbintensität mit dem TORC1-Antikörper,  $n = 10$  für jede Gruppe.

**B:** Anteil der nukleären Lokalisation von TORC1 in Prozent im Verhältnis zur jeweiligen Gesamtkernzahl (Ordinate) bei Myokardproben von Patienten mit Aortenstenose und HOCM (Abszisse). Die horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind Einzelwerte und Mittelwert aus jeweils 10 unterschiedlichen Myokardproben. \* $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test): signifikant geringerer Anteil an TORC1-angefärbten Kardiomyozytenkernen.

Zunächst wurde der Anteil gefärbter Kerne betrachtet. Während sich bei Patienten mit Aortenstenose im Durchschnitt bei ca. der Hälfte (47 %  $\pm$  11 %,  $n = 10$ ) der gezählten Kerne eine Anfärbung mit dem TORC1-Antikörper zeigte, waren es hingegen bei Patienten mit einer HOCM-Erkrankung im Mittel nur 12 % (12 %  $\pm$  6 %,  $n = 10$ ). Die Anzahl gefärbter Zellkerne war bei Myokardproben von HOCM-Patienten signifikant niedriger ( $p = 0,011$ ) als der Anteil bei denjenigen mit Aortenstenose.

Auch bezüglich der Intensität der Zytoplasmafärbung konnten zwischen den Myokardproben der AS und HOCM Unterschiede festgestellt werden ( $p = 0,002$ ). 70 % der untersuchten Präparate mit AS wiesen eine starke TORC1-Zytoplasmafärbung ( $n = 10$ ) auf, während bei den HOCM-Präparaten nur 10 % ( $n = 10$ ) stark angefärbt waren. Die HOCM-Myokardproben zeigten hingegen in 60 % der Fälle ein schwach angefärbtes Zytoplasma,

wohingegen keine der Myokardproben von AS-Patienten schwach gefärbtes Zytoplasma zeigte. In beiden Fällen konnte jeweils ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,002$ ). Beide Myokardprobengruppen wiesen jeweils bei 30 % der Präparate mittelmäßig angefärbtes Zytoplasma vor.

### **3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von TORC3 im pathologisch hypertrophierten humanen Myokard**

Die Intensität der TORC3-Färbung fiel weitaus schwächer aus als die TORC1-Färbung (Abb. 12). Das Zytoplasma zeigte nur eine sehr schwache Anfärbung und war deshalb nicht auszuwerten. Eine – wenn auch schwächere – Kernfärbung durch TORC3 war jedoch deutlich zu erkennen und konnte ausgewertet werden (Abb. 13).



## 4. Diskussion

---

### 4.1. Validität des Modells

Neonatale Rattenkardiomyozyten konnten bereits erfolgreich in vielen Studien als Zellkulturmodell verwendet werden, um Faktoren zu untersuchen, die mit Herzerkrankungen einhergehen (Sucharov et al. 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell eingesetzt, um die Regulation von TORC1 nach Gabe des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin zu untersuchen. Die Expression und die Regulation von TORC1 in Kardiomyozyten wurde mit Hilfe des Immunoblots, der Immunhistochemie und der Real-Time PCR analysiert und ausgewertet.

