

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Analyse dehnungsabhängiger Veränderungen der
Signaltransduktion im humanen Myokardgewebe und ihre
möglichen Auswirkungen auf die Entstehung und
Aufrechterhaltung einer Herzhypertrophie**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Mandy Weißenburg
aus Halle/Saale

Würzburg, März 2006

Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

15.02.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Die Mitogen- aktivierten Proteinkinasen (MAP- Kinasen) und Herzhypertrophie	2
1.3 PKC und Herzhypertrophie	4
1.4 p70S6- Kinase und Herzhypertrophie	4
1.5 Modell der isolierten Herzmuskelfaser	5
1.6 Fragestellung der Arbeit	5
2. Material und Methoden	7
2.1 Untersuchungen an intakten Herzmuskelpräparaten des Menschen	7
2.1.1 Patienten	7
2.1.2 Gewinnung intakter humaner Herzmuskelpräparate	8
2.1.2.1 Operative Gewebsentnahme	8
2.1.2.2 Transport intakter Herzmuskelpräparate	8
2.1.3 Präparation intakter Herzmuskelstreifen	8
2.1.4 Schematischer Versuchsaufbau zur Realisierung einer Kontraktion und Dehnung intakter Herzmuskelstreifen	9
2.1.4.1 Elektrische Stimulation der Muskelstreifen	11
2.1.5 Versuchsdurchführung	11
2.1.6 Konservierung der untersuchten Herzmuskelstreifen	12
2.2 Weitere Untersuchungen der Herzmuskelstreifen mittels protein- analytischer Methoden	13
2.2.1 Probenvorbereitung aus konservierten Herzmuskelstreifen	13
2.2.2 Probenvorbereitung mit RIPA- Aufschlusspuffer	14
2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem	

Bradford- Assay	14
2.2.3 Western Blot Analysen	15
2.2.3.1 Auftrennung der Proteine	15
2.2.3.2 Übertragung von Proteinen auf eine PVDF- Membran	16
2.2.3.3 Immunologische Detektion von Proteinen und Visualisierung	17
2.2.3.4 Densitometrische Bestimmung von Protein- Intensitäten	18
2.3 Versuchsreihen	18
2.3.1 Verwendung von TPA	20
2.4 Statistische Auswertung	21
2.5 Materialien	21
2.5.1 Chemikalien und Reagenzien	21
2.5.2 Antikörper	23
2.5.3 Geräte und Materialien für Western Blot Analysen	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen	24
3.1.1 Versuchsreihe 1	24
3.1.2 Versuchsreihe 2	26
3.1.3 Versuchsreihe 3	30
3.1.4 Versuchsreihe 4	35
3.1.5 Versuchsreihe 5	38
3.2 Zusammenfassung der wichtigsten Diagramme auf einem Blick	40
4. Diskussion	42
4.1 Diskussion der Methoden	42

4.1.1	Humanes kardiales Gewebe versus Kardiomyozyten-Zellkulturen	42
4.1.2	Das Modell der isolierten intakten Muskelfaser	42
4.1.3	Präparation und Protektion der Myokardpräparate	43
4.1.4	Verlängerung der Ischämietoleranz mittels 2,3 Butanedione-Monoxime (BDM)	43
4.1.5	Längenbestimmung der intakten Muskelfaserpräparate	44
4.1.6	Neuerungen in der Versuchsreihe 5	44
4.2	Diskussion der Ergebnisse	45
4.2.1	Erläuterungen zu Unterschieden im Vergleich der einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe untereinander	46
4.2.2	Proteinkinase C (PKC)	47
4.2.3	c- Raf- 1	49
4.2.4	Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2 (ERKs 1/2)	50
4.2.5	p38 MAP- Kinase	53
4.2.6	c- Jun NH ₂ - terminale Kinase 2 (JNK2)	58
4.2.7	p70S6- Kinase	59
4.3	Schlussfolgerung	61
5.	Zusammenfassung	62
6.	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACVB	Aortocoronarer Venenbypass
Ak	Antikörper
AKE	Aortenklappenersatz
ASK-1	Apoptotische Signal-regulierte Kinase 1
ATF2	Transkriptionsfaktor
BDM	Butanedione-Monoxime
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bzw	beziehungsweise
ca	circa
CHOP	Transkriptionsfaktor (C/EBP homologous protein)
cJun	Protooncogen
cMyc	Protooncogen (myelocytomatosis viral oncogene homolog)
CO ₂	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
D	Dalton (relative Molmasse)
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
Elk 1	Transkriptionsfaktor
Ets 1	Transkriptionsfaktor
GATA 4	globin transcription factor 4
h	Stunde
HRP	Meerrettich–Peroxidase (engl. horse-radish peroxidase)
Hsp	Hitzeschockprotein (heat shock protein)
Hz	Hertz
kD	Kilo Dalton
KHS	Krebs–Henseleit–Lösung
ko	Kontrollgruppe
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

m	Milli-, 10^{-3}
M	molar (Mole pro Liter)
mA	Milliamper
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK2	MAP – Kinase aktivierende Proteinkinase 2
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C (Transkriptionsfaktor)
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MEKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
min	Minuten
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
mol	Mol
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
nm	Nanomol
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol (Nonidet P-40)
ol	optimal stretch
O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidendifluorid (Material für Blotting – Membranen)
RIPA	Radioimmunpräzipitations Assay
SDS	Natrium–dodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate)
sl	slag length
TAK1	transforming factor b activated kinase 1
TBS	Tris–gepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl. Tris buffered saline)
TBS-T	Tris–gepufferte physiologische Kochsalzlösung + Tween-20
TPA/PMA	Phorbol–12–Myristate–13-Acetate (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)
Tris	Tris–hydroxymethyl-aminomethan

u.a.	und andere
uel	Überdehnung (over stretch)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Hypertrophie des Herzens ist noch immer eine der bedeutendsten und schwierigsten klinischen Komplikationen vieler kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Herzhypertrophie stellt eine Anpassungsreaktion an erhöhte kardiale Belastungen dar (Cooper 1987 [1]; Mondry et al. 1995 [2]). Die Kardiomyozyten reagieren auf einen Vorlast- oder Nachlastanstieg, der eine Erhöhung der Wandspannung nach sich zieht, nicht nur mit einer Zunahme der Zellgröße (Hypertrophie), sondern auch mit qualitativen und quantitativen Veränderungen von Proteinen, die eine wichtige Rolle im Ablauf der Signaltransduktion innerhalb der Herzmuskelzellen bilden. Schon seit längerer Zeit weiß man, dass die Herzhypertrophie mit einer höheren Inzidenz an kardialen Dekompensationen, dilatativer Kardiomyopathie, kardialen Arrhythmien, plötzlichem Herztod und Herzinsuffizienz assoziiert ist (Levy et al. 1990 [3]; Vakili et al. 2001 [4]). Patienten, die an arterieller Hypertonie und Herzhypertrophie leiden, erliegen häufiger dem Herztod, als Patienten ohne zusätzliche Hypertrophie des Herzens (Levy et al. 1990 [3]). Der Herzmuskel wird durch die hypertrophen Zellen nicht nur in der Kontraktilität eingeschränkt, sondern auch in seiner Fähigkeit zur Relaxation, was sich sowohl in systolischen als auch in diastolischen Funktionsstörungen zeigt und dazu führt, dass das Herz nicht mehr in der Lage ist, adäquat auf hämodynamische Veränderungen des Kreislaufs zu reagieren. Durch das Versagen reaktiver Kompensationsmöglichkeiten kommt es durch eine relative Koronarinsuffizienz vermehrt zu ischämischen Ereignissen und einer daraus resultierenden erhöhten Mortalität. Das Interesse der Mediziner und Pharmazeuten bezüglich des Aufspürens von viel versprechenden Therapieansätzen ist immens groß, da die Zahl betroffener Patienten von Tag zu Tag wächst. Um die Präventionsmöglichkeiten der Herzhypertrophie zu verbessern, ist es essentiell, ihren molekularen und biochemischen Entstehungsmechanismus und dessen Aufrechterhaltung zu verstehen. Die Dehnung von Herzmuskelzellen stellt neben vielen anderen Stimuli einen wichtigen auslösenden Faktor für die Herzhypertrophie dar (Ruwhof et al. 2000 [5]; Yamazaki et al. 2000 [6]; Frey et al. 2003 [7]). Während der Entstehung der Herzhypertrophie konnten in den Kardiomyozyten drei wichtige spezifische Veränderungen beobachtet werden. Es kommt zu einer sehr schnellen Induktion von Protoonkogenen und Genen der Hitzeschockproteine, die so genannten „immediate early genes (IE)“. Weiterhin zeigen sich qualitative und quantitative Veränderung in der Genexpression und eine Steigerung der Proteinsynthese (Komuro et al. 1990 [8];

Ruwhof and van der Laarse 2000 [5]). Schon 1972 haben Peterson et al. gezeigt, dass die Dehnung rechtsventrikulärer Papillarmuskeln des Kaninchens zu einer Steigerung der Proteinsynthese führt (Peterson et al. 1972 [9]). Mechanischer Stress und insbesondere die passive Dehnung von Herzmuskelzellen stellen Hauptfaktoren für die Entwicklung der Herzhypertrophie dar (Yamazaki et al. 2000 [6])

1.2 Die Mitogen- aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen) und Herzhypertrophie

Wenn man die Entstehung der kardialen Hypertrophie aufgrund von myokardialen Dehnungsreizen auf molekularer Ebene genauer untersuchen möchte, stößt man in der Literatur immer wieder auf die so genannten Mitogen- aktivierten Proteinkinasen. Die MAP- Kinasen stellen eine wichtige Verbindung zwischen externen Stimuli und Zellkern dar und nehmen eine zentrale Stellung in der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsvorgängen ein. Sie werden durch vorgeschaltete Proteinkinasen, die MAP- Kinase Kinasen (MAPKK, MEK, MKK) nach einem bestimmten Phosphorylierungsmotiv phosphoryliert (T-E-Y=Threonin- Glutamat- Tyrosin im Falle der ERK Familie) und dadurch aktiviert (Cobb et al. 1991 [10]; Davis et al. 1993 [11]). Die aktivierten MAP- Kinasen können daraufhin entweder direkt in den Zellkern wandern und zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen oder aber sie tragen zur Phosphorylierung verschiedenartiger zytoplasmatischer Substrate bei.

Zu den negativen Regulatoren der MAP- Kinasen zählen die MAP- Kinasen Phosphatasen, welche durch Inaktivierung, die durch die MAP- Kinasen ausgelöste Reaktionskette unterbrechen können (Keyse et al. 2000 [12]; Bueno et al. 2001 [13]; Schramek et al. 1997 [14]).

Die MAP- Kinasen im engeren Sinn werden gebildet durch die Extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK 1/2), die c- Jun NH₂- terminalen Kinasen 1, 2 und 3 (JNK 1, 2, 3) und die p38 MAP- Kinasen, wobei man die JNK – und p38 MAP- Kinasen auch unter dem Begriff Stress- aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) zusammenfasst. Die SAPKs werden, wie der Name schon vermuten lässt, zusätzlich zu metabolischen Stimuli und Agonisten auch durch pathologische Stressoren, wie Ischämie und toxische Agenzien aktiviert (Sugden et al. 1998 [15]).

Es gibt mittlerweile immer mehr eindeutige Hinweise darauf, dass die mechanische Dehnung von Herzmuskelzellen eine Aktivierung von MAP- Kinasen, wie z.B. ERK 1/2 nach sich zieht (Yamazaki et al. 1993 [16]). Bueno et al. zeigten im Jahre 2000, dass die Überexpression von

MEK 1 (eine ERK 1/2 aktivierende MAP- Kinase Kinase, die zusätzlich weder auf JNK noch auf die p38 MAP- Kinasen Einfluss nimmt) in einer ausgeprägten Herzhypertrophie resultiert (Bueno et al. 2000 [17]).

Die JNK MAP- Kinasen können durch MEK 4 oder MEK 7 auf direktem Weg phosphoryliert und somit aktiviert werden. Auch bei der Gruppe der JNKs (c- Jun NH₂- terminale Kinasen) konnte eine rasche Aktivierung durch passive mechanische Dehnung nachgewiesen werden (Komuro et al. 1996 [18]). Durch MEK 7- Überexpression in den in Zellkultur befindlichen Kardiomyozyten wurde eine deutliche Herzhypertrophie induziert (Wang et al. 1998a [19]).

Die wichtigsten Aktivatoren der p38 MAP- Kinasen sind MEK 3 und MEK 6, wobei die jeweiligen aktiven Formen dieser MAP- Kinase Kinasen eine Herzhypertrophie auslösen können (Wang et al. 1998a [20]; Zarubin et al. 2005 [21]). Wie auch bei den zuvor beschriebenen MAP- Kinasen kommt es durch passive Dehnung von Kardiomyozyten zu einer Aktivierung der p38 MAP- Kinasen (Takeishi et al. 2001 [22]). Interessanterweise gehören zu den p38- Substraten verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. MEF2, NFAT3), die über eine gesteigerte Genexpression ebenfalls eine kardiale Hypertrophie induzieren können (Han et al. 1997 [23]; Yang et al. 2002 [24]).

Es wird somit deutlich, dass alle drei Untergruppen der MAP- Kinasen, ERKs, JNKs und p38 MAP- Kinasen eine entscheidende Rolle in der Übertragung von mechanischen Dehnungsreizen zur Entstehung der Herzhypertrophie spielen. Die genauen molekularen Abläufe, wie z.B. die Induktion der Proteinsynthese u. a., gilt es noch, weiter zu untersuchen.

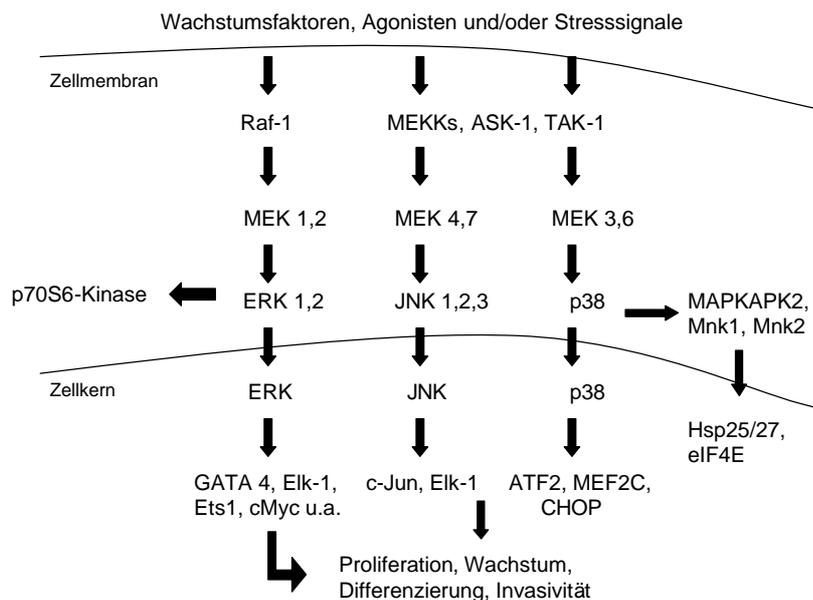


Abbildung 1: Vereinfachter Überblick über die wichtigsten MAP- Kinasen (ERKs, JNKs, p38 MAP- Kinasen), ihre zugehörigen Aktivatoren und ihre Effektor-Proteine. Als MAP- Kinase Aktivatoren fungieren die MAP- Kinase Kinasen (MEKs), die ihrerseits durch MAP- Kinase Kinase Kinasen (MEKKs), wie z.B. c-Raf stimuliert werden.

1.3 PKC und Herzhypertrophie

Die Proteinkinase C ist eine ubiquitär vorkommende Serin/ Threonin- Kinase, die entweder durch Phosphorylierung oder über „second messenger“ aktiviert werden kann. Es existieren zahlreiche Isoformen der PKC, die in drei großen Untergruppen zusammengefasst werden können. Dabei handelt es sich um die klassischen PKCs, die neuen PKCs und die atypischen PKCs. In den Kardiomyozyten konnten Isoformen aus jeder der drei Untergruppen identifiziert werden (Mackay et al. 2001 [25]). Die Proteinkinase C steht in der Signaltransduktionskaskade weit vor den MAP- Kinasen. Durch direkte oder indirekte (über Ras) Phosphorylierung von Raf, eine den MAP- Kinasen ebenfalls vorgeschaltete Proteinkinase, kann die PKC eine Aktivierung der Extrazellulär regulierten Kinasen (Sugden et al. 1998 [26]) und deren Translokation in den Zellkern in die Wege leiten (Lenormand et al. 1993 [27]). Auch die JNKs und p38 MAP- Kinasen können über Isoformen der neuen PKCs stimuliert werden. Allerdings ist der zugehörige Signaltransduktionsweg noch unklar. Eine PKC- Aktivierung in den Kardiomyozyten kann durch Stimulation einiger Transkriptionsfaktoren zur vermehrten Expression von β - Myosin schwere Ketten (β - MHC),

c-fos, atriales natriuretisches Protein (ANP) u.a. führen, was wiederum mit einer Induktion der Herzhypertrophie einhergehen kann (Ruwhof and van der Laarse 2000 [5]). Die Dehnung von in Zellkultur befindlichen Kardiomyozyten führte zu einer Steigerung der Genexpression der „immediate early genes“ und induzierte die Aktivierung der Raf- 1- Kinase und nachfolgend der MAP- Kinasen. Diese Effekte konnten unterdrückt werden, wenn die Kardiomyozyten vor der Dehnung mit dem PKC- Antagonisten Calphostin C behandelt worden waren (Yazaki et al. 1993 [28]; Yamazaki et al. 1995a [29]).

1.4 p70S6 – Kinase und Hypertrophie

Ein entscheidendes Merkmal bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie ist die Steigerung der Proteinsynthese. Diese gesteigerte Synthese zeigt sich auch an einer beschleunigten Translation der Proteine an den Ribosomen und einer Erhöhung der daran beteiligten Translationsproteine. Die p70S6- Kinase phosphoryliert und aktiviert eines dieser Translationsproteine, das so genannte S6- Protein. Yamazaki et al. beschrieben im Jahre 1993, dass die Dehnung von Herzmuskelzellen zu einem Anstieg der p70S6- Kinasenaktivität führte und schlussfolgerten weiter, dass auch die p70S6- Kinase eine Rolle in der Herzhypertrophie-Entstehung spielen könnte (Yamazaki et al. 1993 [16]). Es sind zwei Hauptsignaltransduktionswege beschrieben, über welche es zu einer Phosphorylierung der p70S6- Kinase kommt (Erikson et al. 1991 [30]; Chou et al. 1995 [31]). Zum einen ein PKC-abhängiger Weg und zum anderen ein PKC- unabhängiger Weg , der über Aktivierung der Phosphatidylinositol 3- OH- Kinase abläuft (Chung et al. 1994 [32]). Iijima et al. vermuteten nach ausgedehnten Untersuchungen in einer Veröffentlichung im Jahre 2002, dass womöglich eine bisher noch nicht klassifizierte, spezifische PKC- Isoform in bedeutendem Maße zu einer Aktivierung der p70S6- Kinase im gedehnten Myokard beiträgt (Iijima et al. 2002 [33]). Diese Aktivierung der p70S6- Kinase erfolgt ausgehend von PKC über c- Raf, MEK 1/2 und ERK 1/2. (Iijima et al. 2002 [33]).

1.5 Modell der isolierten Herzmuskelfaser

Unser heutiges Wissen über bedeutsame pathobiochemische, molekulare und pathophysiologische Vorgänge am Herzen wurde meistens aus Tierversuchen abgeleitet und auf das humane Myokard übertragen. Nun steht jedoch seit einiger Zeit schon eine Methode zur

Verfügung, die es ermöglicht genaue Untersuchungen auch an humanem myokardialem Gewebe durchzuführen.