### 4.2. Einfluß $\beta$ -adrenerger Signale auf TORC1

TORC1 stellt eine der drei Isoformen der cAMP-regulierten transkriptionellen Kofaktoren dar und wird, wie eingangs erwähnt (siehe Seite 8), hauptsächlich im ZNS exprimiert, wo es u.a. eine wesentliche Rolle bei der Gedächtnisleistung spielt (Altarejos und Montminy 2011, Spencer und Weiser 2010, Xue et al. 2015). Eine Funktionsstörung von TORC1 ist folglich bei neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung (Xue et al. 2015). Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass TORC1 in den Hippocampi von Alzheimer-Patienten herunterreguliert wird und dass Störungen in der TORC1-abhängigen Gentranskription zur kognitiven Leistungsminderung in der Alzheimer-Erkrankung beitragen (Mendioroz et al. 2016, Parra-Damas et al. 2014). TORC1 wird zudem eine wichtige Rolle im Energiehaushalt zugeschrieben, da Polymorphismen im TORC1-Gen zu Fettleibigkeit führen können (Choong et al. 2013). Des Weiteren konnte anhand von Tiermodellen gezeigt werden, dass TORC1 vor der Entwicklung einer Lebersteatose schützt, indem es über eine Aktivierung des cAMP-abhängigen Signalwegs die Expression von Genen unterdrückt, welche die Lipidakkumulation in der Leber fördern (Kim 2016). TORC1-Knockout-Mäuse entwickelten spontan eine hepatische Steatose und eine systemische Insulinresistenz (Kim 2016).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Funktion, die Aktivierung sowie die zelluläre Lokalisation von TORC im Herzmuskel untersucht und seine Beteiligung an maladaptiven Prozessen im Sinne einer Hypertrophie beleuchtet werden.

Ausgehend von Publikationen, in denen gezeigt wurde, dass TORC durch cAMP-Signale aktiviert wird (Altarejos und Montminy 2011), wurde untersucht, ob TORC1 in Kardiomyo-

zyten durch Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ebenfalls aktiviert werden kann. Durch die Behandlung der Kardiomyozyten mit dem  $\beta$ -Adrenozeptoragonist Isoprenalin wurde die Veränderung des Aktivitätszustands von TORC1 durch einen cAMP-abhängigen Signalweg untersucht. Hierbei zeigte sich in einer ersten Versuchsreihe, dass eine kurze 10-minütige Isoprenalininkubation zu einer signifikanten Abnahme des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses führte und somit eine Dephosphorylierung bzw. Aktivierung von TORC1 induzieren könnte. Doch ließ sich diese Beobachtung in den Folgeuntersuchungen (Abb. 5-7) nicht reproduzieren. Eine länger andauernde Isoprenalininkubation von 18 Stunden führte zu keiner signifikanten Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses. Innerhalb dieser Zeitspanne zeigten sich erhebliche Schwankungen der Proteinexpression des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses. Signifikante Veränderungen des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich nicht.

Eine lineare Konzentrationsabhängigkeit konnte weder bei einer 10-minütigen, noch bei einer 18-stündigen Isoprenalininkubation mit ansteigenden Konzentrationen nachgewiesen werden. Für die 18-stündige Inkubation mit 0,1 und 10  $\mu$ M Isoprenalin ergab sich jeweils keine Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle. Innerhalb der Konzentrationsreihe zeigten sich jedoch erhebliche Schwankungen. Eine 18-stündige Inkubation mit 1  $\mu$ M Isoprenalin führte zu einer signifikanten Abnahme des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle.

In weiteren Experimenten wurde der  $\beta$ -Adrenozeptorantagonist Propranolol hinsichtlich einer Aktivierung von TORC in Kombination mit der Isoprenalinbehandlung in den neonatalen Kardiomyozyten untersucht. Wie gezeigt werden konnte, fand sich bei Einsatz von Propranolol vor der 10-minütigen und 18-stündigen Isoprenalininkubation keine Veränderung des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle, wobei hier abermals Schwankungen innerhalb Messwiederholungen zu verzeichnen waren.

Ob TORC1 im Herzen selektiv durch den  $\beta$ 1-oder  $\beta$ 2-adrenergen Signalweg aktiviert wird, konnte mit Hilfe spezifischer Rezeptorantagonisten, nicht eindeutig geklärt werden. Nach Einsatz beider Rezeptorantagonisten konnte nach 10-minütiger und 18-stündiger Isoprenalininkubation kein signifikanter Unterschied des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Unter Zugabe von beiden Rezeptorantagonisten fand somit keine Dephosphorylierung von TORC1 statt.

Bei den oben genannten Experimenten stellte jeweils die Anzahl der Messwiederholungen einen limitierenden Faktor dar. Eine Anhebung der Messwiederholungen hätte hier vermutlich dazu beigetragen, extreme Schwankungen in den Ergebnissen auszugleichen und aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Um Schwankungen der intrazellulären TORC1-Expression zu erklären, wäre zudem das Ablösen des entsprechenden TORC1-

Primärantikörpers mit einem *Stripping Buffer* und darauffolgender Inkubation mit dem TORC1-P-Antikörper ein denkbarer Ansatz gewesen.