Das Modell der elektrisch stimulierten intakten Herzmuskelfaser wurde erstmals detaillierter von Huxley et al. 1958 beschrieben (Huxley et al. 1958 [34]). Schon wenige Jahre später stellten Untersuchungen am isolierten Papillarmuskel ein fest etabliertes Modell dar (Nayler et al. 1965 [35]; Stanley et al. 1965 [36]; Parmley et al. 1967 [37]). Durch einige Weiterentwicklungen dieses Modells bietet es nun auch neben den isometrischen und den isotonen Kontraktionen die Möglichkeit der nachbelasteten Kontraktionen und stellt somit eine bessere Angleichung an physiologische Bedingungen dar (Vahl et al. 1994 [38]; Bonz et al. 1997 [39]). Mittlerweile sind die technischen Voraussetzungen so gut, dass selbst aus dem geringem chirurgischem humanem Resektionsmaterial Myokardfasern gewonnen werden können, die nach weiterer Präparation vielseitigen Untersuchungen zur Verfügung stehen.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die dehnungsabhängigen Veränderungen im humanen Myokardgewebe und ihre möglichen Auswirkungen auf die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung einer Herzhypertrophie zu analysieren. Durch hämodynamische Überladung (overload) des Herzens kommt es rasch zu einer Dilatation der Herzhöhlen mit unphysiologischer Dehnung des Myokards. Anhand der nachfolgenden Versuche soll versucht werden, jenen unphysiologischen hämodynamischen overload anhand von Myokarddehnung zu simulieren und dessen Auswirkungen auf molekularer Ebene zu betrachten. Die biochemische Untersuchung konzentrierte sich auf bestimmte Proteinkinasen, die in der Literatur bisher als zentrale an der Entstehung der Herzhypertrophie involvierte Kaskadenproteine beschrieben wurden. Dazu zählen die Proteinkinase C, die MAP- Kinasen und die p70S6- Kinase. Für die im Folgenden erläuterten Analysen wurde humanes Herzmuskelgewebe verwendet. Am Modell für isolierte humane Herzmuskelfasern konnten die dehnungsspezifischen Versuche durchgeführt werden und nur in diesem Modell war es möglich die erste Antwort auf einen Dehnungsreiz am humanen Gewebe zu untersuchen. Im Anschluss an die Dehnungsversuche konnten dann die Aktivitätsänderungen der Signaltransduktionsproteine im Western Blot analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungen an intakten Herzmuskelpräparaten des Menschen

2.1.1 Patienten

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde humanes Myokard des rechten Vorhofs verwendet. Es kamen dafür nur Patienten in Frage, die sich aufgrund einer kardialen Erkrankung einer Operation am Herzen unterziehen mussten, bei welcher die Verwendung einer Herz- Lungen- Maschine unumgänglich war. Die Patienten gaben vor der Operation schriftlich ihr Einverständnis, dass das bei dem Anschluss an die Herz- Lungenmaschine anfallende Resektionsmaterial des rechten Vorhofes für wissenschaftliche Zwecke weiter verwendet werden kann. Die Mehrzahl der Patienten wurden aufgrund einer koronaren Herzerkrankung mit Mehrgefäßbeteiligung mit aortocoronaren Venen- und Arterienbypässen versorgt. Ein kleinerer Teil der Patienten litt an einer Aortenklappenerkrankung und wurde mittels Aortenklappenersatz versorgt. Ausgeschlossen von den Untersuchungen wurde Gewebe von Patienten mit Mitralklappenerkrankungen, da bei diesen Patienten eine größere Gefahr der Rechtsherzbelastung besteht. Durch den Rückstau des Blutes in das rechte Herz kann es auch zu Anpassungserscheinungen des rechten Atriums durch Dilatation oder Hypertrophie kommen. Ebenfalls als Ausschlusskriterium galt das Vorhofflimmern, da die Muskelstreifenpräparate, die aus zuvor flimmerndem Gewebe gewonnen wurden, häufig bei der späteren, erneuten elektrischen Stimulation mit der Ausbildung eines Eigenrhythmus reagierten. Das verwendete Gewebe wurde je nach Vorerkrankung der Patienten so selektiert, dass eine schon zuvor bestehende Beeinträchtigung des rechten Vorhofes weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 1: Patientendaten und Operationen

ACVB = aortocoronarer Venenbypass, AKE = Aortenklappenersatz

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe5
Anzahl Patienten	6	11	11	3	6
- Männlich	4	10	6	2	4
- Weiblich	2	1	5	1	2
Operation:					
ACVB	4	9	7	3	5
AKE	2	/	1	/	/
ACVB + AKE	/	1	3	/	1
Aorta ascendens - Ersatz	/	1	/	/	/

2.1.2 Gewinnung intakter humaner Herzmuskelpräparate

2.1.2.1 Operative Gewebsentnahme

Bei einer kardiochirurgischen Operation ist es häufig nötig, den Patienten an eine Herz–Lungen– Maschine anzuschließen. Die Aorta ascendens wird dabei abgeklemmt und es wird ein Umgehungskreislauf um das Herz errichtet. Dabei wird das Blut aus dem rechten Vorhof mittels einer eingebrachten großlumigen Kanüle abgepumpt und nach Ausschaltung des Herzens erst wieder distal der Abklemmung in die Aorta ascendens zurück geleitet. Um das Einbringen der großlumigen Kanüle in den rechten Vorhof zu erleichtern, wird ein Teil des rechten Herzvorhofes entfernt. Die in den Versuchen verwendeten Herzmuskelstreifen wurden aus jenem Vorhofgewebe gewonnen. Während der Resektion wurde vom Chirurgen darauf geachtet, das zu resezierende Myokard nicht zu traumatisieren (minimal touch Technik).

2.1.2.2 Transport intakter Herzmuskelpräparate

Nach der chirurgischen Entfernung wurde das rechte Herzohr sofort in eine mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) präoxygenierte 4°C kalte Krebs- Henseleit- Lösung mit 30 mM 2,3 Butanedione-Monoxime (BDM) gelegt (pO₂ > 500 mmHg) und in derselbigen transportiert. Der Zusatz von BDM hinsichtlich der Präparathaltbarkeit hatte sich gegenüber anderen Transportlösungen für intakte Muskelpräparate als überlegen gezeigt (Mulieri et al. 1989 [40], Vahl et al. 1994 [38]). Während der etwa 10- minütigen Transportzeit wurden die Muskelpräparate in der Lösung weiter auf Eis bei 4°C und unter Carbogen- Begasung gelagert, wobei es zu keinem direkten Kontakt des Muskelgewebes mit dem Eis kam.

2.1.3 Präparation intakter Herzmuskelstreifen

Die Präparation des rechten Herzohres erfolgte in begaster auf Eis gekühlter KHS/BDM- Lösung. Unter 10-facher Vergrößerung eines Mikroskopes wurde mit Hilfe einer mikrochirurgischen Schere und einer Pinzette vorsichtig, ohne zu dehnen, ein ungefähr 2-3 mm langer Muskelstreifen herausgeschnitten. Die präparierten Muskelstreifenpräparate hatten somit eine Länge von etwa 2-3 mm und einen Durchmesser von 1-2 mm. Es wurden nur Muskelfasern präpariert, die makroskopisch keine morphologischen Veränderungen zeigten

und auch nur solche Herzohren verwendet, aus denen es möglich war, mindestens 3 - 5 Muskelstreifenpräparate zu isolieren.

2.1.4 Schematischer Versuchsaufbau zur Realisierung einer Kontraktion und Dehnung intakter Herzmuskelstreifen

Es wurden ausschließlich frei auf dem Markt erhältliche Geräte verwendet (Muscle Research System, Fa. Güth Scientific Instruments, Heidelberg-Ziegelhausen, FRG). Der Herzmuskelstreifen wurde zwischen Servomotor und Kraftaufnehmer (Force- Transducer) durch zwei Feinklemmen unter optischer Sicht eines Stereomikroskops eingespannt, wobei bei der Positionierung jeglicher Zug am Präparat vermieden wurde. Im ungedehnten Zustand hing der Muskelstreifen zwischen den beiden Fixierungsenden leicht durch. Diese Länge wurde als *slag length* (sl) definiert. Danach wurde eine Glas- Perfusionsküvette (Güth et al. 1986 [41]) über das eingespannte Muskelpräparat geschoben, durch die der Muskel konstant mit einer oxygenierten Krebs- Henseleit- Lösung umspült wurde, die das Muskelstreifenpräparat mit ausreichend Nährstoffen versorgte. Diese Lösung wurde über eine Absaugvorrichtung nach Durchlaufen der Perfusionsküvette aus dem System entfernt. Die Lösungstemperatur war individuell einstellbar. Nachdem die Muskelstreifen aus der auf Eis gekühlten KHS/BDM-Lösung entnommen und eingespannt wurden, wurde die Lösungstemperatur der umspülenden KHS- Lösung langsam auf 37°C erwärmt und während des ganzen Versuches konstant gehalten. Das Kraftsignal wurde analog in den Computer eingespeist (Software: muscle) und auf einem Direktschreiber zusätzlich protokolliert.

Der Versuchsaufbau im Einzelnen:

Mikroskop:

Der Herzmuskelstreifen wurde unter optischer, 10- facher Vergrößerung eines OLYMPUS- Stereomikroskops zwischen Kraftaufnehmer und Längengeber mittels zweier Feinklemmen eingespannt. Mittels einer intraokularen Skalierung konnte der Faserdurchmesser und die Faserlänge abgeschätzt werden.

Kraftaufnehmer (Force- Transducer):

Der Force- Transducer (Güth Scientific Instruments, Heidelberg- Ziegelhausen) hatte einen maximalen Messbereich von 100 mN. Mittels des so genannten Bridge- Amplifiers konnten Messbereiche von 1/ 3/ 10/ 30 und 100 mN eingestellt werden.

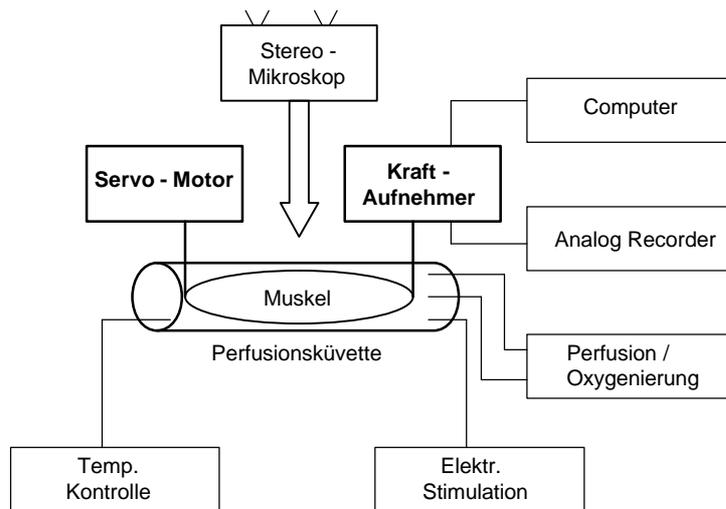


Abbildung 2a: Schematischer Versuchsaufbau zur Analyse des Kontraktionsverhaltens bei intakten Herzmuskelstreifen. Detaillierte Erklärung des Versuchsaufbaus im Text.

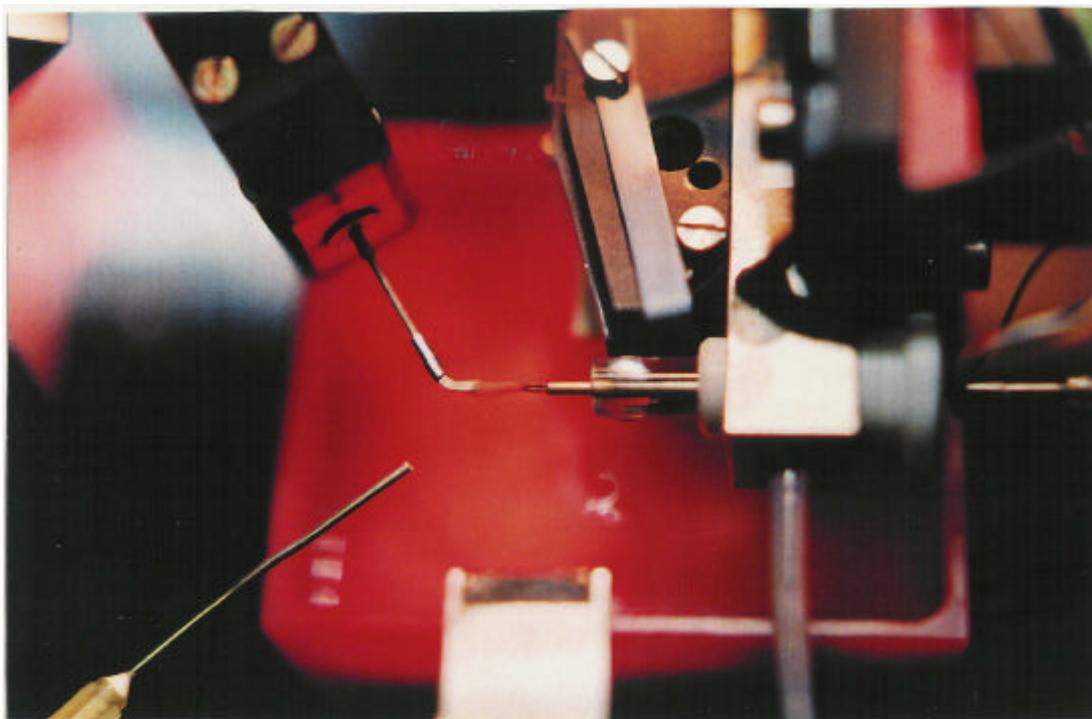


Abbildung 2b: Aufblick auf den Versuchsaufbau mit Kraftaufnehmer, Servomotor, Perfusionskuvette, eingespanntem Muskelstreifen und Absaugvorrichtung

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Krebs- Henseleit- Lösung (KHS)

NaCl	118,1 mMol
Glucose	11,1 mMol
KCl	4,7 mMol
NaHCO ₃	25,0 mMol
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mMol
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mMol
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol

Bei einem pH-Wert von 7,4 und einem pO₂ > 500 mmHg.

2.1.4.1 Elektrische Stimulation der Muskelstreifenpräparate

Die elektrische Stimulation erfolgte als Feldreizung über zwei an der Küvette angebrachten Platinelektroden mittels eines Reizgenerators (Stimulator Typ 215 / I, Hugo- Sachs-Elektronik, D - 79232 March- Hugstetten). Bei einer Reizdauer von 10 Millisekunden wurde die Reizamplitude so gewählt, dass sie ca. 10% über der Reizstärke betrug, die zur Auslösung einer maximalen isometrischen Kontraktion notwendig war. Hierzu waren meist Spannungen zwischen 4 - 6 V notwendig. Die Stimulationsfrequenz betrug 1 Hz.

2.1.5 Versuchsdurchführung

Die Muskelstreifen wurden zur Durchführung der Versuche vorsichtig mit einer Pinzette aus der BDM- haltigen gekühlten KHS- Lösung herausgenommen. Die Pinzette wurde dabei nur an einem Ende des Muskelstreifens angesetzt. Dann wurde der Muskelstreifen unter optischer Sicht eines Stereomikroskopes zunächst auf den Feinklemmen zwischen Servomotor und Kraftaufnehmer abgelegt. Es wurden nun, unter Vermeidung jeglichen Zuges am Präparat, die Enden des Muskelstreifens in die Feinklemmen positioniert. Nach der korrekten Positionierung wurden die Feinklemmen geschlossen, so dass der Muskelstreifen an den Enden fixiert war und zwischen den Fixierungsenden leicht durchhing (slag length). Danach wurde die Glas- Perfusionsküvette (Güth et al. 1986 [41]) über das eingespannte Muskelpräparat geschoben, über die der Muskel konstant mit einer oxygenierten, 37°C

warmen KHS- Lösung umspült wurde. Die KHS- Lösung versorgte den Muskel mit ausreichend Nährstoffen. Jeder Muskelstreifen wurde vor Beginn der Stimulation für mindestens 5 Minuten mit KHS- Lösung umspült, um zunächst die restlichen BDM- Anteile aus dem Gewebe auszuwaschen (Vahl et al. 1994 [42]). Während dieser Zeit wurde mit Hilfe einer sich im Okular des Stereomikroskopes befindlichen Skalierung die Länge des Muskelstreifens zwischen den Fixierungspunkten und dessen Breite bestimmt. Nach Ablauf der 5- minütigen Vorperfusion (in Versuchsreihe 5 wurde 30 Minuten abgewartet) wurde mit der Stimulation des Muskelstreifen begonnen. Es wurde dafür eine Spannung zwischen 4 - 6 V und eine Stimulationsfrequenz von 1 Hz gewählt. Ein vitaler Muskelstreifen reagierte ausgesprochen rasch auf die elektrische Stimulation und kontrahierte sich in der vorgegebenen Frequenz. In der slag length Gruppe wurde der Muskelstreifen ohne weitere Vordehnung belassen und von Beginn der Kontraktionen an wurde die so genannte Einschlagzeit gemessen, die zwischen 5- 10 Minuten betrug. Das Kraftsignal wurde ab Kontraktionsbeginn analog in den Computer eingespeist und auf einem Direktschreiber protokolliert. Beim Durchführen von Dehnungsversuchen wurde der Muskelstreifen nach Beginn der elektrischen Stimulation und der Kontraktionen auf die gewünschte Stufe vorgedehnt. Die Vordehnung in der optimal stretch Gruppe erfolgte unter Kontrolle des Kraftsignals und wurde definiert als jene Länge, bei welcher das Kraftsignal sein Maximum erreicht hat und nicht weiter zunimmt und das Verhältnis von Systole zu Diastole 2:1 nicht unterschreitet. Die Muskelstreifen in der over stretch Gruppe wurden auf die doppelte Ausgangslänge vorgedehnt. Erst nachdem die gewünschte Dehnung erreicht war, wurde mit der Messung der 5–10 minütigen Einschlagzeit begonnen. Nach der Einschlagzeit sollte der Muskelstreifen regelmäßig mit gleich bleibender Kraft und in der vorgegebenen Frequenz von einem Hertz kontrahieren, nur dann wurde mit der Messung der Versuchszeit begonnen. Wenn ein Muskelstreifen während der Versuchszeit einen Eigenrhythmus entwickelte oder das Kraftniveau nicht über den gesamten Versuchszyklus halten konnte, wurde er nicht für die Versuchsauswertung verwendet.

2.1.6 Konservierung der untersuchten Herzmuskelstreifen

Nach Beendigung der jeweiligen Versuche wurden die zur Fixierung verwendeten Metallklemmen vorsichtig geöffnet, die Herzmuskelstreifen mittels einer Pinzette entnommen und in ein beschriftetes Eppendorf- Cap gegeben. Das Eppendorf- Cap wurde dann sofort in

flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Tiefkühlschrank bei konstanten -80°C aufbewahrt.

2.2 Weitere Untersuchungen der Herzmuskelstreifen mittels proteinanalytischer

Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung aus konservierten Herzmuskelstreifen

Zur Probenvorbereitung der Versuchsreihen 1-4 für die sich anschließenden Western Blot Analysen wurden je nach Gewicht zwischen 9 und 11 Muskelstreifenpräparate pro Versuchsgruppe verwendet. Diese Muskelstreifenpräparate stammten aus mehreren Herzohren und somit auch von mehreren Patienten, da aus einem Herzohr meistens nur vier bis fünf intakte Muskelstreifenpräparate isoliert werden konnten. Da jedoch bei nicht allen der isolierten Muskelstreifen adäquate Kontraktionen ohne Eigenrhythmus auslösbar waren, gingen wiederum nur circa zwei bis drei Muskelstreifen pro Herzohr (und somit pro Patient) in die Gruppen der Versuchsreihen ein. Daher war es nötig, die Muskelstreifen aus mehreren Herzohren zu poolen. Die nach den Versuchen bei -80°C eingefrorenen Muskelstreifen, wurden noch im gefrorenen Zustand einzeln aus ihrem jeweiligen Eppendorf- Cap genommen, zusammen gewogen, in ein Homogenisator- Reagenzglas gegeben und mit einer vom Gewicht der Muskelstreifen abhängigen Menge $1\times$ SDS, welches zuvor auf 95°C erhitzt wurde, homogenisiert. Pro mg Gewebe wurden ca. $20\ \mu\text{l}$ $1\times$ SDS Puffer verwendet (Laser et al., 1998 [112]). Die Proben wurden jeweils 2 - 3 Minuten bei 1300 – 1500 U/min homogenisiert. Danach wurde die Suspension kurz auf Eis gekühlt, in ein Eppendorf- Cap pipettiert und 10 Minuten bei 14 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf- Cap pipettiert und als Probe verwendet. Das Pellet wurde verworfen. Auf eine Proteinbestimmung der einzelnen Proben wurde, bis auf Versuchsreihe 5, verzichtet. Aufgrund der identischen Vorbereitung der Proben und der immer gleichen verwendeten Probenmenge ($10\ \mu\text{l}$ pro SDS-Page-Kammer) wurde eine annähernd gleiche Proteinmenge vorausgesetzt. Ziel dieser Arbeit war nicht die genaue Mengenbestimmung der Signalkaskadenproteine, sondern erste richtungweisende Hinweise zu erhalten, welche Proteine der Signalkaskade auf die nachgeahmten Dehnungs- und Stimulationsbedingungen am humanen Herzmuskelgewebe reagieren.