### **4.3. PGC1 $\alpha$ als Zielgen von TORC1 am Herz?**

Wu et al. (2006) konnten in ihrer Studie über vorgeschaltete Regulatoren der PGC1 $\alpha$ -Transkription TORC als stärksten Aktivator der PGC1 $\alpha$ -Gentranskription identifizieren. Laut Altarejos und Montminy (2011) sollen CREB und TORC die mitochondriale oxidative Kapazität in Muskelzellen erhöhen, indem sie die Expression von PGC1 $\alpha$  erhöhen. Studien zufolge wird die PGC1 $\alpha$ -Expression samt seiner nachgeschalteten Signalkaskade bei physiologischer Hypertrophie erhöht (Ventura-Clapier et al. 2008). An Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass PGC1 $\alpha$  bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz hingegen unterdrückt wird (Rowe et al. 2010). Bei Menschen ist die Regulation der PGC1 $\alpha$ -Expression bei Herzinsuffizienz jedoch noch umstritten (Rowe et al. 2010). Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge führt eine 10-minütige und 18-stündige Isoprenalininkubation zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Expression des TORC1-Zielgens.

### **4.4. Immunhistochemischer Status von TORC1 und TORC3 bei kardialen Hypertrophien unterschiedlicher Genese**

Die Bedeutung von TORC konnte bislang in vielen anderen Geweben, jedoch noch nicht am Herzen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass eine chronische katecholaminerge Stimulation in neonatalen Rattenherzkulturen zur Herzhypertrophie führt (Simpson et al. 1982) sowie die Erkenntnis, dass es im Verlauf einer Katecholamin-induzierten Hypertrophieentstehung zu Veränderungen der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade kommt (Osadchii 2007), warf die Frage auf, wie sich der TORC-Status im hypertrophen Myokard verhält. Aus diesem Grund sollte die subzelluläre Verteilung von TORC1 und TORC3 mittels Immunhistochemie im menschlichen hypertrophierten Herzen unterschiedlicher Genese untersucht werden.

Die hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) stellt eine genetisch angeborene Erkrankung dar und wird durch eine Mutation in mehreren Genen, die für Proteine im kardialen Sarkomer kodieren, hervorgerufen (Morita et al. 2010, Whitten 2008).

Aortenstenosen können hingegen angeboren oder erworben sein und stellen einen Herzklappenfehler dar, bei dem der Ausflusstrakt des linken Ventrikels verengt ist (Baird und Bigelow 1959, Edwards und Jones 1962). Die erworbene Variante geht meist mit degenerativen Veränderungen (meist durch Kalzifikationen) einher und ist heute mit einer Inzi-

denz von 2 % bis 7 % der über 65-Jährigen die meist verbreitete Herzklappenerkrankung (Spaccarotella et al. 2011).

Immunzytochemische Untersuchungen von TORC wurden an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Herzwertenzellen durchgeführt. Dies erfolgte für TORC1 und TORC3 an intraoperativ entnommenen humanen Proben. Die Färbung der Schnitte des Herzwertes mit Antikörpern gegen TORC1 und TORC3 gibt Aufschluss über das relative Expressionsverhältnis von TORC und seine subzelluläre Lokalisation im pathologisch hypertrophierten Herzwert.

Im inaktiven phosphorylierten Zustand befindet sich TORC im Zytoplasma (Spencer und Weiser 2010). Ausgehend davon, dass TORC durch Dephosphorylierung aktiviert wird und dadurch in den Zellkern einwandern kann, um an die Dimerisierungs- und DNA-bindenden Bereiche von CREB binden zu können (und somit dessen Aktivität zu stimulieren), war insbesondere die nukleäre Lokalisation von TORC1 in den Kardiomyozyten von Interesse, da dies einen Hinweis auf den Aktivitätszustand gibt (Altarejos und Montminy 2011).