2.2.2 Probenvorbereitung mit RIPA- Aufschlusspuffer

Die einzelnen Muskelstreifen der Versuchsreihe 5, welche bei -80°C eingefroren waren, wurden aus ihrem Eppendorf- Cap genommen, und mit $20\mu\text{l}$ RIPA (Radioimmunopräzipitations Assay) versetzt, welchem die Inhibitoren bereits zugesetzt waren. Dieses Gemisch wurde in einem Röhrchen homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Eppendorf- Cap gegeben, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und danach 10 Minuten bei 14000 U/min und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf- Cap pipettiert. Es erfolgte dann die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford und im Anschluss daran wurden die Proben auf $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit RIPA verdünnt. Die Proben wurden nun noch im Verhältnis 1: 1 mit 2x SDS durchmischt (Laser et al JBC 2000 [43]), so dass sie eine Konzentration von $1,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufwiesen.

Tabelle 3: Zusammensetzung des RIPA- Aufschlusspuffers

MOPS	418 mg	(20 mM)
NaCl	876 mg	(150 mM)
NP – 40	1 ml	(1%)
Na – Deoxycholate	1 g	(1%)
SDS	0,1 g	(1%)
EDTA	37,2 mg	(1 mM)
Aqua dest.	ad 100 ml	

2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem Bradford- Assay

Die Methode wurde 1976 von M. M. Bradford veröffentlicht und hat sich zur Bestimmung der Proteinkonzentration bewährt. Diese Art der Proteinkonzentrations- Bestimmung wurde nur in der Versuchsreihe 5 angewandt. Sie basiert auf einer intensiven Blaufärbung durch Komplexbildung zwischen Proteinen (insbesondere Arginin- Reste) und Farbstoff, deren Extinktion bei 595 nm gemessen wird. Es ist nötig, vor jeder Messung eine Standardkurve zu ermitteln. Zur Bestimmung der Standardkurve wurden bekannte Proteinkonzentrationen von $4, 8, 12, 16$ und $20\mu\text{g}$ verwendet. Den Proteinproben unbekannter Konzentration wurde kein Standard zugesetzt. Die Lösungen in den Röhrchen wurden mit dem Vortex durchmischt, woraufhin ein Farbumschlag nach Blau auftrat, dessen Extinktion nach fünf Minuten

Wartezeit bei 595 nm gemessen wurden. Aus den ermittelten Werten der bekannten Proteinkonzentrationen wurde eine Ausgleichsgerade gebildet, anhand derer die Proteinkonzentration der unbekannt Probe nach Extinktionsmessung ermittelt werden konnte.

2.2.3 Western Blot Analysen

2.2.3.1 Auftrennung von Proteinen

Mittels der SDS Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine unabhängig von ihrer Ladung der Größe nach aufgetrennt.

Für die Elektrophorese wurden NuPAGE® Novex 4 - 12% Bis- Tris- Gele der Firma Invitrogen mit jeweils 10 bzw. 12 Beladungstaschen verwendet. Die Proben und der Größenmarker wurden jeweils für 5 min. bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt. Anschließend wurden die Proben wieder abgekühlt und dann bei 14 000 U/min und 4°C zentrifugiert. In dem darauf folgenden Schritt wurden die Geltaschen zunächst gespült und dann jeweils mit 10 µl der Probe geladen (In der Versuchsreihe 5 wurden die Geltaschen jeweils mit 10,5 µg Protein bestückt). Zur Erleichterung der Größenbestimmung der in den Proben enthaltenen Proteine wurde zum einen der High- Marker Full Range Rainbow in 2:1 Verdünnung mit 2%igem SDS in einer Menge von 10 µl pro Tasche verwendet. Er enthielt farbig markierte Eichproteine in unterschiedlichen Massen von 15 kD bis 250 kD, die schon direkt nach der Elektrophorese als gefärbte Banden zu sehen waren und als Größen- Orientierung während und nach dem Blotvorgang dienten. Zum anderen wurde der Low- Marker MagicMarker unverdünnt benutzt und daher nur mit 2 µl pro Tasche gefüllt. Der Low- Marker enthielt ebenfalls Markerproteine im Bereich 20 kD bis 120 kD, die allerdings erst durch die Chemoluminiszenz- Detektion sichtbar wurden. Leere Geltaschen wurden mit 1% SDS gefüllt, so dass jeweils alle Taschen des Gels bestückt waren. Die innere Elektrodenkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die SDS Polyacrylamidgelelektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von 60 mA (Dauer ca. 1h45min) durchgeführt.

2.2.3.2 Übertragung von Proteinen auf eine PVDF – Membran

Der Elektrotransfer von Proteinen wird verwendet, um die im Bis- Tris- Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Oberfläche, wie z.B. eine PVDF- Membran zu übertragen und die Proteine somit für Reaktionen mit Makromolekülen leichter zugänglich zu machen. Für den Transfer aus SDS- PAGE- Gelen hat sich der Wet- Transfer bewährt. Die PVDF- Membran wird zunächst 1 min. in 96% Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer gewaschen. Das Gel wird aus der Elektrophoresekammer entnommen und für circa 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Nach Anordnung der Schichten im Blot- Modul und Zugabe des Transferpuffers erfolgt der Proteintransfer bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 30V und einer Stromstärke von ca. 150 mA (Dauer 1h).

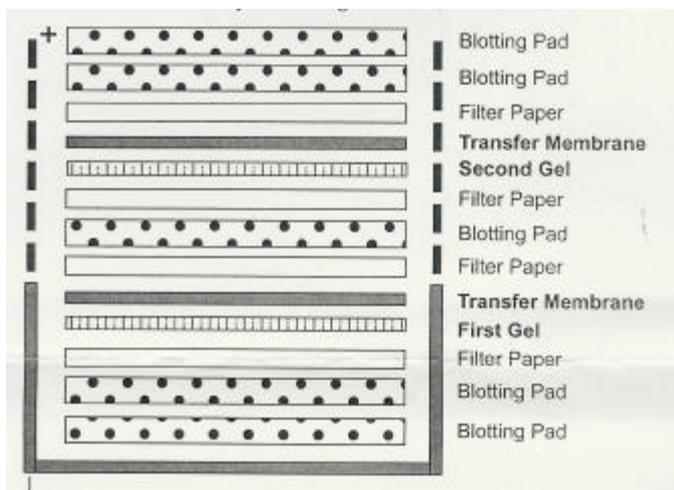


Abbildung 3: Anordnung im Blot- Modul bei Proteintransfer auf die PVDF- Membran

Danach folgte der sechzig- bis neunzigminütige Blockiervorgang, um eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Wenn Phosphospezifische, also in den meisten Fällen aktive Formen von Signalkaskadenproteinen nachgewiesen werden sollten, wurde als Blockiermittel eine BSA (Rinderserumalbumin)-haltige Lösung (TBS-T, 1-3% BSA) verwendet, war dies nicht der Fall, wurden die Membranen mit einer milchhaltigen Lösung (TBS-T, 10% Milch) blockiert. (Eine Ausnahme bildeten die Antikörper der Firma Cell- Signaling, da von der Firma für alle Antikörper eine BSA- haltige Lösung als Blockiermittel empfohlen wurde.)

2.2.3.3 Immunologische Detektion von Proteinen und Visualisierung

Die auf die PVDF- Membran übertragenen Proteinbanden wurden immunologisch nachgewiesen. Der primäre Antikörper bindet an das gesuchte Protein. Der sekundäre Antikörper ist mit HRP (engl. horse raddish peroxidase) gekoppelt und bindet an den primären Antikörper. Der enzymgekoppelte Antikörper setzt geeignete Substrate um, dessen Produkte durch Chemilumineszenz mit Hilfe einer CCD- Kamera aufgenommen und abgespeichert wurden.

Der Nachweis des Proteins erfolgte in mehreren Schritten. Im Anschluss an den Blockierungsvorgang wurden die primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden dann über Nacht bei 4°C auf einem langsam rotierenden Schwenktisch inkubiert. Als Verdünnungsmittel für die Phospho-spezifischen Antikörper diente die jeweilige Blockierlösung, die übrigen primären Antikörper wurden in einer 5% Milch enthaltenden Lösung (TBS-T, 5% Milch, 0,2% NaN₃) verdünnt.

Zur Detektion, der an die Membran gebundenen primären Kaninchen- bzw. Mausantikörper, wurde ein entsprechender Meerrettich- Peroxidase- konjugierter sekundärer Antikörper (von SantaCruz) eingesetzt. Die verwendete Konzentration der sekundären Antikörper war mit 1:5000 bis 1:8000 sehr niedrig und als Verdünnungsmittel wurde eine Tris gepufferte Salzlösung mit 0,15 % Tween-20 (TBS-T) benutzt. Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Sowohl nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, als auch nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Wobei bei der Verwendung von Phospho- spezifischen Antikörpern der erste Waschgang jeweils mit einer höheren NaCl- konzentrierten TBS-T Lösung (TBS-T+NaCl) durchgeführt wurde.

Zur Blotentwicklung wurde das Chemiglow™ Reagenzkit (Alphainnotech) verwendet. Nach der Zugabe des Nachweisreagenz spaltete das Markerenzym, die Meerrettich- Peroxidase, das Substrat zu einer metastabilen Verbindung, die unter Lichtemission weiter zerfiel. Es wurde dabei die Reaktion von naszierendem Sauerstoff (aus der Spaltung von H₂O₂) mit Luminol ausgenutzt (Holtzhauer M, Biochemische Labormethoden, 3.Auflage, 1997, S.77 [44]). Die Membran wurde faltenfrei in Klarsichtfolie eingewickelt und in die Entwicklungskammer der CCD- Kamera gelegt. Dann wurde die Kamera eingestellt (Belichtungszeit von 30 s pro Bild mit insgesamt 64 Bildern pro Blot) und das durch die Enzymreaktion entstandene Lichtsignal wurde auf einen Film exponiert und als Bilderserie abgespeichert (MultiImage™Light Cabinet von AlphaInnotechCorporation).

2.2.3.4 Densitometrische Bestimmung von Proteinintensitäten

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels Dichtemessung der Banden, da die Dichte bzw. der Schwärzungsgrad der Banden als proportional zur Proteinintensität der Probe gilt. Für die Auswertung wurde das Programm AlphaInnotech Version 2.x verwendet. Dieses Programm ermöglichte einen direkten Zugriff auf die abgespeicherten Bilderserien. Mit Hilfe der „Spot Densitometry Tools“ konnten die zu bestimmenden Blot- Banden (Area of Interest) eingerahmt werden (dabei wurde für die Banden einer Versuchsreihe immer die gleiche Rahmengröße gewählt, die um die Banden noch einen kleinen Abstand ließ, zur Berechnung des Hintergrundes) und die Dichte innerhalb des Rahmens wurde anhand der Pixelintensität, bezeichnet als „Integrated Density Value (IDV)“, gemessen. Der Hintergrund der Blot- Banden wurde vom IDV abgezogen und hatte somit keinen störenden Einfluss auf die Densitometrie. Dazu wurde die Option „Automatic Background“ aktiviert. Diese Funktion ermittelt den Durchschnitt der 10 niedrigsten Pixelwerte in jedem Rahmen (daher war ein kleiner Abstand beim Einrahmen der Banden nötig), definierte diesen Wert als Hintergrund (BACK) und subtrahierte dann von jedem Pixelwert diesen BACK- Wert. Die Summe aus den ermittelten Differenzen wurde letztendlich als IDV automatisch berechnet und in einem Datenfenster angezeigt. Zusätzlich zu dem IDV wurde auch der „average value (AVG)“ nach Hintergrundkorrektur als Quotient aus IDV und Area of Interest (= Rahmengröße) bestimmt. Die ermittelten AVG- Werte wurde in der vorliegenden Arbeit zur Auswertung verwendet.

2.3 Versuchsreihen

Um die Auswirkungen von Dehnung, Stimulation und zeitlichem Einfluss auf die Aktivierung der Signalkaskadenproteine zu untersuchen, war es nötig, verschiedene Versuchsreihen zu erstellen. Diese einzelnen Versuchsreihen waren jeweils noch in verschiedene Subgruppen unterteilt, die entweder durch eine bestimmte Dehnungsstufe charakterisiert waren, als Kontrolle dienten oder mit TPA (Phorbol- 12- Myristate- 13- Acetat), ein auf die PKC, die MAP- Kinasen und auf die p70S6 Kinase aktivierend wirkendes Phorbol- Ester, behandelt wurden.

Tabelle 4: Überblick über die durchgeführten Versuchsreihen

(Einschlagzeit=Zeit von Beginn der elektrischen Stimulation des Muskelstreifens und Erreichen der gewollten Dehnungsstufe bis zum Auftreten von gleichmäßigen Muskelkontraktionen)

	Versuchsreihe 1	Versuchsreihe 2	Versuchsreihe 3	Versuchsreihe 4	Versuchsreihe 5
Dauer der Versuche (in min.)	10	30	60	30	30
Elektr. Stimulation	4 – 6 V	4 – 6 V	4 – 6 V	keine	4 – 6 V
Gruppen: a) Kontrolle (ko) b) eingespannte Kontrolle (ko2) c) slag length (sl) d) optimal stretch (ol) e) over stretch (uel) f) Inkubation in TPA (Zeitdauer in min.)	a (ko) c (sl) d (ol)	a (ko) c (sl) d (ol) e (uel) f (TPA, 30)	a (ko) b (ko2) c (sl) d (ol) e (uel) f (TPA, 60)	a (ko) c (sl) e (uel)	a (ko) c (sl) e (uel)
Art der Proben (gepoolt / ungepoolt)	gepoolt(10)	gepoolt(11)	gepoolt(10)	gepoolt(9)	ungepoolt
Einschlagzeit (in min.)	5 – 10	5 – 10	5 – 10	keine	10 – 15
Perfusionszeit insgesamt (in min.)	20 – 25	40 - 45	70 - 75	30	70 - 75
Perfusionszeit vor elektr. Stimulation (in min.)	5	5	5	keine	30

In der Versuchsreihe 1 wurden zunächst 10- minütige Versuche mit einer Kontrollgruppe, einer slag length Gruppe (eingespannte, ungedehnte, kontrahierende Muskelstreifen) und einer optimal stretch Gruppe (eingespannte, optimal vorgedehnte, kontrahierende Muskelstreifen) durchgeführt. Die Muskelstreifen wurden stimuliert und Kontraktionen in einer Frequenz von 1 Hz wurden ausgelöst.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Muskelstreifen 30 Minuten stimuliert und gedehnt. Im Unterschied zur ersten Reihe wurde nun noch eine zusätzliche Dehnungsstufe eingeführt, die over stretch Gruppe. Bisher wurden die Muskeln entweder in slag length (ungedehnt) oder in optimal stretch (optimale Vordehnung für maximale Kraftentwicklung sichtbar als

maximale Kraftamplitude) betrachtet. Bei der over stretch Gruppe wurden die Muskelstreifen auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Länge gedehnt und ihre Vordehnung wurde nahezu maximal. Dabei verloren die Aktin- Myosin- Filamente zunehmend ihre Kontaktfläche zueinander und das Systole- Diastole- Verhältnis verschlechterte sich, zumeist hauptsächlich durch einen Anstieg der Diastole. Als weitere neue Gruppe wurde die PMA (=TPA)- Gruppe eingeführt. Parallel zu den mechanischen Versuchen wurden ebenfalls aus dem Herzohr herauspräparierte Muskelstreifen in TPA- haltiger Lösung inkubiert.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die Auswirkungen elektrischer Stimulation und Dehnung über den Zeitraum einer Stunde untersucht. Dabei wurden die gleichen Gruppen, wie auch bei der Versuchsreihe 2, gebildet. Als einzige neue Gruppe kam eine zweite Kontrollgruppe hinzu, in welcher die Muskelstreifen im ungedehnten Zustand und auch ohne elektrische Stimulation zwischen Servomotor und Kraftaufnehmer über eine Zeitspanne von 60 Minuten fixiert wurden.

In einer vierten Versuchsreihe wurde nur der Einfluss der Dehnung über 30 Minuten betrachtet ohne elektrische Stimulation. Daher waren nur die Dehnungsstufen slag length und over stretch möglich, denn eine optimal stretch Gruppe hätte eine elektrische Stimulation und einhergehende aufzeichenbare Kontraktion der Muskeln voraus gesetzt, um anhand der Kraftmessung und des Systolen- Diastolen- Verhältnisses die optimale Vordehnung bestimmen zu können.

In der fünften Versuchsreihe wurden ebenfalls 30- minütige Versuche durchgeführt. Wie auch schon in der Versuchsreihe zwei wurden die Muskelstreifen sowohl gedehnt, als auch mittels Feldreizung stimuliert. Der entscheidende Unterschied zur Reihe zwei ist die Tatsache, dass nun keine gepoolten Proben verwendet wurden (gepoolt bedeutet, dass für eine Gruppe Muskelstreifen aus mehreren Herzohren verwendet wurden und dann zusammen vorbereitet und mittels Western Blot ausgewertet wurden). In der Reihe fünf wurden jeweils für eine komplette Versuchsreihe bestehend aus Kontrollgruppe, slag length Gruppe und optimal stretch Gruppe Muskelstreifen aus nur einem Herzohr (also von nur einem Patienten) verwendet. Die Versuchsreihe 5 wurde insgesamt sechsmal durchgeführt (n=6) und dann statistisch ausgewertet.

2.3.1 Verwendung von TPA

TPA (Phorbol- 12- Myristate- 13- Acetat) ist das gebräuchlichste Phorbol- Ester. Es bindet an die Proteinkinase C und aktiviert selbige, was wiederum bei Anwesenheit von c- Raf und den MEKs (MAP- Kinasen- Aktivatoren) zu einer nachfolgenden Aktivierung der MAP- Kinasen führt. (Marquardt et al. 1994 [45]; Sozeri et al. 1992 [46])

In den Versuchsreihen 2 und 3 wurden aus dem Herzohr präparierte Muskelstreifen parallel zu den mechanischen Versuchen und für die jeweilige Versuchsdauer (Reihe 2 – 30 min.; Reihe 3 – 60 min.) in TPA- haltiger DMSO- Lösung (TPA- Konzentration: 100 nM) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgte die Konservierung der Muskelstreifen in flüssigem Stickstoff und darauf folgend bei -80°C im Tiefkühlschrank.

2.4 Statistische Auswertung

Da in den meisten Versuchsreihen mit gepoolten Proben gearbeitet wurde (gepoolt bedeutet, dass für eine Gruppe, z.B. slag length Gruppe der Versuchsreihe 1 [10 Minuten], Muskelstreifen aus mehreren Herzohren verwendet wurden, die dann zusammen vorbereitet und mittels Western Blot ausgewertet wurden) und diese Versuchsreihen daher nur einmal durchgeführt wurden, ist eine Auswertung nach herkömmlichen statistischen Kriterien schwierig. Aus diesem Grund wurde zur Ermöglichung einer Auswertung eine Signifikanzgröße definiert. Unterschiede wurden dann als relevant betrachtet, wenn sich die Intensitätswerte zwischen zwei gepoolten Gruppen einer Versuchsreihe um mindestens 50 % (1,5- fach) unterschieden. Da in der Versuchsreihe 5 Einzelversuche möglich waren und die komplette Versuchsreihe insgesamt sechsmal durchgeführt wurde, war in dieser Reihe eine statistische Auswertung mittels Mann- Whitney U- Test möglich.

2.5 Materialien

2.5.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril	Sigma (Fluka 00692)
BSA	Sigma
ChemiGlow™	Alpha Innotech Corporation
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA	Sigma

Essigsäure	Merck
Full Range Rainbow	Amersham Life Science (RPN800)
Glycerol	Sigma
MagicMarker	Invitrogen (LC5600)
Methanol	Merck
Milchpulver	Noras
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natrium – Deoxycholate	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Natriumazid	Sigma
NP – 40	Merck
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen (NP0321)
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen (NP0001)
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen (NP00061)
Salzsäure	Merck
TPA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate)	Cell Signaling (#9905)
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris-Base)	Sigma
Tween®20	Sigma

Inhibitoren zur Probenzubereitung der Versuchsreihe 5:

Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem (539134)
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Calbiochem (524 625)
Okadaic Acid	Calbiochem (459620)

Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot:

1% SDS	10% SDS
2% SDS	20% SDS
TBS-T	
TBS-T + NaCl	
Laufpuffer (1l)	50 ml NuPAGE SDS Running Buffer (20x), 950 ml Aqua bidest.

Transferpuffer (1l)	50 ml NuPAGE SDS Transfer Buffer (20x), 950 ml Aqua bidest.
Blockierlösung	1-3% BSA in TBS-T (bei Phospho-Ak) oder 10% Milch in TBS-T; jeweils 0,05% NaN ₃

2.5.2 Antikörper

Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Typ	Spezies	Konzentration	Firma	Bestellnummer
c - Raf	IgG1	Mouse	1: 800	BD	610151
ERK 1/2		Rabbit	1: 8000	Bio Source	44 - 654 G
ERK 1/2 [pTpY185/187]		Rabbit	1: 1000	Bio Source	44 - 680
GAPDH	IgG2b	Mouse	1: 8000	Chemicon	MAB 374
JNK 2	IgG1	Mouse	1: 1000	Santa Cruz	sc - 7345
JNK 2 [pTpY183/185]		Rabbit	1: 5000	Promega	V 7931
p38	IgG1	Mouse	1: 200	Santa Cruz	sc - 7972
p38 [pTpY180/182]		Rabbit	1: 1000	Bio Source	44 - 684
p70S6 - Kinase		Rabbit	1: 200	Santa Cruz	sc - 230
PKC	IgG2a	Mouse	1: 500	Santa Cruz	sc - 17769
PKC [pSer660]		Rabbit	1: 500	Cell Signaling	9371

2.5.3 Geräte und Materialien für Western Blot Analysen

CCD- Kamera (MultiImage™LightCabinet DE-500)	Alpha Innotech Corporation
Spannungsgerät	Amersham Biosciences
Sure Lock Western Blot Modul	Invitrogen
PVDF- Membranen/ Filter	Invitrogen

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen

Mittels densitometrischer Auswertung (siehe 2.2.3.4) konnten die Unterschiede in der Proteinintensität zwischen den einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe aufgezeigt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen vorgestellt.

3.1.1 Versuchsreihe 1 (10 min. Versuche; mit Stimulation; Kontrollgruppe, slag length Gruppe, optimal stretch Gruppe)

Bei den meisten der untersuchten Proteine kam es zu einem leichten Intensitätsanstieg von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe. Dies kann zum einen durch mechanische Ursachen während der Fixierung des Muskelstreifens zwischen Kraftaufnehmer und Servomotor bedingt sein, zum anderen durch den elektrischen Stimulationsreiz von circa 5 V, der die Muskelstreifen der slag length Gruppe zur Kontraktion brachte. Eine Ausnahme bildeten die Stressproteine Phospho- JNK- 2 und Phospho- p38, bei welchen die Proteinintensität in der Kontrollgruppe höher war als in der slag length Gruppe.

Die slag length Gruppe und die optimal stretch Gruppe (optimale Vordehnung für maximale Kraftentwicklung in einem Verhältnis Systole: Diastole = 2: 1) unterschieden sich in der Dehnung der Muskelstreifen. Es zeigte sich ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Intensitätsanstieg in der optimal stretch Gruppe bei p38 (Abb. 4, Diagramm 1) und Phospho- ERK1/2 (Abb. 5, Diagramm 2). Bei den anderen Proteinen kam es zu einem nur geringen Intensitätsanstieg oder zu gleich bleibenden Intensitäten. Ausnahme hier war die PKC, bei welcher es zu einer Abnahme von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe kam.

Abb. 4: p38 der Versuchsreihe 1; Western Blot bei 38 kD;
 ol=optimal stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 1: p38 der Versuchsreihe 1

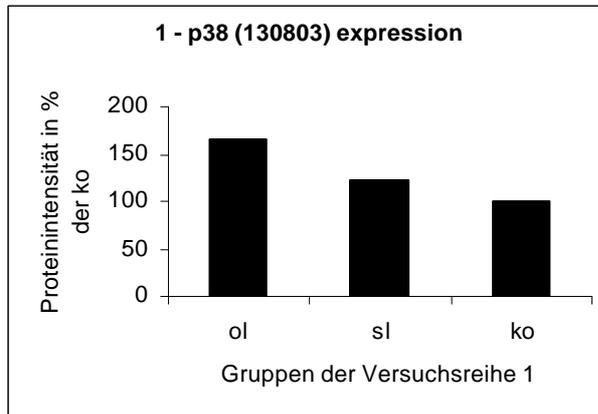
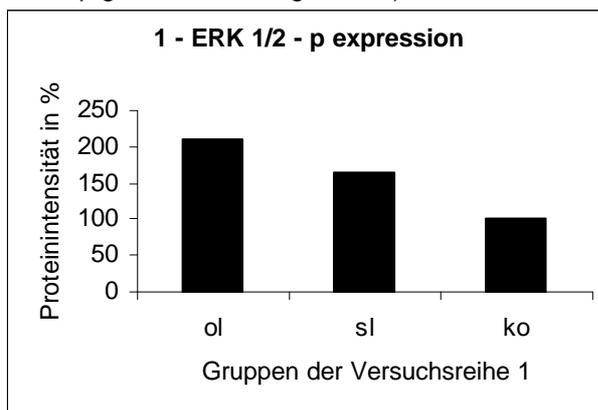


Abb. 5: ERK 1/2 - p der Versuchsreihe 1; Western Blot bei 44, 42 kD;
 ol=optimal stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 2: ERK 1/2 - p – Intensität der Versuchsreihe 1 (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)



Zusammenfassung zur Versuchsreihe 1:

Mit der Versuchsreihe 1 wurden die sehr schnell ansprechenden Signalkaskadenproteine untersucht. Dabei zeigte sich von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe, dass besonders bei den MAP- Kinasen Phospho- ERK1/2 und p38 die Dehnung zusätzlich zur elektrischen Stimulation einen wichtigen Reiz darstellt, der auch schon nach einer so geringen

Expositionszeit (10 Minuten) zu einer Hochregulierung bzw. Aktivierung dieser Proteine führte.

Die Signifikanzgröße von $> 50 \%$ wurde zwischen der slag length Gruppe und der optimal stretch Gruppe nicht erreicht.

3.1.2 Versuchsreihe 2 (30 min. Versuche; mit Stimulation; Kontrollgruppe, slag length Gruppe, optimal stretch Gruppe, over stretch Gruppe, TPA – Gruppe)

In der Versuchsreihe 2 kamen als neue Gruppen die over stretch Gruppe und die TPA - Gruppe hinzu. Mit Hilfe der over stretch Gruppe war es möglich, die Auswirkungen auf die Signaltransduktion zu analysieren, die durch unphysiologische Dehnung der Muskelfasern entstehen. So konnten die Dehnungseffekte im direkten Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen untersucht werden. Entscheidend dabei war besonders der Vergleich zwischen optimal stretch Gruppe und over stretch Gruppe, da es sich in der optimal stretch Gruppe um die experimentelle Nachahmung von Dehnungen handelte, die sich noch im physiologischen Bereich befanden, und die im Versuch den pathologischen Überdehnungen der over stretch Gruppe gegenübergestellt wurden. Die TPA– Gruppe (siehe 2.3.1) der Versuchsreihe 2 wurde gebildet, um zu sehen, inwieweit die Muskelstreifen durch das Phorbol– Ester aktiviert werden können. Die zunehmende Phosphoprotein- Signalintensität der TPA– Gruppe entsprach einer vermehrten Aktivierung von Phosphorylierungsprozessen. Mittels Western Blot war es entsprechend möglich das Aktivierungsvermögen durch Phosphorylierung und somit die Vitalität der Muskelstreifenpräparate zu zeigen.

Bei Phospho- ERK1/2 (Abb. 6, Diagramm 3), Phospho- p38 (Abb. 7, Diagramm 4), JNK-2 (Abb. 8, Diagramm 5) und der p70S6- Kinase (Abb. 9, Diagramm 6) stellte sich eine signifikante Zunahme von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe dar.

Abb. 6: Phospho-ERK1/2 der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 42, 44 kD;
 PMA=TPA-Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 3: Phospho-ERK1/2 – Intensität der Versuchsreihe 2 (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)

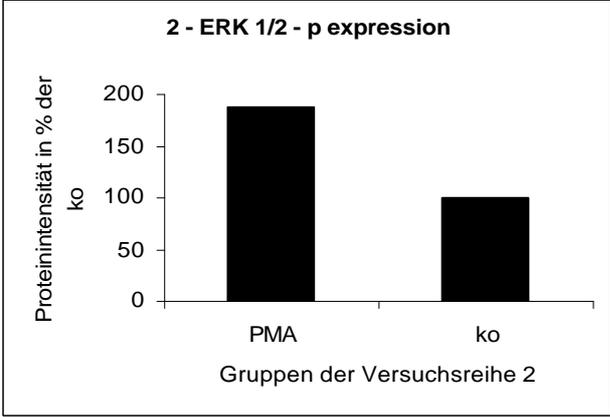


Abb. 7: Phospho-p38 der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 38 kD;
 PMA=TPA-Gruppe, ko=Kontrollgruppe

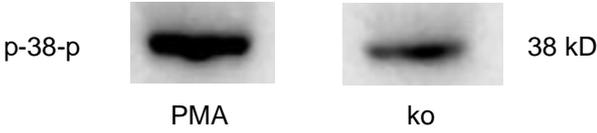


Diagramm 4: Phospho-p38 - Intensität der Versuchsreihe 2

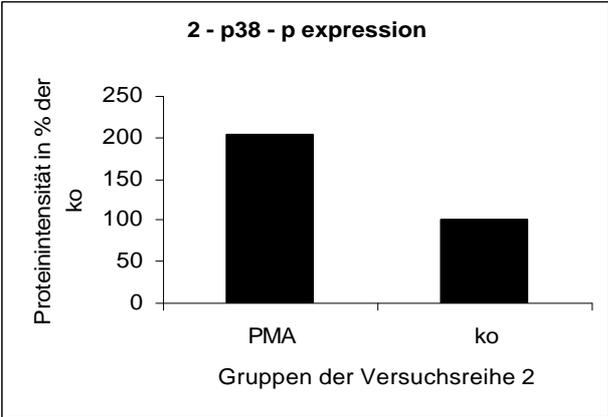


Abb. 8: JNK-2 der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 54 kD;
PMA=TPA-Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 5: JNK-2 – Intensität der Versuchsreihe 2

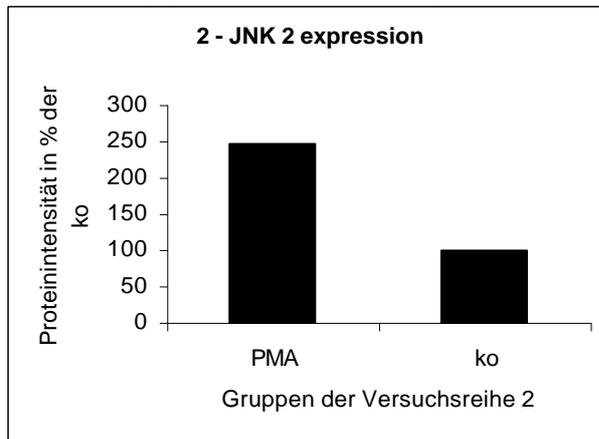


Abb. 9: p70S6 - Kinase der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 70 kD;
PMA=TPA – Gruppe, ko=Kontrollgruppe

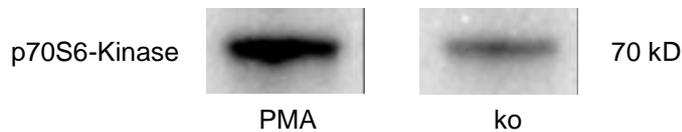
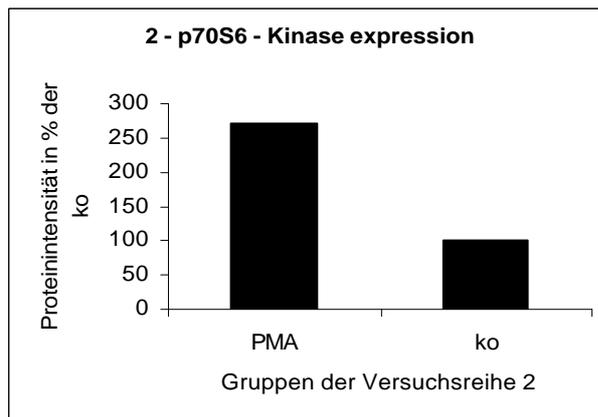


Diagramm 6: p70S6-Kinase – Intensität der Versuchsreihe 2

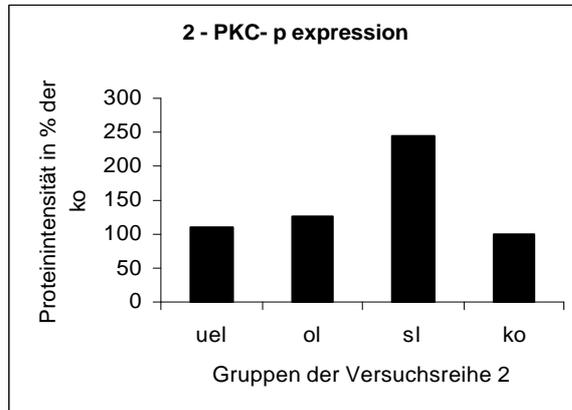


Die Phospho- PKC (Abb. 10, Diagramm 7) zeigte eine stark ausgeprägte, signifikante Aktivierung (2,4- fach) von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe, die allerdings im weiteren Vergleich von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe in ebenso ausgeprägter Weise wieder abnahm. Von der optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe lagen ungefähr gleiche Intensitäten vor.

Abb. 10: Phospho- PKC der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 80 kD;
 uel=over stretch Gruppe, ol=optimal stretch Gruppe,
 sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 7: Phospho- PKC der Versuchsreihe 2



Im Vergleich zwischen optimal stretch Gruppe und over stretch Gruppe stellte sich als ein zentrales Ergebnis eine nennenswerte Proteinzunahme bei der Phospho- p38 MAP- Kinase (Abb. 11, Diagramm 8) dar, die mit 73 % (bezogen von optimal stretch Gruppe=ol auf over stretch Gruppe=uel) signifikant war.

Abb. 11: Phospho-p38 der Versuchsreihe 2; Western Blot bei 38 kD;
 uel=over stretch Gruppe, ol=optimal stretch Gruppe, ko=Kontrollgruppe

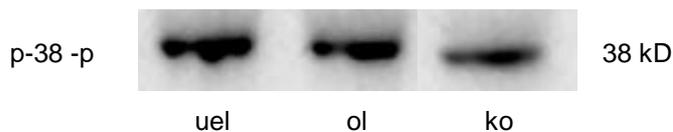
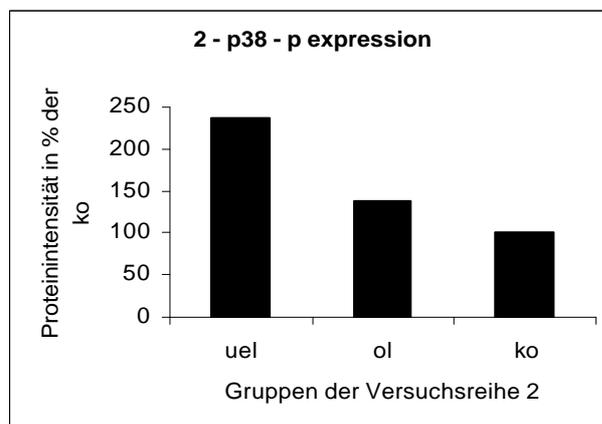


Diagramm 8: Phospho-p38 der Versuchsreihe 2



Zusammenfassung der Versuchsreihe 2:

In den 30–minütigen Versuchen der Versuchsreihe 2 stellte die signifikante Aktivierung von Phospho- p38 (Abb. 11, Diagramm 8) von der optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe den wichtigsten Befund dar. Die signifikante Intensitätszunahme von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe bei Phospho- ERK 1/2 (Abb. 6, Diagramm 3), Phospho- p38 (Abb. 7, Diagramm 4), JNK2 (Abb. 8, Diagramm 5) und p70S6 – Kinase (Abb. 9, Diagramm 6) zeigte zum einen, dass durch alleiniges Einwirken eines Phorbol– Esters die Phosphoproteine der Signalkaskade aktiviert werden können und zum anderen, dass die Muskelstreifen somit nach der Präparation noch vital waren und auf äußere Stimuli reagieren konnten.

3.1.3 Versuchsreihe 3 (60 min. Versuche; mit Stimulation; Kontrollgruppe, eingespannte Kontrollgruppe, slag length Gruppe, optimal stretch Gruppe, over stretch Gruppe, TPA – Gruppe)

In der Versuchsreihe 3 wurde zusätzlich zur bisherigen Kontrollgruppe (ko) eine zweite eingespannte Kontrollgruppe (ko2) eingesetzt. Unter der bisherigen Kontrollgruppe waren Muskelstreifen subsumiert, die vorsichtig aus dem rechten Herzohr herauspräpariert wurden, in Perfusionslösung in einer Petrischale für die Dauer eines Versuchs umspült wurden und schließlich in flüssigem Stickstoff schock gefroren wurden. Die Muskelstreifen der nun zusätzlichen Kontrollgruppe wurden ebenso, wie die Muskelstreifen der slag length Gruppe oder der over stretch Gruppe zwischen Kraftaufnehmer und Servomotor mittels Einspannklammern fixiert. Sie wurden dort für 60 Minuten belassen, allerdings ohne Dehnung und Stimulation, wurden mit Perfusionslösung umspült und nach den 60 Minuten in flüssigem Stickstoff schock gefroren. So konnten die mechanischen Einspannungsreize mit in die Kontrollgruppe aufgenommen werden. Die nun resultierenden Intensitätsunterschiede in der Densitometrie konnten klarer auf elektrische Stimulationsreize und mehr noch auf mechanische Dehnungsreize zurückgeführt werden. Es erfolgte auch in dieser Versuchsreihe wieder die Inkubation einiger Muskelstreifen über die Versuchszeit von 60 Minuten in TPA-haltiger- Lösung. Eine Aktivitätssteigerung in der TPA– Gruppe zeigte sich besonders bei Phospho- ERK 1/2 (Abb. 12, Diagramm 9) und Phospho- JNK2 (Abb. 13, Diagramm 10), wobei die Signifikanzgröße von 50 % im Bezug auf die Kontrollgruppe deutlich überschritten wurde.

Abb. 12: Phospho – ERK 1/2 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 44, 42 kD;
 PMA=TPA – Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 9: Phospho – ERK 1/2 – Intensität der Versuchsreihe 3 (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)

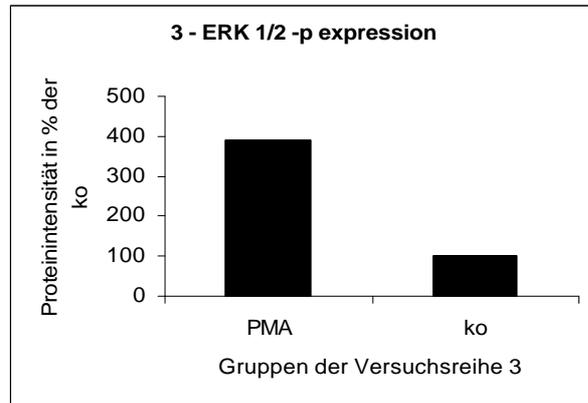


Abb. 13: Phospho – JNK2 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 54 kD;
 PMA=TPA-Gruppe, ko=Kontrollgruppe

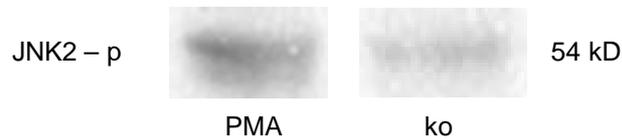
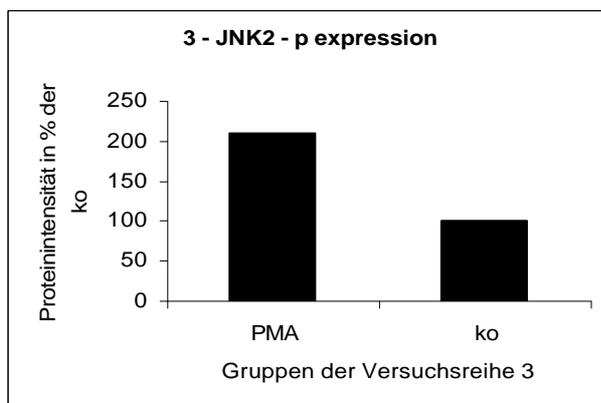


Diagramm 10: Phospho – JNK2 – Intensität der Versuchsreihe 3

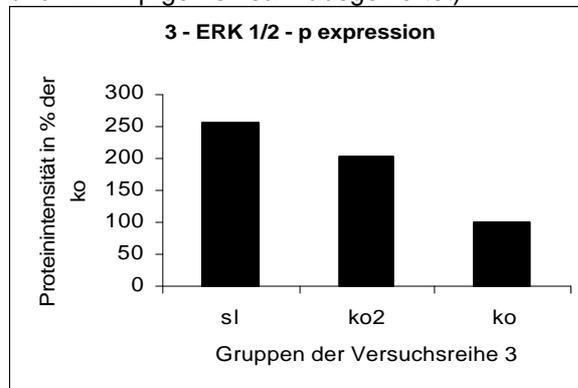


Die Phospho- ERKs 1/2 zeigten eine ausgeprägte Aktivitätszunahme von der Kontrollgruppe zur eingespannten Kontrollgruppe, wobei die Aktivierung im Weiteren von der eingespannten Kontrollgruppe zur slag length Gruppe nur noch in einem geringeren Ausmaß zunahm (Abb. 14; Diagramm 11).