Da die Biopsate von Patienten mit Aortenstenosen vergleichsweise mehr gefärbte Kerne aufwiesen als die der genetisch bedingten hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, könnte dies darauf hindeuten, dass TORC1 hier aktiver ist. TORC3 zeigte im Gegensatz zu TORC1 generell eine wesentlich schwächere Signalintensität. Jedoch war TORC3 im Vergleich zum Zytoplasma stets im Zellkern, also in seiner aktiven Form, nachweisbar. Die überwiegende Verteilung von TORC3 in den Zellkernen des Myokards könnte ein Hinweis auf eine andere Bedeutung oder Funktion als TORC1 sein, welches hingegen eine ähnliche Intensität im Kern und Zytoplasma zeigte. Trotzdem war TORC3, genauso wie TORC1 bei Aortenstenosen, häufiger im Zellkern zu finden als bei der hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie. Die Etablierung eines Immunoblots oder einer Färbung für TORC2 im Myokard ist fehlgeschlagen.

Es ist noch unklar, warum TORC1 und TORC3 bei kardialer Hypertrophie bei angeborenen und erworbenen Kardiomyopathien unterschiedlich stark exprimiert werden. Dies betrifft die Gesamtexpression und die zelluläre Lokalisation von TORC im Gewebe. Die Daten lassen jedoch vermuten, dass TORC1 und TORC3 bei kardialer Hypertrophie unterschiedlicher Genese involviert sind und dass zudem TORC eine Rolle bei der Pathogenese der kardialen Hypertrophie spielen könnte.

Um die Rolle von TORC bei kardialer Hypertrophie hervorzuheben, wäre der Vergleich von pathologisch hypertrophierten und gesunden Myokardproben von besonderem Interesse gewesen. Hier könnten Unterschiede in der Gesamtexpression und der zellulären Lokalisation weitere Hinweise über Aktivität von TORC am menschlichen Herzen liefern.

Des Weiteren wäre die Untersuchung der TORC-Expression bei weiteren Kardiomyopathien, wie beispielsweise der familiären dilatativen Kardiomyopathie, ein möglicher Ansatz, um das Verhalten von TORC bei genetisch bedingten Herzmuskelerkrankungen besser verstehen und vergleichen zu können. Im nächsten Schritt wäre zudem ein Vergleich zur erworbenen ischämisch bedingten Kardiomyopathie, wie beispielsweise bei einer schweren koronaren Herzerkrankung, denkbar, um die Rolle von TORC bei einer Herzinsuffizienz weiter spezifizieren zu können.

## 5. Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Immunhistochemie demonstriert werden, dass der CREB-Koaktivator TORC1 sowohl in Rattenherzen als auch im menschlichen Myokard exprimiert wird.

Die Untersuchungen von TORC1 und TORC3 an hypertrophierten menschlichen OP-Proben zeigten zudem, dass die TORC1-Expression im Zellkern und im Zytosol bei erworbener kardialer Hypertrophie verhältnismäßig stärker ausgeprägt ist als bei angeborener Hypertrophie, was auf eine Bedeutung von TORC bei der Pathogenese der pathologischen kardialen Hypertrophie hinweist.

Pathologische Herzmuskelhypertrophien sollen in Verbindung mit einer verstärkten  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptorstimulation stehen (Osadchii 2007). Der Phosphorylierungs- und somit Aktivitätszustand von TORC1 wurde mit Hilfe von phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen. Unter Einsatz des Noradrenalin-Derivats Isoprenalin ergaben sich keine reproduzierbaren zeit- und konzentrationsabhängigen Veränderungen des Phosphorylierungszustandes des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach Zugabe des  $\beta$ -Rezeptorantagonisten Propranolol (vor Isoprenalingabe) fanden sich keine Veränderungen des TORC1-P/TORC1-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle und zur alleinigen Isoprenalingabe, sodass insgesamt nicht nachgewiesen werden konnte, dass TORC1 in der Signalkaskade des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors involviert ist.