Abb. 14: Phospho – ERK 1/2 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 44, 42 kD; sl=slag length Gruppe, ko2=eingespannte Kontrollgruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 11: Phospho – ERK 1/2 – Intensität der Versuchsreihe 3, (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)



Eine Intensitätszunahme von der eingespannten Kontrollgruppe zur slag length Gruppe zeigte sich am ausgeprägtesten bei Phospho- PKC (Abb. 15, Diagramm 12), aber auch bei Phospho-p38 (Abb. 16, Diagramm 13) war die Zunahme signifikant. Diese Aktivitätszunahme kann vermutlich nur durch den elektrischen Stimulationsreiz von 4 – 5 V und die dadurch erfolgte Muskelkontraktion der Muskelfasern der slag length Gruppe bedingt sein. Bei Phospho- PKC (Abb. 15, Diagramm 12) kam es im nachfolgenden Vergleich zwischen der slag length Gruppe und der optimal stretch Gruppe, wie auch schon in den 30- minütigen Versuchen der Versuchsreihe 2, zu einer signifikanten Intensitätsabnahme, die sich zur over stretch Gruppe noch deutlicher zeigte.

Abb. 15: Phospho – PKC der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 80 kD;
 uel=over stretch Gruppe, ol=optimal stretch Gruppe, sl=slag length
 Gruppe, ko2=eingespannte Kontrollgruppe, ko=Kontrollgruppe

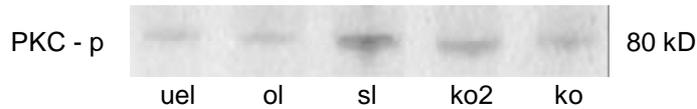


Diagramm 12: Phospho – PKC – Intensität der Versuchsreihe 3

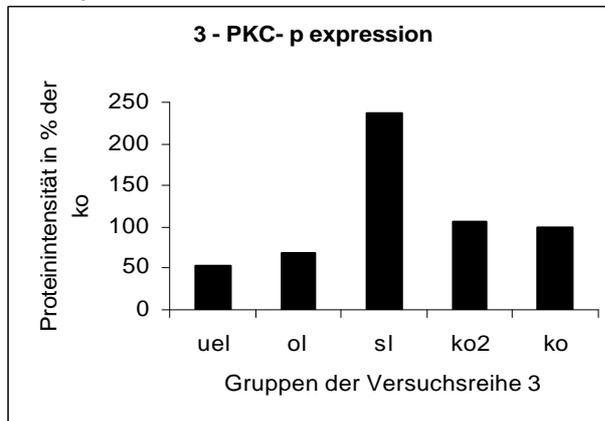
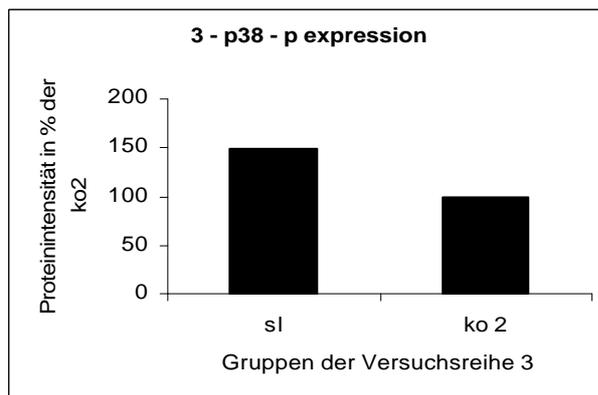


Abb. 16: Phospho - p38 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 38 kD;
 sl=slag length Gruppe, ko2=eingespannte Kontrollgruppe



Diagramm 13: Phospho - p38 - Intensität der Versuchsreihe 3



Im entscheidenden Vergleich zwischen optimal stretch Gruppe und over stretch Gruppe zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proteinintensität bei Phospho- ERK 1/2 (Abb. 17, Diagramm 14; Signifikanzgröße = 50 %) und eine nahezu signifikante Steigerung bei Phospho- p38 (Abb. 18, Diagramm 15; Signifikanzgröße = 47 %).

Abb. 17: Phospho – ERK 1/2 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 44, 42 kD;
 uel=over stretch Gruppe, ol=optimal stretch Gruppe,
 ko2=eingespannte Kontrollgruppe



Diagramm 14: Phospho – ERK 1/2 – Intensität der Versuchsreihe 3, (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)

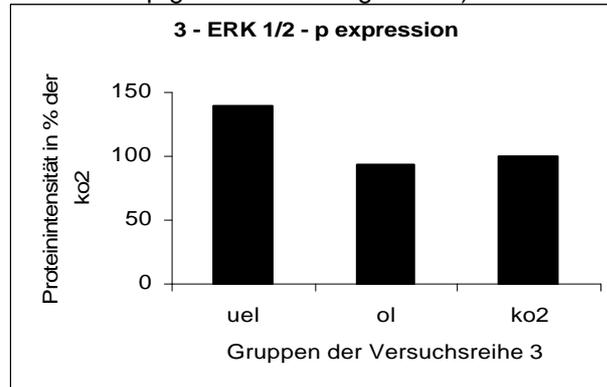


Abb. 18: Phospho - p38 der Versuchsreihe 3; Western Blot bei 38 kD;
 uel=over stretch Gruppe, ol=optimal stretch Gruppe,
 ko2=eingespannte Kontrollgruppe

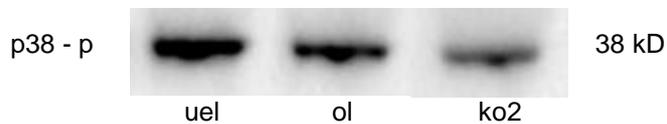
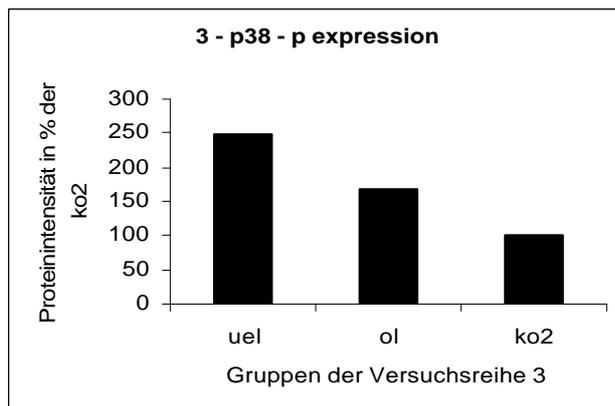


Diagramm 15: Phospho - p38 - Intensität der Versuchsreihe 3



Zusammenfassung der Versuchsreihe 3:

Die relevanten Resultate der Versuchsreihe 3 bildeten die signifikante Aktivitätssteigerung bei Phospho- ERK 1/2 (Abb. 17, Diagramm 14) und die deutliche Zunahme bei Phospho- p38 (Abb. 18, Diagramm 15) von der optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe. Da die Muskelstreifen beider Gruppen elektrisch stimuliert wurden und Kontraktionen in der

Frequenz von 1 Hz zeigten, ist als objektives Unterscheidungskriterium nur der Dehnungsgrad zu betrachten.

3.1.4 Versuchsreihe 4 (30 min. Versuche; ohne Stimulation; Kontrollgruppe, slag length Gruppe, over stretch Gruppe)

In der Versuchsreihe 4 wurden die Auswirkungen eines starken mechanischen Dehnungsreizes über 30 Minuten auf die Signaltransduktion im humanen Herzmuskelgewebe untersucht, ohne die Verwendung von elektrischer Stimulation. Es wurde, wie in den bisherigen Versuchsreihen auch, eine Kontrollgruppe gebildet. Diese beinhaltete Muskelstreifen, die nach der Präparation parallel zu den mechanischen Versuchen in einer auf Eis gekühlten Petrischale in begaster KHS- Lösung gelagert wurden und die dann nach 30 Minuten in flüssigem Stickstoff schock gefroren wurden. Der Unterschied zu den Muskelstreifenpräparaten der slag length Gruppe dieser Versuchsreihe bestand nun allerdings nur aus dem mechanischen Einspannungsreiz und der 30- minütigen Fixierung in ungedehntem Zustand. Eine elektrische Stimulation erfolgte nicht. Einige der untersuchten Signalkaskadenproteine reagierten sehr stark auf diese mechanischen Einspannungs- und Fixierungsreize. So kam es bei Phospho- ERK 1/2 (Abb. 19, Diagramm 16), PKC (Abb. 20, Diagramm 17) und p38 (Abb. 21, Diagramm 18) zu einer signifikanten Zunahme von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe. Der starke Überdehnungsreiz in der over stretch Gruppe zeigte bei diesen Proteinen dann allerdings keine weiteren Auswirkungen auf ihre Expression.

Abb. 19: ERK 1/2 - p der Versuchsreihe 4; Western Blot bei 44, 42 kD;
 uel=over stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 16: ERK 1/2 - p – Intensität der Versuchsreihe 4 (ERK1-p und ERK2-p gemeinsam ausgewertet)

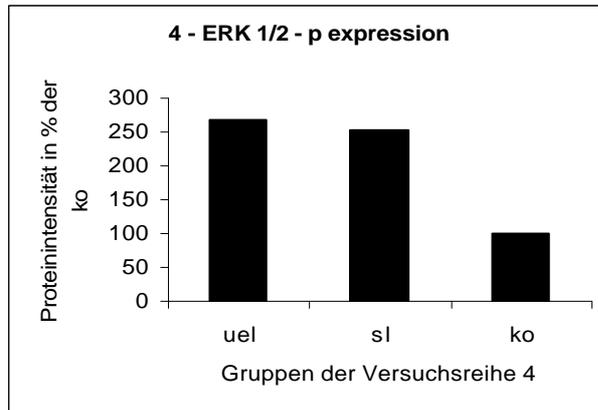


Abb. 20: PKC der Versuchsreihe 4; Western Blot - Ausschnitt bei 80 kD;
 uel=over stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 17: PKC – Intensität der Versuchsreihe 4

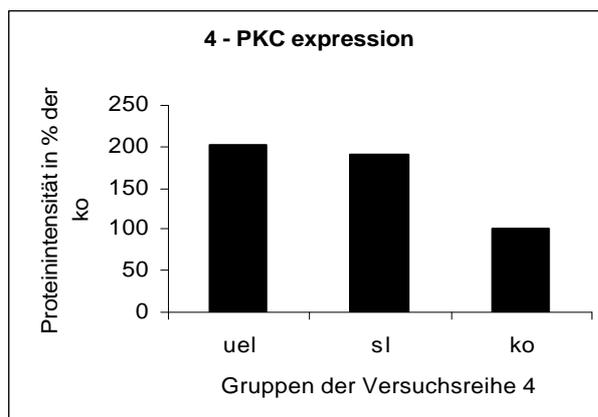


Abb. 21: p38 der Versuchsreihe 4; Western Blot bei 38 kD;
 uel=over stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe

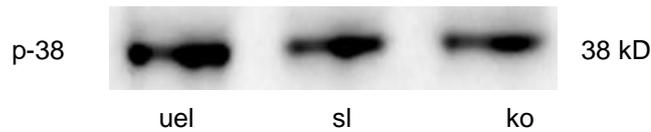
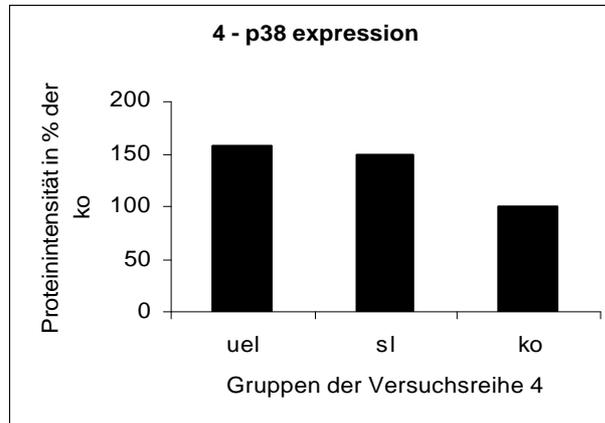


Diagramm 18: p38 der Versuchsreihe 4

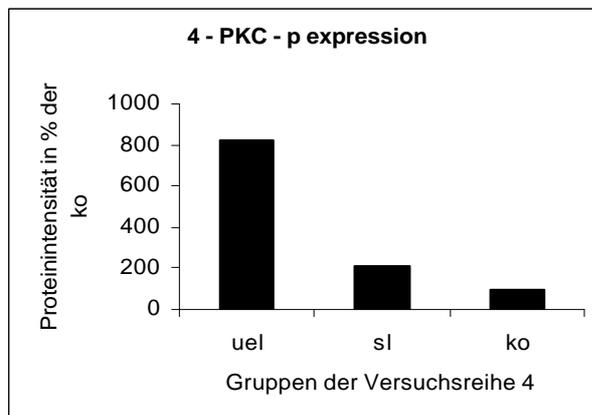


Als Maß für die Überdehnung wurde die doppelte Ausgangslänge der Herzmuskelstreifen gewählt. Ein Ansprechen der Muskelstreifen auf den starken Überdehnungsreiz zeigte sich in einer Steigerung der Proteinintensität von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe im Western Blot. Eine signifikante Steigerung war bei Phospho- PKC (Abb. 22, Diagramm 19) zu sehen.

Abb. 22: PKC - p der Versuchsreihe 4; Western Blot - Ausschnitt bei 80 kD;
 uel=over stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe, ko=Kontrollgruppe



Diagramm 19: PKC - p – Intensität der Versuchsreihe 4



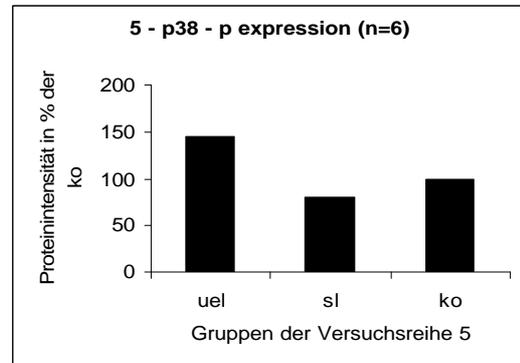
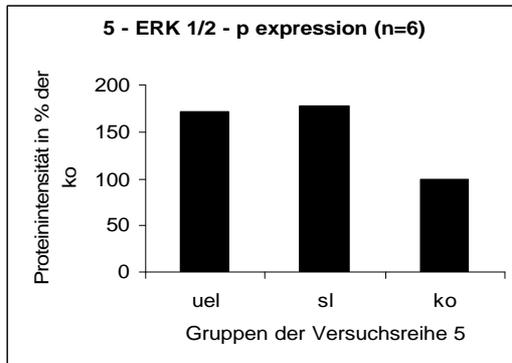
Zusammenfassung der Versuchsreihe 4:

Das bedeutendste Ergebnis der Versuchsreihe 4 spiegelt die Proteinintensitätssteigerung der Phospho- PKC (Abb. 22, Diagramm 19) von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe wider. Da in der Versuchsreihe 4 auf elektrische Stimulation verzichtet wurde, ist diese Aktivitätszunahme wahrscheinlich ausschließlich auf die pathologische Überdehnung der Muskelstreifen zurückzuführen.

3.1.5 Versuchsreihe 5 (30 min. Versuche; mit Stimulation; Kontrollgruppe, slag length Gruppe, over stretch Gruppe)

Die Muskelstreifenpräparate der slag length Gruppe und der over stretch Gruppe wurden durch elektrische Stimulation zur Kontraktion gebracht und die Überdehnung in der over stretch Gruppe wurde wiederum festgelegt auf die doppelte Ausgangslänge der Muskelstreifen. In der Versuchsreihe 5 wurden im Gegensatz zu den bisherigen Versuchsreihen, in denen 9 – 11 Muskelstreifen (von verschiedenen Herzohren) pro Gruppe nötig waren, ungepoolte Proben verwendet. Das bedeutet, dass pro Gruppe (Kontrollgruppe, slag length, Gruppe, over stretch Gruppe) jeweils nur ein Muskelstreifen mittels Western Blot ausgewertet wurde. Eine komplette Reihe bestehend aus einem Kontroll- Muskelstreifen, einem slag length Muskelstreifen und einem over stretch Muskelstreifen wurde aus jeweils einem Herzohr gewonnen und stammte somit von nur einem Patienten. Um statistisch auswertbare Daten zu erhalten, wurde die komplette Versuchsreihe jeweils sechsmal durchgeführt und die Ergebnisse wurden im Anschluss gemittelt. Insgesamt wurde für die sechs Durchläufe der Versuchsreihe 5, Material aus sechs Herzohren und von somit sechs Patienten verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte in dieser Versuchsreihe mit dem RIPA-Aufschlußpuffer. Die Signalproteine ERK 1/2, Phospho- ERK 1/2, p38 und Phospho- p38 wurden mittels Mann- Whitney U- Test ausgewertet. Als relevante Intensitätsunterschiede zeigte sich zum einen, eine deutliche Aktivitätszunahme bei Phospho- ERK 1/2 (Diagramm 20) von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe, die hier vermutlich auf Einspannungs- oder Stimulationsreize zurückzuführen ist. Zum anderen kam es bei Phospho- p38 (Diagramm 21) zu einer bemerkenswerten Phosphorylierungssteigerung von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe. Ursächlich für diese Zunahme der Proteinintensität ist vermutlich der starke Dehnungsreiz. Im Mann- Whitney U- Test ergab sich ein signifikanter Unterschied von $p = 0,0038$ ($p < 0,05$).

Diagramm 20 und 21: Auswertung der densitometrischen Werte für Phospho- ERK 1/2
 (ERK1-p und ERK2-p zusammen ausgewertet) und Phospho- p38;
 uel=over stretch Gruppe, sl=slag length Gruppe,
 ko=Kontrollgruppe

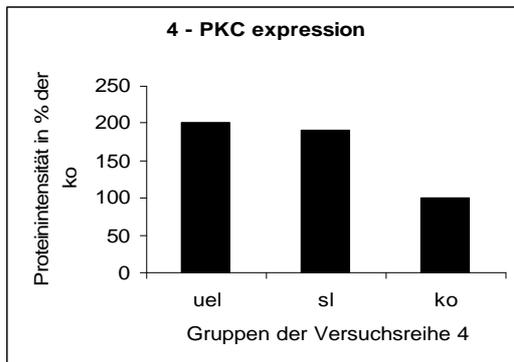


Zusammenfassung der Versuchsreihe 5:

Die wichtigste Feststellung der Versuchsreihe 5 war die signifikante Phosphorylierungszunahme des Stressproteins Phospho- p38 von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe, die vermutlich durch den starken Dehnungsreiz in der over stretch Gruppe bedingt war.

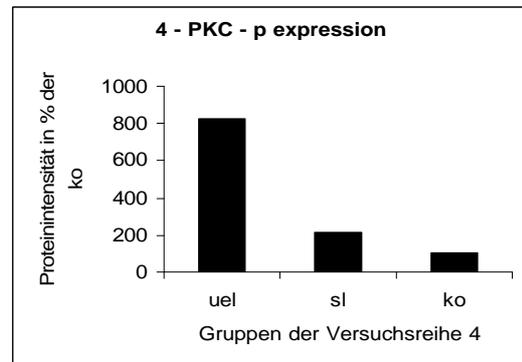
3.2 Zusammenfassung der wichtigsten Diagramme auf einem Blick

PKC:

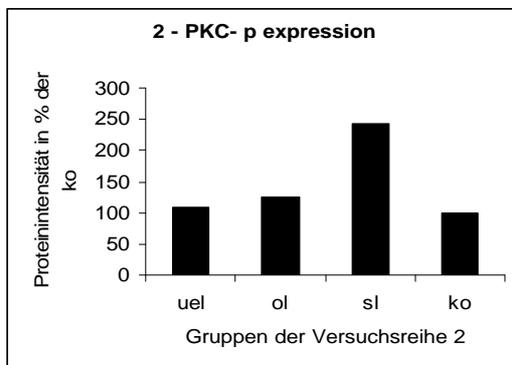


(30- minütige Versuche, ohne Stimulation)

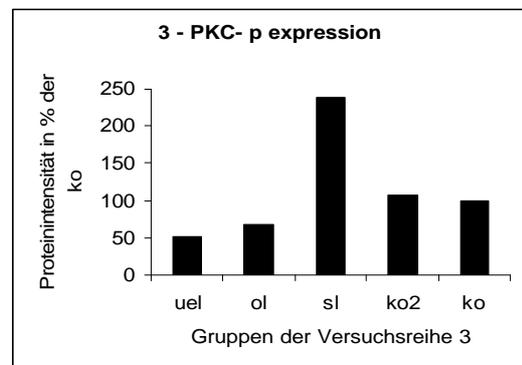
Phospho – PKC:



(30- minütige Versuche, ohne Stimulation)

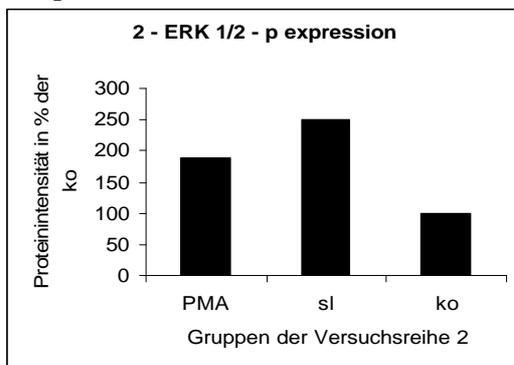


(30- minütige Versuche, mit Stimulation)

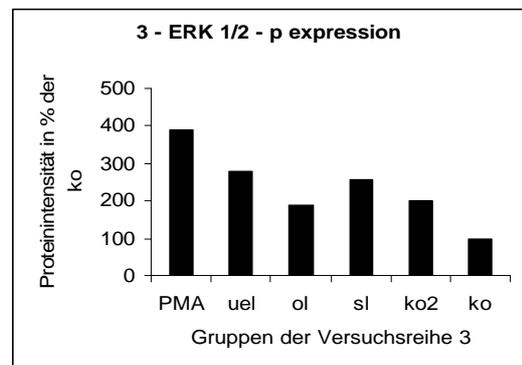


(60- minütige Versuche, mit Stimulation)

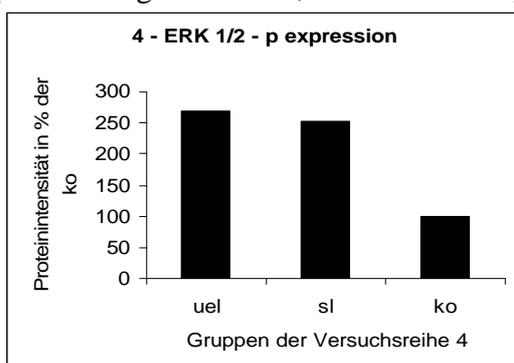
Phospho - ERK 1/2:



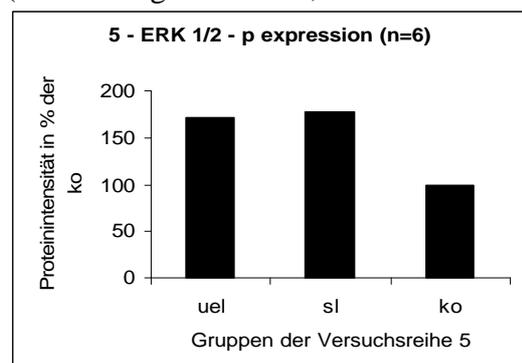
(30- minütige Versuche, mit Stimulation)



(60- minütige Versuche, mit Stimulation)

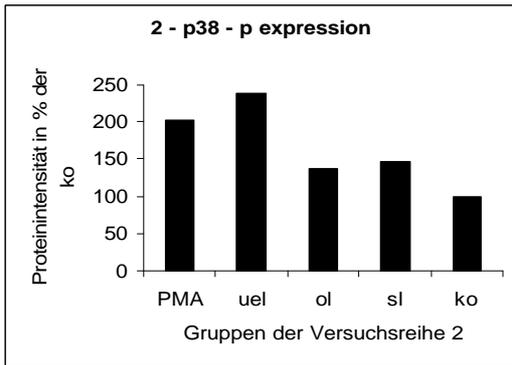


(30- minütige Versuche, ohne Stimulation)

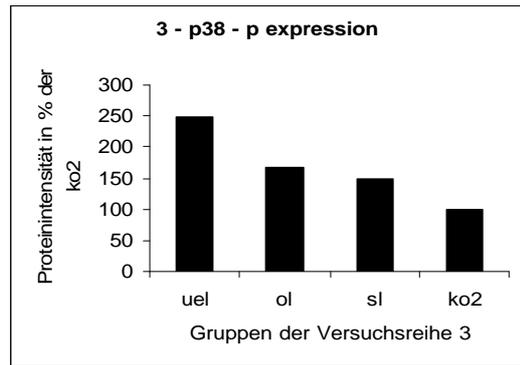


(30- minütige Versuche, mit Stimulation)

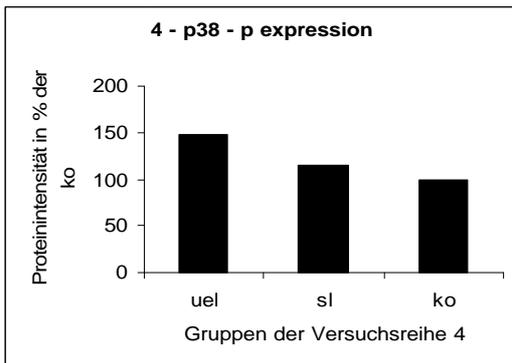
Phospho - p38:



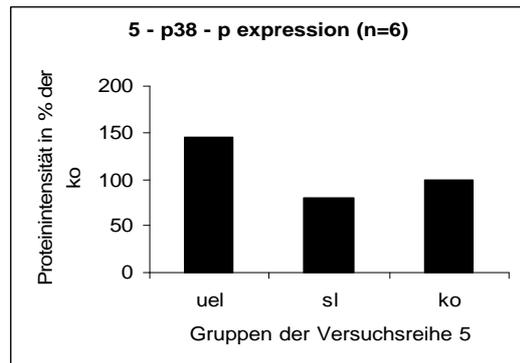
(30- minütige Versuche, mit Stimulation)



(60- minütige Versuche, mit Stimulation)

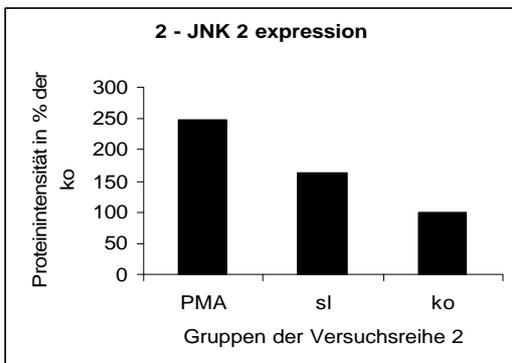


(30- minütige Versuche, ohne Stimulation)



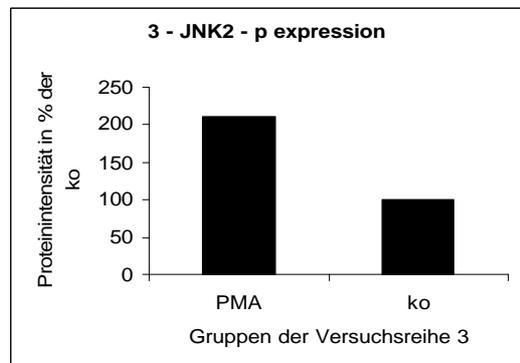
(30- minütige Versuche, mit Stimulation)

JNK 2:



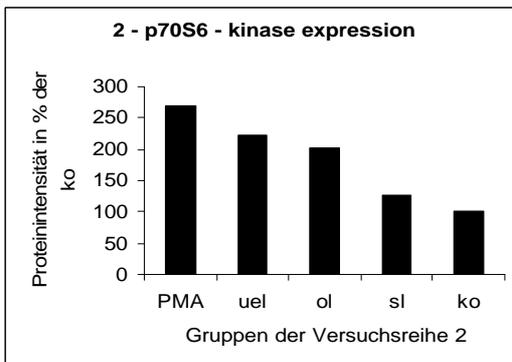
(30- minütige Versuche, mit Stimulation)

Phospho – JNK 2:

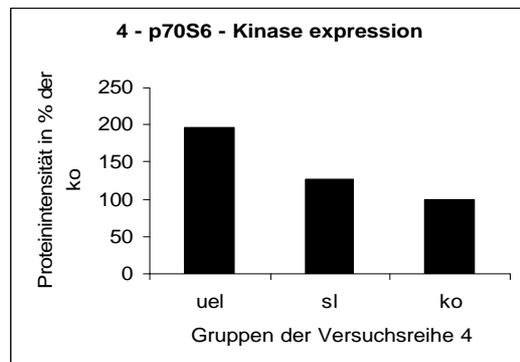


(60- minütige Versuche, mit Stimulation)

p70S6 Kinase:



(30- minütige Versuche, mit Stimulation)



(30- minütige Versuche, ohne Stimulation)

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Humanes kardiales Gewebe versus Kardiomyozyten – Zellkulturen

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die meisten der in dieser Arbeit zitierten Forschungsgruppen mit Zellkulturen isolierter Kardiomyozyten arbeiteten. Jedoch sind die zwei-dimensionalen Zellkulturen nur bedingt vergleichbar mit den in vitalen Geweben vorherrschenden dreidimensionalen Zellnetzwerken. Dort sind die Kardiomyozyten eingebettet in die extrazelluläre Matrix und sowohl miteinander als auch mit Endothelzellen und Fibroblasten vernetzt (Lammerding et al. 1999 [47]). Umso wichtiger erscheint es nun, dass erstmals am humanen Herzmuskelgewebe die durch Dehnung hervorgerufenen Veränderungen untersucht werden. Das dafür gewählte Modell der isolierten intakten Muskelfaser erwies sich als geeignet, um die Dehnungen sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Bereich zu erzeugen und bildete somit die Voraussetzung für die weiterführenden biochemischen Untersuchungen. Entscheidend war auch, dass für die Versuche intakte Gewebestreifen verwendet wurden, in denen jenes beschriebene Zellnetzwerk zu finden war. Yamazaki et al. beschrieben im Jahre 1995, dass eine Interaktion zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (Fibroblasten, Endothelzellen, extrazelluläre Matrix) für die durch mechanischen Stress induzierte Herzhypertrophie verantwortlich ist (Yamazaki et al. 1995 [48]). Die erwähnten Interaktionen zwischen den Zellen bestehen zum einen als mechanische Interaktionen durch sogenannte „gap junctions“ bzw. als chemische Interaktionen durch Transmitterstoffe. Es liegt bis dato noch keine Veröffentlichung über ähnliche Versuche am humanen Herzmuskelgewebe vor.

4.1.2 Das Modell der isolierten intakten Muskelfaser

Um den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe zu ermöglichen, war es von entscheidender Bedeutung ein geeignetes Modell zu verwenden, welches bezüglich der wesentlichen Determinanten (Vorlast, Nachlast, Frequenz) standardisierte Versuchsdurchführungen zuließ. Das Modell der isolierten Muskelfaser erfüllte diese Ansprüche. Stimulationsfrequenz, Vordehnung, Umgebungsmedium und Umgebungstemperatur konnten dabei genau definiert werden. Auf Grund der geringen Myokardmenge, die bei dem Modell der isolierten, intakten Myokardfaser benötigt wurde,

bestand die Möglichkeit humanes Myokard direkt und unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

4.1.3 Präparation und Protektion der Myokardpräparate

Bei jeder Präparation von Muskelfasern kommt es zu Schädigungen der Muskelfasern, die zum einen rein durch das mechanische Trauma der Präparation bedingt sind, und zum anderen auf der Länge der Ischämiezeit beruhen, der die Kardiomyozyten ausgesetzt sind. Um das „cutting-injury“ so gering wie möglich zu halten, wurden die Herzmuskelstreifen mit einer mikrochirurgischen Schere in Muskelfaserrichtung mit einem einzigen Schnitt aus dem Herzgewebe herausgetrennt. Zur Verlängerung der Ischämietoleranz befanden sich die Muskelstreifen während und nach der Präparation in gekühlter Konservierungslösung, welcher zuvor 2,3 Butanedione- Monoxime (BDM) zugesetzt worden war (Mulieri et al. 1989 [40], Kiriazis et al. 1995 [49], siehe Methoden 2.1.2.2). Die Muskelfasern der fünf Versuchsreihen wurden identisch behandelt. Zudem wurde in den Versuchsreihen eins bis vier mit gepoolten Proben gearbeitet, was bedeutet, dass 9 – 11 einzeln isolierte, intakte Muskelfasern zu einer Gruppe zusammengefügt wurden und eine Probe bildeten. Daher scheint es kaum wahrscheinlich, dass die Unterschiede in der Proteinexpression und im Phosphorylierungsgrad zwischen den einzelnen Gruppen der Versuchsreihen durch die jeweils gleichermaßen aufgetretenen mechanischen Schädigungen erklärbar wären.

4.1.4 Verlängerung der Ischämietoleranz mittels 2,3 Butanedione-Monoxime (BDM)

Die Substanz 2,3 Butanedione- Monoxime (BDM) wurde als protektives Agens während des Transports und während und nach der Präparation verwendet. Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen (Stowe et al. 1996[50]; Koyama et al. 1996[51]; Lopukhin et al. 1996 [52]; Fagbemi et al. 1995[53]; G. Bauza et al. 1995 [54]; T. Kivisto et al. 1995 [55]; S. Hebisch et al. 1993 [56]) eine Verlängerung der Ischämietoleranz durch den Zusatz von BDM beschrieben. Zusätzlich zu einem positiven Effekt auf die Ischämietoleranz konnte die durch die Präparation der Herzmuskelstreifen gesetzte Verletzung der einzelnen Gewebsfasern, ein „cutting injury“, durch Verwendung von BDM deutlich reduziert werden (Mulieri et al. 1989 [40]; Kiriazis et al. 1995 [49]). Die mechanische Wirkung von BDM ist nach dem Auswaschen durch Krebs- Henseleit- Lösung binnen Sekunden komplett reversibel (Vahl et al. 1994 [38]).

4.1.5 Längenbestimmung der intakten Muskelfaserpräparate

Als optimale Länge L_{max} der optimal stretch Gruppe (ol) galt jene Muskellänge, bei der das Muskelpräparat eine maximale Kraftamplitude entwickelte. So wurde sichergestellt, dass die Versuche der Muskelstreifen der optimal stretch Gruppe alle auf einem ähnlichen Vorlast-Kraft- Niveau stattfanden. Dadurch wurden die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen der optimal stretch Gruppe und den anderen Gruppen einer Versuchsreihe zu einem großen Teil durch das optimale Vorlast- Kraft- Niveau erklärlich.

Um gleichwertige Bedingungen für die Muskelstreifen der over stretch Gruppen zu erzielen, wurde die Länge der Muskelstreifen als doppelte Ausgangslänge definiert. Dabei wirkten supraphysiologische Zugkräfte auf die Muskelfasern und die Kraftamplitude nahm ab.

4.1.6 Neuerungen in der Versuchsreihe 5

In den Versuchsreihen 1-4 wurde mit gepoolten Proben gearbeitet. Das war nötig, da die zu Anfang der Versuche gewählte Probenaufbereitungsmethode ein bestimmtes Gewicht an Probensuspension vorsah, welches nur durch ein gemeinsames Vorbereiten von 9-11 humanen Muskelstreifenpräparaten erreicht werden konnte. Aus einem Herzohr (entspricht dem zur Verfügung stehenden Material eines Patienten) konnten meistens nur vier bis fünf intakte Muskelstreifenpräparate isoliert werden und von denen gingen wiederum nur circa drei in die Gruppen der Versuchsreihen ein, da nicht bei jedem Muskelstreifen eine Kontraktion ausgelöst werden konnte. Daher war es von Nöten, die Muskelstreifen aus mehreren Herzohren zu poolen. Pro Gruppe wurde das Material aus mindestens drei bis vier Herzohren verwendet. Der Gebrauch von gepoolten Proben und die damit verbundene nur einmalige Durchführung der Western Blot Analysen machte eine statistische Auswertung nach bekannten Methoden unmöglich. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit des initialen Versuchsprotokolls betraf die Probenvorbereitung und Homogenisierung der Muskelstreifen, welche in den Versuchsreihen 1-4 mit kochendem 1xSDS ohne zusätzlichen Einsatz von Inhibitoren erfolgte.

Durch intensives Nachforschen in der Literatur nach neueren und effektiveren Verfahren zur Probenaufbereitung wurde eine Methode gefunden, die geringe Muskelmassen benötigte, um eine ausreichende Menge an Probe zu erhalten. Diese Neuerung machte ein ungepooltes Vorgehen möglich. Da nun ein Muskelstreifen pro Gruppe genügte, konnte die Versuchsreihe bestehend aus Kontrollgruppe, slag length Gruppe und over stretch Gruppe mit denen aus

einem Herzohr und somit von nur einem Patienten gewonnenen Muskelstreifen abgedeckt werden. Die Versuchsreihe 5 wurde insgesamt sechsmal durchgeführt und bei jedem dieser Durchgänge wurde Vorhofgewebe nur eines Patienten verwendet. Es wurde somit eine Anzahl von sechs kompletten Durchgängen der Versuchsreihe 5 erreicht (entspricht n=6 Patienten), die nun die Möglichkeit einer statistischen Auswertung bot.

Die neu gewählte Probenaufbereitungsmethode mittels RIPA- Puffer sah auch gleichsam die Verwendung von Inhibitoren vor. Nachdem in der Versuchsreihe 5 eine Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte, wurden in der SDS Polyacrylamidgelelektrophorese nun nachweislich exakt gleiche Mengen an Protein pro Geltasche geladen.

Die in den Versuchsreihen 1 bis 4 verwendete suboptimale Probenvorbereitungsmethode wurde in der Versuchsreihe 5 auf beschriebene Art und Weise optimiert und der schon initial gefundene Effekt bezüglich der Aktivierung der p38 MAP- Kinase konnte so mit der optimierten Methodik nochmals bestätigt werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die mechanische Überladung des Herzens, ob nun ausgelöst durch Drucksteigerung z.B. im Rahmen einer arteriellen Hypertonie oder einer Aortenklappenstenose oder durch Volumenbelastung z.B. bedingt durch eine Herzinsuffizienz, bildet einen Hauptauslöser der Herzhypertrophie, und mechanische Dehnung an sich gilt als ein kausaler Faktor für die Hypertrophie (Yamazaki et al. 2000 [6]). Generell führt mechanischer Stress zu einer Aktivierung multipler intrazellulärer second messenger Systeme, welche verschiedene Proteinkinaskaskaden und auch die Familie der MAP- Kinasen mit einbezieht (Sadoshima et al. 1997 [57]). Die durch mechanische Dehnung und häufig unter Einfluss von Angiotensin II induzierten Signaltransduktionswege findet man jedoch sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten. Die Aktivierung der Proteinkinasen erfolgt in Kardiomyozyten und Fibroblasten allerdings über unterschiedliche Signalwege, die über die vermehrte Expression spezifischer Gene (Transkription) in der Entstehung der Herzhypertrophie und zusätzlich auch in der Fibroblasten-Proliferation münden (Yamazaki et al. 2000 [6]). Ein weiterer erwähnenswerter Effekt der mechanischen Dehnung ist die Steigerung der Proteinsynthese (Translation), die höchstwahrscheinlich auf eine Aktivierung der p70S6 – Kinase zurückgeführt werden kann (Chung et al. 1992 [58]).

Durch mechanische Dehnung kommt es primär zur Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionwege, welche dann sekundär zu Veränderungen in der Genexpression

führen. Damit verbunden ist zu einem frühen Zeitpunkt die Aktivierung der „immediate early genes“ c-fos, c-myc und c-jun (Komuro et al. 1990 [59]; Sadoshima et al. 1992 [60]). Bei den „immediate early genes“ handelt es sich um Transkriptionsfaktoren (z.B. Protooncogene, wie c-jun, c-myc und c-fos oder Hitzeschockproteine, wie Hsp 25/27), die durch mechanische Dehnung aktiviert, zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren oder zur vermehrten Expression spezifischer Gene führen (Sugden and Clerk 1998 [15]). Etwas später kommt es dann zur Aktivierung fetaler Formen von sarkomerischen Proteinen, wie z.B. skeletal α -Aktin (anstelle von kardialem α -Aktin) und β -Myosin schwere Ketten (β -MHC anstelle von α -MHC) und zur Reexpression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) (Chien et al. 1993 [61]; Izumo et al. 1988 [62]; Komuro et al. 1993 [63]; Morgan et al. 1991 [64]). Da dieses durch Dehnung induzierte Expressionsmuster der „immediate early genes“ und der fetalen Proteine in ähnlicher Ausprägung auch bei der Entstehung der Hypertrophie beobachtet wurde, wurde vermutet, dass die mechanische Dehnung von Kardiomyozyten an der Induktion der Herzhypertrophie beteiligt ist (Sadoshima et al. 1992 [60]; Izumo et al. 1988 [62]).