Als mögliches Zielgen von TORC1 wurde in diesem Modell die Expression der mRNA von PGC1 $\alpha$  untersucht. Die Ergebnisse der PGC1 $\alpha$  mRNA-Expression standen jedoch nicht in Korrelation mit den TORC1-Proteindaten.

Die weitere Aufklärung der Bedeutung von TORC1 in Kardiomyozyten kann möglicherweise dazu beitragen, die Entstehung einer kardialen Hypertrophie, und letztlich einer Herzinsuffizienz, besser verstehen und behandeln zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Altarejos JY, Montminy M (2011):

*CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals.*

Nat Rev Mol Cell Biol 12(3), 141-151

Amin P, Singh M, Singh K (2011):

*$\beta$ -adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis: role of  $\beta$ 1 integrins.*

J Signal Transduct 2011, 179057

Auer J (2007):

*Vom Hochdruck zur Herzinsuffizienz – Die Rolle der AT1-Rezeptorblocker.*

J Hyperton 11 (Sonderheft 1), 9-12

Baird RJ, Bigelow WG (1959):

*Surgical treatment of aortic stenosis.*

Can Med Assoc J 81, 795-800

Barry SP, Townsend PA (2010):

*What causes a broken heart – molecular insights into heart failure.*

Int Rev Cell Mol Biol 284, 113-179

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010):

*Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies.*

Pharmacol Ther 128(1), 191-227

Böhm M, Ettlbrück S, Flesch M, van Gilst WH, Knorr A, Maack C, Pinto YM, Paul M, Teisman AC, Zolk O (1998):

*Beta-adrenergic signal transduction following carvedilol treatment in hypertensive cardiac hypertrophy.*

Cardiovasc Res 40(1), 146-155

Bollano E, Täng MS, Hjalmarson A, Waagstein F, Andersson B (2003):

*Different responses to dobutamine in the presence of carvedilol or metoprolol in patients with chronic heart failure.*

Heart 89(6), 621-624

Brouwer WP, van Dijk SJ, Stienen GJ, van Rossum AC, van der Velden J, Germans T (2011):

*The development of familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutation to bedside.*

Eur J Clin Invest 41(5), 568-578

Bruno NE, Kelly KA, Hawkins R, Bramah-Lawani M, Amelio AL, Nwachukwu JC, Nettles KW, Conkright MD (2014):

*Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle.*

EMBO J 33(9), 1027-1043

Choong E, Quteineh L, Cardinaux JR, Gholam-Rezaee M, Vandenberghe F, Dobrinas M, Bondolfi G, Etter M, Holzer L, Magistretti P, von Gunten A, Preisig M, Vollenweider P, Beckmann JS, Pralong FP, Waeber G, Kutalik Z, Conus P, Bochud M, Eap CB; ODEX team (2013):

*Influence of CRTCL1 polymorphisms on body mass index and fat mass in psychiatric patients and the general adult population.*

JAMA Psychiatrie 70(10), 1011-1019

Conkright MD, Canettieri G, Screamon R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB und Montminy M (2003):

*TORCs: transducers of regulated CREB activity.*

Mol Cell 12(2), 413-423

Daamen MA, Hamers JP, Gorgels AP, Brunner-La Rocca HP, Tan FE, van Dieijen-Visser Mp, Schols JM (2015):

*Heart failure in nursing home residents; a cross-sectional study to determine the prevalence and clinical characteristics.*

BMC Geriatr 15, 167

Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J III und Montminy M (2007):

*Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2.*

Nature 449(7160), 366-369

Edwards FR, Jones RS (1962):

*Congenital aortic stenosis.*

Thorax 17(3), 218-229

El-Armouche A, Eschenhagen T (2009):

*Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart.*

Heart Fail Rev 14(4), 225-241

Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ (1996):

*Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure.*

J Am Coll Cardiol 27(1), 146–154

Gerdes AM (1992):

*Remodelling of ventricular myocytes during cardiac hypertrophy and heart failure.*

J Fla Med Assoc 79(4), 253-255

Grimm M, Brown JH (2010):

*Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII.*

J Mol Cell Cardiol 48(2), 322-330

Heather LC, Howell NJ, Emmanuel Y, Cole MA, Frenneaux MP, Pagano D, Clarke K (2011):

*Changes in cardiac substrate transporters and metabolic proteins mirror the metabolic shift in patients with aortic stenosis.*

PLoS One 6(10), 26326

Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE, Vatner SF (2010):

*Modulation of beta-adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5.*

Heart Fail Rev 15(5), 495-512

Kim H (2016):

*The transcription cofactor CRTC1 protects from aberrant hepatic lipid accumulation.*

Sci Rep 6, 37280

Kimotsuki T, Niwa N, Hicks MN, Dunne M, Cobbe SM, Watanabe MA (2010):

*Isoprenaline increases the slopes of restitution trajectory in the conscious rabbit with ischemic heart failure.*

J Biol Phys 36(3), 299-315

Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE (1993):

*Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure.*

J Clin Invest 91(3), 907–914

Laemmli UK (1970):

*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*

Nature 227(5259), 680-685

Li J, Umar S, Amjadi M, Iorga A, Sharma S, Nadadur RD, Regitz-Zagrosek V, Eghbali M (2012):

*New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy.*

Am J Cardiovasc Dis 2(3), 192-207

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003):

*What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?*

Circ Res 93(10), 896-906

McMurray JJ, Stewart S (2000):

*Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure.*

Heart 83(5), 596-602

Mendioroz M, Celarain N, Altuna M, Sánchez-Ruiz de Gordo J, Zelaya MV, Roldán M, Rubio I, Larumbe R, Erro ME, Méndez I, Echávarri C (2016):

*CRTC1 gene is differentially methylated in the human hippocampus in Alzheimer's disease.*

Alzheimers Res Ther 8(1), 15

Morita H, Nagai R, Seidman JG, Seidman CE (2010):

*The impact of genetic testing on hypertrophic cardiomyopathy and heart failure (As of 12072009 by HIRO).*

J Cardiovasc Transl Res 3(4), 297-303

Osadchii OE (2007):

*Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects.*

Heart Fail Rev 12(1), 66-86

Parra-Damas A, Valero J, Chen M, España J, Martín E, Ferrer I, Rodríguez-Alvarez J, Saura CA (2014):

*Crtc1 activates a transcriptional program deregulated at early Alzheimer's disease-related stages.*

J Neurosci 34(17), 5776-5787

Prinz C, Farr M, Hering D, Horstkotte D, Faber L (2011):

*The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy.*

Dtsch Arztebl Int 108(13), 209-215

Rowe GC, Jiang A, Arany Z (2010):

*PGC-1 coactivators in cardiac development and disease.*

Circ Res 107(7), 825-838

Simpson P, McGrath A, Savion S (1982):

*Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines.*

Circ Res 51(6), 787-801

Song Y, Altarejos J, Goodarzi MO, Inoue H, Guo X, Berdeaux R, Kim JH, Goode J, Igata M, Paz JC, Hogan MF, Singh PK, Goebel N, Vera L, Miller N, Cui J, Jones MR; CHARGE Consortium; GIANT Consortium, Chen YD, Taylor KD, Hsueh WA, Rotter JI, Montminy M (2010):

*CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance.*

Nature 468(7326), 933-939

Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ (1996):

*Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development.*

AM J Physiol 271, 2183-21839

Spaccarotella C, Mongiardo A, Indolfi C (2011):

*Pathophysiology of aortic stenosis and approach to treatment with percutaneous valve implantation.*

Circ J 75(1), 11-19

Spencer RL, Weiser MJ (2010):

*TORC: a new twist on corticotropin-releasing hormone gene expression.*

Endocrinology 151(3), 855-858

Steffel J, Lüscher TF (2011):

*Herz-Kreislauf.*

1. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2011

Steinberg SF (1999):

*The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes.*

Circ Res 85, 1101-1111

Streit MR, Weiss CS, Meyer S, Ochs MM, Hagenmueller M, Riffel JH, Buss SJ, Heger T, Katus HA, Hardt SE (2016):

*Cardiac effects of attenuating Gsa-dependent signaling.*

PLoS One 11(1), 0146988

Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L, Bristow MR (2006):

*A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(3), 1299-1308

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J (2009):

*The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications.*

J Am Coll Cardiol 54(19), 1747-1762

Van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ (2009):

*Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental?*

Cardiovasc Res 81(3), 420-428

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008):

*Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha.*

Cardiovascular Research 79(2), 208-217

Watkins H, Ashrafian H, Redwood C (2011):

*Inherited cardiomyopathies.*

N Engl J Med 364(17), 1643-1656

Weeks KL, McMullen JR (2011):

*The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?*

Physiology 26(2), 97-105

Whitten SE (2008):

*Systolic heart failure in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a potentially life-threatening complication.*

Crit Care Nurse 28(5), 44-52

Wu Z, Huang X, Feng Y, Handschin C, Feng Y, Gullicksen PS, Bare O, Labow M, Spiegelman B, Stevenson SC (2006):

*Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1alpha transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells.*

Proc Natl Acad Sci 103(39), 14379-14384

Xue ZC, Wang C, Wang QW, Zhang JF (2015):

*CREB-regulated transcription coactivator 1: important roles in neurodegenerative disorders.*

Sheng Li Xue Bao 67(2), 155-162

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

A	Ampere
AC	Adenylatcyclase
$\alpha$ -MyHC	<i>alpha-myosin heavy chain</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AR	adrenerge Rezeptor(en)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
$\beta$ -MHC	<i><math>\beta</math>-myosin heavy chain</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CREB	<i>CAMP-responsive element-binding protein</i>
CRTC	<i>CREB-regulated transcription factor</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dd H <sub>2</sub> O	<i>double distilled water</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRK	G-Protein-gekoppelte Kinasen
GDP	Guanosindihosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HOCM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARK	<i>microtubule-associated protein affinity-regulating kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGC1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha</i>
PKA	Proteinkinase A
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SIK	<i>salt-inducable kinase</i>
SR	<i>sarkoplasmatisches Retikulum</i>
Tab	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$ 1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math> 1</i>
TORC	<i>transducer of regulated CREB</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TBST	<i>Tris-buffered saline + Tween</i>

## **Danksagung**

---

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Thomas Paul, und meinem Betreuer, Dr. med. Michael Steinmetz, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Elke Oetjen sowie Dr. rer. nat. Thomas Quentin für die hilfreiche Unterstützung und Mitbetreuung bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Frau Karin Bär und Frau Andrea Poppe, die mir im Forschungslabor mit Rat und Tat zur Seite standen.

Diese Arbeit widme ich Daniel, der mich während der Erarbeitung meiner Dissertation stets begleitet und unterstützt hat.

## Lebenslauf

---

Als Jüngste von vier Kindern von Gitta und Heinz Wichmann wurde ich am 09.08.1986 in Schwabach geboren.

Meine Kindheit und Jugend verbrachte ich mit meiner Familie in Schwabach.

Hier besuchte ich von 1993 bis 1998 die Johannes-Helm-Schule, bis ich im September 1998 auf das Adam-Kraft-Gymnasium Schwabach wechselte, wo ich im Juni 2007 mein Abitur absolvierte.

Vorbereitend auf das Medizinstudium besuchte ich von November 2007 bis März 2008 das Institut für Biologie und Medizin in Köln.

Anschließend nahm ich im April 2008 das Studium der Humanmedizin in Göttingen auf und führte nach bestandenem Physikum das Studium im April 2011 an der Universität zu Kiel fort.

Im Januar 2014 schloss ich hier den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Es folgte schließlich im Juli 2015 die Approbation nach bestandenem 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im September 2015 begann ich mit der Facharztausbildung für Allgemeinmedizin in der internistischen Abteilung des Klinikums Lüneburg. Im April 2017 führte ich meine Facharztausbildung in der Notaufnahme der Schön Klinik Hamburg Eilbek als Assistenzärztin im Bereich Unfallchirurgie/Orthopädie fort.