Wie man dem Ergebnisteil entnehmen kann, führt die Dehnung humaner Herzmuskelstreifen in Abhängigkeit von der Dehnungsdauer, der Dehnungsstärke und einer eventuell zusätzlich vorhandenen elektrischen Stimulation zu ausgeprägten Unterschieden in der Aktivierung und Phosphorylierung der untersuchten Proteinkinasen. Eine wichtige Erkenntnis der vorliegenden Arbeit bildet die Aktivierung der p38 MAP- Kinase, die sich als außerordentlich dehnungsabhängig erwies.

4.2.1 Erläuterungen zu Unterschieden im Vergleich der einzelnen Gruppen einer Versuchsreihe untereinander

Im Folgenden werden die in den Versuchsreihen bezüglich des Phosphorylierungsmusters aufgetretenen signifikanten Intensitätsunterschiede diskutiert.

Die Kontrollgruppe und die slag length Gruppe unterschieden sich vor allem durch mechanischen Stress, der in der slag length Gruppe auf drei mögliche Hauptursachen zurückzuführen war. Zum einen der Einspannungsreiz der Herzmuskelstreifen zwischen Servomotor und Kraftaufnehmer und deren Fixierung mittels Feinklemmen. Zum zweiten die Auswirkungen des physikalischen Stresses verursacht durch die elektrische Stimulation und zum dritten, die mit der elektrischen Stimulation einhergehenden Veränderungen

(Querbrückenaktivität, Ionenströme, Energieverbrauch), die zur Auslösung von Muskelkontraktionen der humanen Muskelstreifenpräparate führten.

In der Versuchsreihe 3, den 60-minütigen Versuchen wurde als zweite Kontrollinstanz die eingespannte Kontrollgruppe gebildet. Die Unterschiede zwischen dieser eingespannten Kontrollgruppe und der slag length Gruppe können nun nicht mehr auf den Einspannungs-, bzw. Fixierungsreiz zurückgeführt werden, da dieses Merkmal bei beiden Gruppen gleichermaßen vorhanden war. Allerdings bleiben als mögliche Ursachen der Intensitätsunterschiede die elektrische Stimulation und die Muskelkontraktion erhalten.

Für Aktivitätsunterschiede zwischen der slag length Gruppe und der optimal stretch Gruppe sind als mögliche Auslöser die passive Dehnung der Muskelstreifen der optimal stretch Gruppe und die dabei entwickelte isometrische Kraft zu beachten.

In den Versuchsreihen 4 und 5 existierte keine optimal stretch Gruppe, daher wurde die slag length Gruppe direkt mit der over stretch Gruppe verglichen. Beobachtete Aktivitätsunterschiede zwischen diesen beiden Gruppen könnte man auf den in der over stretch Gruppe vorhandenen unphysiologischen, starken Überdehnungsreiz und möglicherweise noch auf eine im Vergleich zur slag length Gruppe bestehende isometrische Kraftänderung zurückführen.

Für die Untersuchung von Hypertrophiesignalwegen unter supraphysiologischer Dehnung ist besonders der Vergleich zwischen optimal stretch Gruppe und over stretch Gruppe in den Versuchsreihen 2 und 3 von Bedeutung. Dabei wurde die noch im physiologischen Bereich befindliche Dehnung der optimal stretch Gruppe dem pathologischen Überdehnungsreiz in der over stretch Gruppe gegenübergestellt.

Als letzter möglicher Vergleich bleibt jener zwischen Kontrollgruppe und TPA- Gruppe übrig, wobei als einzig relevantes Unterscheidungsmerkmal das Phorbol- Ester an sich in der TPA- Gruppe gilt.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Proteinkinasen noch einmal genau eingegangen.

4.2.2 Proteinkinase C (PKC)

Die PKC zeigte in der Versuchsreihe 4 (ohne Stimulation) eine signifikante Intensitätszunahme von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe (Abb. 20, Diagramm 17).

Erwähnenswerte Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der Phospho- PKC waren in den Versuchsreihen 2, 3 und 4 zu verzeichnen. In der Versuchsreihe 2 nach 30 Minuten kam es zu einem deutlichen Phosphorylierungsanstieg von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe

(Abb. 10, Diagramm 7). Von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe nahm die Intensität allerdings umso stärker wieder ab. Diese Intensitätsausprägung spiegelte sich in nahezu identischer Form in den 60- minütigen Versuchen der Versuchsreihe 3 (Abb. 14, Diagramm 11) wider. Ein völlig gegensätzliches Phosphorylierungsmuster bildete sich jedoch in der Versuchsreihe 4 ab. In der Versuchsreihe 4 wurde nur der Einfluss der Dehnung untersucht ohne elektrische Stimulation. Dabei zeigte sich eine signifikante Intensitätszunahme von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe (Abb. 22, Diagramm 19).

Die Proteinkinase C gehört zu einer Familie von Serin/ Threonin- Kinasen, die an diversen intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt ist und u.a. entscheidenden Einfluss auf die Proliferation, die Differenzierung und die Anordnung des Zytoskeletts in der Zelle nimmt (Nishizuka, 1992 [65]; Keenan et al. 1998 [66]). Die PKC- Isoformen werden in vier Untergruppen unterteilt: die klassischen (classic/conventional) PKCs (cPKCs = α , β I, β II und γ), die neuen (novel) PKCs (nPKCs = δ , ϵ , ζ und η), die atypischen (atypical) PKCs (aPKCs = θ , ι und κ) und die PKC- verwandten (related) Kinasen (PRKs) (Mellor et al. 1998 [67]). In den Kardiomyozyten konnten jeweils Isoformen der klassischen, der neuen und der atypischen PKC- Untergruppen identifiziert werden (Mackay et al. 2001 [25]). Seko et al. zeigten 1999, dass die Proteinkinase C an der Aktivierung der ERKs und in dessen Folge auch an der Entstehung der durch mechanische Dehnung hervorgerufenen Herzhypertrophie mitbeteiligt ist (Seko et al. 1999 [68]). Clerk und Sugden beschrieben im Jahre 2001, dass durch die nPKC δ und die nPKC ϵ die MAP- Kinasen aktiviert werden. Besonders hervorzuheben ist der Signalweg von der nPKC ϵ über Ras/Raf und MEK 1/2 bis zur Aktivierung der ERKs 1/2, da es auf diesem Weg nachweislich zur Entstehung einer Herzhypertrophie kommt (Clerk et al. 2001 [69]; Bueno et al. 2000 [17]). Pan et al. demonstrierten, dass die durch Dehnung induzierte Aktivierung der Rho- GTPasen ebenfalls durch PKC (besonders durch cPKC α und nPKC δ) vermittelt wird und schlussfolgerten daraus, dass das Zusammenspiel der PKC, der Rho- GTPasen und der MAP- Kinasen eine wichtige Rolle in der durch Dehnung ausgelösten Herzhypertrophie spielt (Pan et al. 2004 [70]).

In der Versuchsreihe 3 gab es keinen nennenswerten Intensitätsunterschied der Phospho- PKC zwischen der Kontrollgruppe und der eingespannten Kontrollgruppe. Eine Aktivitätssteigerung zeigte sich erst von der eingespannten Kontrollgruppe zur slag length Gruppe. Eine ähnliche Aktivierung war in der Versuchsreihe 2 von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe erkennbar. Wahrscheinlich ist dies somit weniger auf Einspannungs- und

Fixierungsreize zurückzuführen, als vielmehr auf den Stress durch die elektrische Stimulation und die daraus resultierenden Kontraktionen. Strait und Samarel demonstrierten, dass es durch elektrische Stimulation neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte zur Aktivierung der Isoformen nPKCd und nPKCe kommt (Strait and Samarel 2000 [71]). Für den doch eindrücklichen, signifikanten Phosphorylierungsrückgang von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe und auch zur over stretch Gruppe in den beiden genannten Versuchsreihen wurde bisher keine Erklärung gefunden. Der verwendete phospho-spezifische PKC- Antikörper erkannte die Isoformen α , β I, β II, ϵ , δ und ζ . Der signifikante (~ 400 %) Phosphorylierungsanstieg von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe in der Versuchsreihe 4 konnte nur auf den pathologischen Dehnungsreiz in der over stretch Gruppe zurückgeführt werden. Eine Erklärung für diese zu den Versuchsreihen 2 und 3 doch gänzlich verschiedene Ausprägung wurde bis dato nicht gefunden.

4.2.3 c- Raf- 1

Externe Stimuli, wie die Dehnung von Kardiomyozyten werden im Allgemeinen über Phosphorylierungen von Proteinkinasen- Kaskaden in den Zellkern übertragen und führen dort zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur vermehrten Genexpression (Komuro et al., 1990 [8]; Davis 1993 [11]; Yamazaki et al. 1995a [29]). Die c- Raf- 1- Kinase bildet ein Bestandteil dieser Proteinkinasen- Kaskaden. In der Kaskade ist c- Raf- 1 der Proteinkinase C, Ras und den G- Proteinen nachgeschaltet und den MAP- Kinasen- Aktivatoren (MEK) vorgeschaltet (Sozeri et al. 1992 [46]; Yamazaki et al. 1995a [29]; Zou et al. 1996 [72]). Durch mechanische Dehnung kam es zu einer vorübergehenden Aktivitätssteigerung der Raf- 1- Kinase und der MEK- Kinasen (Yamazaki et al. 1995a [29]). Der früheste Aktivitätsanstieg war bereits eine Minute nach der Dehnung zu verzeichnen und erreichte schon nach zwei Minuten sein Maximum. Das Aktivitätsniveau blieb bis ca. 12 min. nach Dehnung ungefähr gleich und fiel dann bis 30 min. nach Dehnung wieder auf den Level der Kontrollwerte zurück (Yamazaki et al. 1995a [29]).

Bei c- Raf- 1 waren in der vorliegenden Arbeit keine bedeutsamen Intensitätsänderungen zu verzeichnen. Ein Grund dafür liegt möglicherweise in der zeitlichen Abhängigkeit der c- Raf- 1- Aktivierung durch Dehnung. Wie zuvor beschrieben war der maximale durch Dehnung erreichbare Aktivitätsanstieg in Kardiomyozyten schon nach zwei Minuten zu verzeichnen. Wenn die von Yamazaki et al. erläuterten Ergebnisse auf die verwendeten humanen Herzmuskelstreifen übertragbar sind, ist es möglich, dass sich eventuell vorhandene

Intensitätsänderungen nach 10 bzw. 30- minütiger Versuchszeit schon wieder normalisiert hatten.

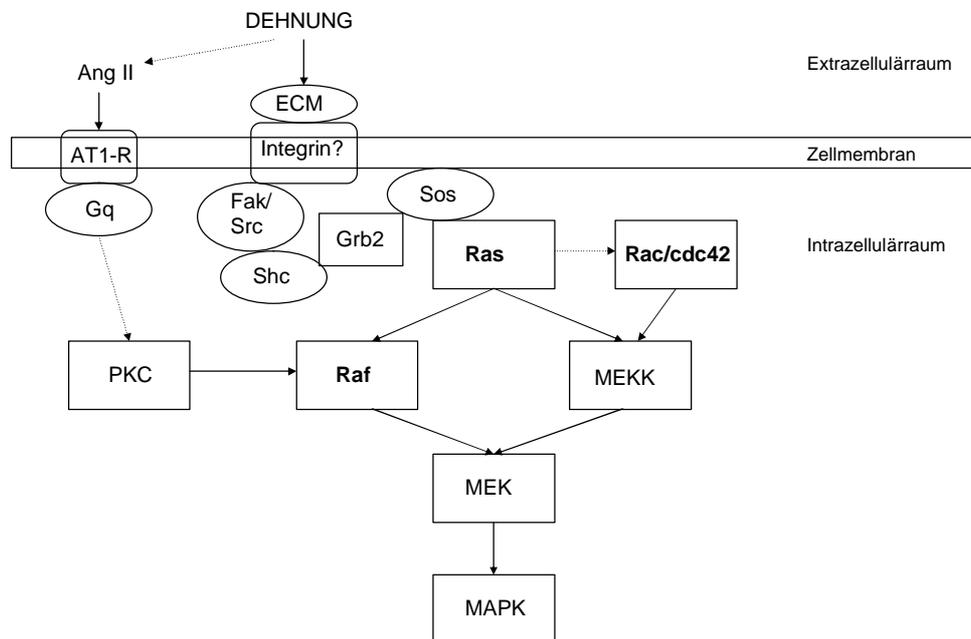


Abb. 23: Signaltransduktionswege, die ausgelöst durch mechanische Dehnung in Kardiomyozyten, vermutlich an der Entstehung der dehnungsinduzierten Herzhypertrophie beteiligt sind. Die Aktivierung der MAP- Kinasen erfolgt durch vorgeschaltete heterotrimere G- Proteine (Shc, Grb2, Sos), durch kleine G- Proteine (Ras, Rac, cdc42) und durch Proteinkinasen (Src, Fak, PKC).
 Ang II=Angiotensin II; AT1-R=Rezeptor 1 des Angiotensin II; ECM=extrazelluläre Matrix.

4.2.4 Extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2 (ERKs 1/2)

Die ERK 1/2- Expression zeigte ähnlich wie die c- Raf- Expression stets nur minimale Veränderungen, die sich einer weiteren Beurteilung entzogen.

Bei den Phospho- ERKs 1/2 kam es in allen Versuchsreihen zu einer signifikanten Aktivitätszunahme von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe. Dies ist wahrscheinlich auf die mechanischen Reize beim Einspannen der Muskelstreifen und durch die Fixation an sich bedingt. Die Phosphorylierungssteigerung in der slag length Gruppe war in den 10 Minuten- Versuchen der Reihe 1 und den 30-minütigen Versuchen der Reihen 2, 4 und 5 genauso ausgeprägt wie in den 60-minütigen Versuchen der Versuchsreihe 3. Vermutlich

stellt schon allein die Fixierung der Muskelstreifen einen ausreichenden Stimulus für die Aktivierung der Phospho- ERKs 1/2 dar. Die Überdehnungsreize zeigten nur in der Versuchsreihe 3, den 60- minütigen Versuchen einen nennenswerten Effekt. Es kam zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung von der optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe. Weitere signifikante Unterschiede lagen in den Versuchsreihen 2 und 3 von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe vor.

In den letzten Jahren konzentrierten sich sehr viele Untersuchungen auf die Erforschung der intrazellulären Signaltransduktionswege, die mit Herzhypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie assoziiert sind (Bueno et al. 2000 [17]). Die durch die MAP- Kinasen ausgelöste Signalkaskade kann auch durch Stress- Stimuli, wie z.B. Dehnung in die Wege geleitet werden und wird als wichtiger Regulator der kardialen Hypertrophie erachtet. Eine besondere Rolle bei der Regulierung der Herzhypertrophie spielen dabei MEK 1 (ein vorgeschalteter Aktivator der ERKs 1/2) und die ERKs 1/2 an sich, doch über ihre Bedeutung an der Hypertrophie- Auslösung existieren widersprüchliche Studien. Als nahezu gesichert gilt die von verschiedenen Forschungsgruppen beschriebene Erkenntnis, dass die ERKs 1/2 in kultivierten Kardiomyozyten neonataler Ratten durch Agonisten und Zelldehnung aktiviert werden (Bogoyevitch et al. 1993 [73]; Yamazaki et al. 1993 [16]; Clerk et al. 1994 [74]; Post et al. 1996 [75]; Zou et al. 1996 [72]; Ueyama et al. 2000 [76]). Gillespie-Brown et al. und auch Sugden und Clerk zeigten, dass eine Überexpression von dominant- negativen Komponenten der ERK 1/2- Kaskade, wie z.B. MEK 1, zur Abschwächung der Hypertrophieausprägung führte (Gillespie-Brown et al. 1995 [77]; Sugden and Clerk 1998 [15]). Den wahrscheinlich wichtigsten Beleg für die Verbindung zwischen der ERK 1/2- Aktivierung und der Entstehung der Herzhypertrophie lieferten Bueno et al. im Jahre 2000. Sie zeigten, dass es bei MEK 1 überexprimierenden transgenen Mäusen über die spezifische Aktivierung der ERKs 1/2 zur Entwicklung einer kompensierten Herzhypertrophie ohne Anzeichen einer Kardiomyopathie kam (Bueno et al. 2000 [17]). Es existieren jedoch auch einige Studien, die die Bedeutung von MEK 1 und ERK 1/2 an der Entstehung der Herzhypertrophie anzweifeln (Thorburn et al. 1994 [78]; Post et al. 1996 [75]; Zechner et al. 1997 [79]). In einer Studie wurde sogar vermutet, dass die ERK- Aktivierung (nach Zugabe von atrialem natriuretischen Protein=ANP) mit einer Herzhypertrophie- Prävention assoziiert ist (Silberbach et al. 1999 [80]). Die Gründe für diese gegensätzlichen Erkenntnisse sind noch unklar, doch vermutlich spielen die Unterschiede im verwendeten Gentransfer (Thorburn et al. manipulierte das ERK1- Gen versus Ueyama et al. manipulierte das MEK1- Gen) und die

dadurch bedingten unterschiedlichen Hemmeffekte auf die ERK 1/2- Aktivierung eine entscheidende Rolle (Ueyama et al. 2000 [76]).

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich in einigen Gruppen eine Zunahme der Phosphorylierungen und damit verbunden auch der ERK 1/2- Aktivierung. Die signifikante Intensitätszunahme von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe in den Versuchsreihen 2 (Abb. 6, Diagramm 3) und 3 (Abb. 12, Diagramm 9) ist eindeutig auf die aktivierende Wirkung des Phorbol- Esters (TPA) zurückzuführen. Eine TPA- bedingte Aktivierung der ERKs 1/2 wurde sowohl in Kardiomyozyten (Yamazaki et al., 1993 [16]) als auch in Fibroblasten (Schönwasser et al. 1998 [81]) beschrieben. Man kann davon ausgehen, dass in den untersuchten humanen Herzmuskelstreifen beide Zellarten vorhanden waren. Die in allen Versuchsreihen aufgetretene Aktivitätssteigerung von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe kann zum wahrscheinlich größten Anteil durch die Einspannungs- und Fixierungsreize in der slag length Gruppe erklärt werden. Diese Vermutung geht zum einen darauf zurück, dass es in der Versuchsreihe 3 zu einer ausgeprägten Aktivitätszunahme von der Kontrollgruppe zur eingespannten Kontrollgruppe kam und die Aktivierung im Weiteren von der eingespannten Kontrollgruppe zur slag length Gruppe nur noch in einem geringeren Ausmaß zunahm (Abb. 14; Diagramm 11). Zum anderen stützt sich die Vermutung auf den deutlich signifikanten Intensitätsunterschied in der Versuchsreihe 4 (ohne Stimulation) (Abb. 22, Diagramm 19). In dieser Versuchsreihe bestehen die Abweichungen zwischen den beiden genannten Gruppen jeweils nur in der Einspannung und Fixierung der humanen Herzmuskelstreifen in der slag length Gruppe, eine elektrische Stimulation und daraus resultierende Kontraktion der Muskelstreifen erfolgte nicht. Strait and Samarel fanden in ihren Untersuchungen zur Auswirkung der elektrischen Stimulation und Kontraktion auf Kardiomyozyten heraus, dass es zu keiner nennenswerten Aktivitätssteigerung der ERKs 1/2 kam (Strait and Samarel 2000 [71]).

Die signifikante Intensitätszunahme von der optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe in der Versuchsreihe 3 (Abb. 17, Diagramm 14), den 60- minütigen Versuchen resultiert höchstwahrscheinlich aus der Überdehnung und dem damit verbundenen mechanischen Stress. Warum die Überdehnungsreize in den 30- minütigen Versuchen der Reihe 2, 4 und 5 zu keiner vergleichbaren Aktivitätssteigerung führten, ist unklar. Ein mögliche Ursache für das abweichende Ansprechen der Muskelstreifen auf die Überdehnungsreize kann durch die zeitlichen Unterschiede (Versuchsreihe 3 - 60 Minuten, Versuchsreihen 2,4,5 – 30 Minuten) bedingt sein. Allerdings trat in Versuchen an kultivierten Kardiomyozyten eine ERK 1/2-

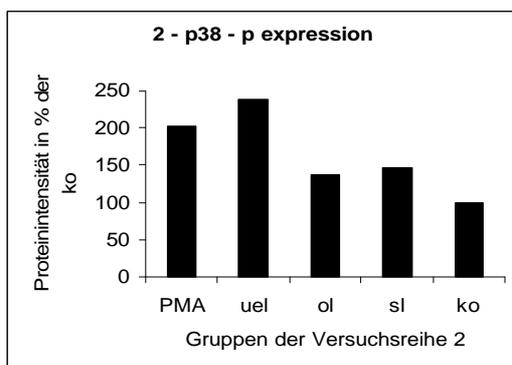
Aktivierung bereits schon nach kurzer Dehnungszeit von 5-10 min. auf (Yamazaki et al. 1993 [16]).

4.2.5 p38 MAP- Kinase

Die unphosphorylierte Form der p38 MAP- Kinase zeigte keine signifikanten Expressionsänderungen. Es stellte sich lediglich in der Versuchsreihe 4 (ohne Stimulation) eine Intensitätssteigerung von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe dar, die am Wahrscheinlichsten durch Einspannungs- und Fixierungsreize bedingt ist und in der Versuchsreihe 1 ergab sich eine leichte Expressionszunahme von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe. In den Versuchsreihen 2, 3 und 5 lagen in den jeweiligen Gruppen der Versuchsreihen nahezu gleiche Proteinintensitäten vor, so dass von gleichen Proteinmengen in den einzelnen Gruppen dieser Versuchsreihe ausgegangen werden kann.

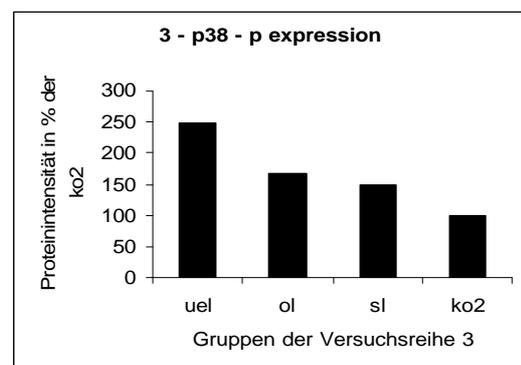
Das Bemerkenswerte bei der Phospho- p38 war die spezifische Reaktion auf starke Dehnungsreize, die sich in einer Aktivitätssteigerung der over stretch Gruppe zeigte. Die Tatsache, dass es in Versuchsreihe 1 zu keiner Phosphorylierungsänderung zwischen den Gruppen kam, lag vermutlich nicht an der kurzen 10- minütigen Versuchszeit, sondern daran, dass es in dieser Reihe keine Überdehnungsgruppe gab. In den übrigen Versuchsreihen zeigte sich jeweils eine Aktivitätszunahme von der slag length Gruppe (Versuchsreihe 4, 5) bzw. von der optimal stretch Gruppe (Versuchsreihe 2, 3) zur over stretch Gruppe. Die optimale Vordehnung der Muskelstreifen in den Versuchsreihen 1, 2 und 3 stellte keinen ausreichenden Stimulus der Phospho- p38- Expression dar. Als Stress und somit als adäquater Stimulus wurden erst die Überdehnungsreize angesehen (Diagramm 22 der Versuchsreihe 2; Diagramm 23 der Versuchsreihe 3).

Diagramm 22:



(30- minütige Versuche, mit Stimulation)

Diagramm 23:



(60- minütige Versuche, mit Stimulation)

Die Einwirkung von mechanischem Stress und besonders mechanischer Dehnung auf Kardiomyozyten führte nachweislich zur Induktion verschiedener zellulärer Mechanismen, die an der Entstehung der Herzhypertrophie beteiligt sind (Komuro et al. 1996 [18]; Sadoshima and Izumo 1993 [82]; Komuro et al. 1990 [8]). Unter anderem kam es dabei auch zur Aktivierung der p38 MAP – Kinase (Takeishi et al. 2001 [22]), die zusammen mit der c-Jun N- terminalen Kinase (JNKs), die Gruppe der Stress- aktivierten MAP- Kinasen (SAPK) bildet.

Es ist noch unklar, wie mechanischer Stress von der Zelle erkannt und in intrazelluläre biochemische Signale umgewandelt wird, die dann folglich auch zur Aktivierung der p38 MAP- Kinase führen. Aikawa et al. vermuteten in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2002, dass mechanische Dehnung direkt durch die Aktivierung von Integrinen (Rezeptoren der extrazellulären Matrix (ECM)) und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) zur p38 – Aktivierung führen könnte (Aikawa et al. 2002 [83]). Diese Vermutungen bedürfen allerdings noch weiterer Untersuchungen. Als sicher gelten jedoch die, vor allem durch in vitro Analysen gewonnen Erkenntnisse über einige vorgeschaltete Aktivatoren der p38 MAP – Kinase. Dazu gehören die MAP- Kinase Kinase Kinasen (MEKK), wie z.B. TAK-1 (transforming factor b activated kinase 1) und ASK-1 (apoptotic signal-regulated kinase 1), welche die MAP- Kinase Kinasen (MEK3 und MEK6) aktivieren, die wiederum als Hauptaktivatoren der p38 MAP- Kinase gelten (siehe Abb. 1a im Einleitungsteil). Die TAK-1 – MEK3/ MEK6 – Kaskade führt zur spezifischen Aktivierung von p38 (Ono and Han 2000 [84]). ASK-1 hingegen ist durch direkte Phosphorylierung von MEK3/6 bzw. MEK4/7 in der Lage sowohl p38 als auch JNK zu aktivieren (Ichijo et al. 1997 [85]). Die Substrate der p38 MAP- Kinase beinhalten sowohl Transkriptionsfaktoren (ATF2, MEF2C, CHOP) als auch andere Proteinkinasen (MAPKAPK2, Mnk1, Mnk2). Die Phosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF2 wurde in kultivierten Kardiomyozyten als Reaktion auf mechanischen Stress, ausgelöst durch p38, beobachtet (Clerk and Sugden 1997 [86]). Die Auswirkungen einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren MEF2C und CHOP wurde in Kardiomyozyten bisher nicht untersucht. In Monozyten führte die durch p38 initiierte MEF2C – Aktivierung während Infektionen zu einer gesteigerten c-jun Genexpression (Han et al. 1997 [23]). Das Vorkommen und die Aktivierung der MAP- Kinase aktivierenden Proteinkinase 2 (MAPKAPK2) im Herzen konnte klar gezeigt werden (Bogoyevitch et al. 1996 [87]; Maulik et al. 1996 [88]; Zu et al. 1997 [89]). Die MAPKAPK2 führt zur Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins Hsp25/27 (Clifton et al. 1996

[90]), welches seinerseits die Stabilisierung des Aktin- Zytoskeletts anregt und somit zur Verstärkung der zellulären Schutzmechanismen beiträgt (Lavoie et al. 1995 [91]). Die Proteinkinasen Mnk1 und Mnk2, die ebenfalls durch p38 phosphoryliert werden, haben Einfluss auf die Aktivierung des Translations- Initiatorfaktors eIF4E (Fukunaga R and Hunter T 1997 [92]; Waskiewicz et al. 1997 [93]).

Bei den weiteren Ausführungen über p38 muss unterschieden werden zwischen den Ergebnissen aus in vitro Studien (Zellkulturen) und in vivo Studien (transgene Tiere), da es zu verschiedenen Erkenntnissen bezüglich der p38- Rolle bei der Entstehung der Herzhypertrophie kam (Petrich and Wang 2004 [94]).

In vitro – Studien:

Zechner et al. und Wang et al. arbeiteten mit rekombinanten adenoviralen Vektoren, die zur Expression von aktivierten Formen, der der p38 MAP- Kinase vorgeschalteten Aktivatoren MEK3 und MEK6 führten. Sie infizierten die Kardiomyozyten- Kulturen mit den Vektoren und untersuchten deren Einfluss auf die Entstehung der Herzhypertrophie und des apoptotischen Zelltodes (Zechner et al. 1997 [79]; Wang et al. 1998b [20]). Beide Arbeitsgruppen beobachteten, dass die spezifische Aktivierung von p38 in den Kardiomyozyten zu charakteristischen Merkmalen der Hypertrophie führte. Es kam zur Induktion und vermehrten Expression fetaler Gene, die untersuchte Myozyten- Größe nahm zu und es bildeten sich organisierte sarkomere Strukturen, bedingt durch die Expression gewisser sarkomerer Proteine, wie β - Myosin- Schwere- Ketten und skelettales Aktin. Durch die Verwendung dominant- negativer Mutanten der p38a und p38 β - Isoformen, kamen Wang et al. zu der Vermutung, dass p38a eine eher apoptotische Wirkung hat, während p38 β eher die Entstehung der Herzhypertrophie fördert.

In vivo – Studien:

Zu völlig gegensätzlichen Erkenntnissen gelangten Liao et al. (2001), die ebenfalls der Arbeitsgruppe um Yibin Wang angehören. Liao et al. entwickelten transgene Modelle an lebenden Tieren, in denen die Expression der vorgeschalteten Aktivatoren der p38 MAP- Kinase, MEK3 und MEK6, gezielt in den transgenen ventrikulären Herzmuskelzellen gesteigert werden konnte. Die erhöhte p38- Aktivität führte zu einer ausgeprägten interstitiellen Fibrose mit dem Endstadium einer restriktiven Kardiomyopathie und zur Expression von fetalen Genen, die charakteristisch sind bei kardialen Erkrankungen, jedoch gab es keine signifikanten Anzeichen einer Herzhypertrophie (Liao et al. 2001 [95]). Ein ähnliches Ergebnis erhielten Zhang et al. im Jahre 2003. Sie zeigten, dass die Expression einer dominant- negativen p38- Mutante keinen Effekt auf die durch Druckerhöhung induzierte

Herzhypertrophie hatte. Doch lag ein gewisser Schutzeffekt bezüglich einer kardialen Fibrose vor (Zhang et al. 2003 [96]). Braz et al. demonstrierten 2003, dass die aktivierte Form der p38 MAP- Kinase, die durch Calcineurin bedingte nukleäre Translokation des NFAT- Faktors (nukleärer Faktor der aktivierten T- Zellen) verhindert (Braz et al. 2003 [97]). Diese Entdeckung beschreibt einen möglichen molekularen Mechanismus, mit welchem die inhibitorische Wirkung der p38 MAP- Kinase auf die Entstehung der Herzhypertrophie erklärt werden könnte (Petrich and Wang 2004 [94]), da eindeutige Erkenntnisse darüber bestehen, dass die Aktivierung des Calcineurin- NFAT Signaltransduktionsweges in bedeutendem Maße zur Entstehung der Herzhypertrophie beiträgt (Molkentin 2000 [98]). Aus einer weiteren Studie von Liao et al. aus dem Jahre 2002 geht hervor, dass die p38 MAP- Kinase eine negativ inotrope Wirkung vermittelt, indem sie wahrscheinlich die Kalzium- Sensitivität der Myofilamente senkt (Liao et al. 2002 [99]). Diese Beobachtungen der in vivo- Studien offenbaren eine neue Sichtweise auf die Auswirkungen der aktivierten p38 MAP- Kinase bezüglich des kardialen fibrotischen Remodellings und des Kontraktionsverlustes (Liao et al. 2001 [95]).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich besonders bei Phospho- p38 in den 30- minütigen Versuchen der Versuchsreihen 2 und 5 signifikante Aktivitätssteigerungen von der optimal stretch Gruppe (Versuchsreihe 2) bzw. der slag length Gruppe (Versuchsreihe 5) zur over stretch Gruppe. In der Versuchsreihe 5 wurde die Signifikanz im Mann- Whitney U- Test mit $p = 0,0038$ belegt. Die schon initial gefundene Aktivitätssteigerung der p38 MAP- Kinase in der over stretch Gruppe der Versuchsreihe 2 konnte somit mit der optimierten Probenvorbereitungsmethode in der Versuchsreihe 5 nochmals bestätigt werden. Diese Phosphorylierungs- bzw. Aktivitätszunahme in der over stretch Gruppe wurde höchstwahrscheinlich durch den ausgeprägten Überdehnungsreiz (doppelte Ausgangslänge) in der over stretch Gruppe ausgelöst, da er die einzige veränderte Variable von der slag length Gruppe bzw. optimal stretch Gruppe zur over stretch Gruppe darstellt. In der Versuchsreihe 4 (30 Minuten Versuche), in welcher speziell die dehnungsabhängigen Veränderungen der humanen Muskelstreifen ohne zusätzliche elektrische Stimulation untersucht wurden, kam es zu einer deutlich geringer ausgeprägten, nicht signifikanten Aktivitätszunahme von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe. Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Aktivierungsmuster innerhalb der 30- minütigen Versuchsreihen stellte sich heraus, als die Signaltransduktion innerhalb der kardialen Fibroblasten mittels Literaturrecherche genauer betrachtet wurde. Die verwendeten humanen Muskelstreifenpräparate sind, wie die meisten menschlichen Gewebe ein Zellnetzwerk, in welchem neben Kardiomyozyten auch andere

Zellen, wie Fibroblasten und natürlich auch extrazelluläre Matrix vorkommen. MacKenna et al. beschrieben 1998, dass die Dehnung kardialer Fibroblasten zur raschen Aktivierung von ERK2 und JNK1 führte, jedoch p38 zeigte keine nennenswerten Intensitätsänderungen durch die Dehnung (MacKenna et al. 1998 [100]).

Es ist anzunehmen, dass es in den Versuchsreihen 2 und 5 durch die elektrische Stimulation der Muskelstreifen, vor allem zu einer Aktivierung der Kardiomyozyten innerhalb des Zellnetzwerkes kam, die sich aufgrund der elektrischen Stimulation kontrahierten und sich somit schon in einer gewissen Aktivierungsphase befanden. Als nun ein zweiter Stressor, die Überdehnung hinzukam, führte diese vermutlich zu einer weiteren Aktivitätssteigerung in den Kardiomyozyten. Die Kombination aus elektrischer Stimulation und Dehnung der Muskelstreifen ergab folglich eine signifikante Aktivierung der p38 MAP- Kinase, die wahrscheinlich hauptsächlich durch eine Aktivierungssteigerung in den Kardiomyozyten bedingt ist. Eine p38- Aktivierung, in den ebenfalls der Überdehnung ausgesetzten Fibroblasten, würde nur von geringem Ausmaß sein, wenn man die Resultate von MacKenna et al. auf humanes Herzmuskelgewebe übertragen könnte (MacKenna et al. 1998 [100]). Die Kardiomyozyten in den Muskelstreifen der Versuchsgruppe 4, die nicht elektrisch stimuliert wurden und folglich keine Kontraktionen zeigten, wurden demzufolge weniger beansprucht und auch nur in geringerem Maße aktiviert. Daher fiel die p38- Aktivierung auch deutlich geringer aus.

Bezüglich der p38 – Wirkung auf das kardiale Remodelling besteht noch weiterer Bedarf an Untersuchungen. Bei mechanischen Dehnungsuntersuchungen an kardialen Fibroblasten kamen Papakrivopoulou et al. zu der Erkenntnis, dass die p38 MAP- Kinase als negativer Regulator der Prokollagen- Genexpression in kardialen Fibroblasten fungiert (Papakrivopoulou et al. 2004 [101]). Das würde bedeuten, dass eine durch mechanische Dehnung erreichte p38- Aktivierung in kardialen Fibroblasten zur Verminderung der Kollagensynthese beiträgt und somit einem kardialen fibrotischen Remodelling, verursacht durch mechanische Dehnung, entgegenwirkt. Zu anderen Erkenntnissen gelangten See et al. als sie die Auswirkung eines p38- Inhibitors (RWJ-67657) auf die linksventrikuläre Funktion und das kardiale Remodelling bei post- Myokardinfarkt Ratten untersuchten. Sie fanden heraus, dass die Behandlung mit einem p38- Inhibitor (RWJ-67657) nach Myokardinfarkt dem Remodelling entgegenwirkt und günstige Effekte auf die linksventrikuläre Funktion hat (See et al. 2004 [102]). Die Ergebnisse von See et al. aus dem Jahre 2004 untermauern noch einmal die Aussagen von Liao et al. und Zhang et al., die vermuteten, dass die Hemmung der

p38 MAP- Kinase, einem fibrotischen kardialen Umbau vorbeugt (Liao et al. 2001 [95]; Zhang et al. 2003 [96]).

Es besteht somit noch längst keine Klarheit über die genauen Effekte der aktivierten p38 MAP- Kinase und es werden weitere Untersuchungen nötig werden, vor allem im Hinblick auf die Wirkungen im humanen Gewebe.

4.2.6 c – Jun NH₂ – terminale Kinase 2 (JNK2)

Die zwei erwähnenswerten Expressionsänderungen der unphosphorylierten JNK2 ergaben sich in der Versuchsreihe 2. Es zeigte sich eine Proteinintensitätszunahme zum einen von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe und zum anderen von der Kontrollgruppe zur TPA-Gruppe. Dehnungsspezifische Änderungen traten nur in geringem Umfang auf.

Bei der Phospho- JNK2 lag in der Versuchsreihe 3 eine signifikante und in der Versuchsreihe 2 eine geringere Expressionssteigerung von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe vor. Es ist somit anzunehmen, dass das Phorbolster TPA (phorbol 12- myristate 13- acetate) auch ein potenter Aktivator der c- Jun NH₂- terminalen Kinase 2 und ihrer phosphorylierten Form ist.

Die c- Jun NH₂- terminale Kinase bildet zusammen mit der p38 MAP- Kinase die Gruppe der Stress- aktivierten Proteinkinasen (SAPK), die wiederum zur Familie der MAP- Kinasen gehört. Die SAPKs werden durch ein breites Spektrum an Stimuli aktiviert. Dazu zählen physikalische (Hitze, mechanische Dehnung, UV-Strahlung), chemische (pH), metabolische (Ischämie) und biologische (Zytokine, TNF α , Bakterienproteine) Stressoren (Kyriakis and Avruch 2001[103]). Aber auch durch die elektrische Stimulation von Kardiomyozyten kam es zu einer Intensitätssteigerung der Isoformen JNK2 und JNK3 (Strait and Samarel 2000 [71]). Die genannten Stimuli führen über noch unbekannte Mechanismen zur Aktivierung der MEKK1-MEK4/7-Signalkaskade in den Kardiomyozyten, die mit der Phosphorylierung der JNKs endet (Barr and Bogoyevitch 2001 [104]). Die durch Phosphorylierung aktivierten JNKs sind nun in der Lage, in den Zellkern zu migrieren und dort Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun und AP-1 zu aktivieren. Komuro et al. vermuteten in einer Studie aus dem Jahre 1996, dass die mechanische Dehnung von Kardiomyozyten zur Aktivierung der JNKs führt und es durch die weitere Aktivierung von AP-1 zur vermehrten Expression von Herzhypertrophie auslösenden Triggerproteinen kommt (Komuro et al. 1996 [18]). Unterstützend zu dieser Vermutung demonstrierten Wang et al. 1998, dass die stimulierte MEK7- Expression in Kardiomyozyten zur spezifischen Aktivierung der JNKs führt und in einer Kardiomyozytenhypertrophie mündet (Wang et al. 1998a [19]). Die in den letzten

Jahren zunehmend durchgeführten in vivo- Studien zeigten allerdings ein widersprüchliches Bild über die Rolle der JNKs bei der Entstehung der Herzhypertrophie (Choukroun et al. 1999 [105]; Izumiya et al. 2003 [106]; Sadoshima et al. 2002 [107]; Petrich et al. 2003 [108]).

In der vorliegenden Arbeit kam es zu keiner nennenswerten dehnungsabhängigen Intensitätsänderung. Die Aktivitätssteigerung der JNK2 von der Kontrollgruppe zur slag length Gruppe in der Versuchsreihe 2 ist zum einen sicherlich auf die Einspannungs- und Fixierungsreize zurückzuführen. Zum anderen stellt die elektrische Stimulation in der slag length Gruppe eine Erklärung für die Intensitätszunahme der JNK2 dar (McDonough et al. 1997 [109]; Strait and Samarel 2000 [70]). Zu einer signifikanten Intensitätsänderung der Phospho- JNK kam es in der Versuchsreihe 3, den 60- minütigen Versuchen von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe. Man kann somit davon ausgehen, dass TPA einen potenten Aktivator der JNK2 in humanen Herzmuskelstreifen darstellt. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über das Aktivierungspotential des Phorbol- Esters TPA auf die c-Jun NH₂- terminale Kinase. Bogoyevitch et al. kamen bei Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten neonataler Rattenherzen zu dem Ergebnis, dass TPA (Expositionszeit 10 – 30 Minuten) zu keiner nennenswerten Aktivierung der JNKs führte (Bogoyevitch et al. 1995 [110]). Im Gegensatz dazu beschrieben Strait und Samarel dass die schon 10- minütige Inkubation ventrikulärer Myozyten neonataler Ratten in TPA eine signifikante Phosphorylierungszunahme der JNKs zur Folge hatte (Strait and Samarel 2000 [70]). Da wiederum unterschiedliche Ergebnisse zur möglichen Rolle der JNKs in der Entstehung der kardialen Hypertrophie bestehen, werden weitere Studien zur Abklärung nötig sein.

4.2.7 p70S6- Kinase

Die p70S6- Kinase zeigte deutliche dehnungsabhängige Effekte, die sich besonders in den 30- minütigen Versuchen der Versuchsreihen 2 und 4 darstellten und nach 60 Minuten nicht mehr im gleichen Ausmaß nachweisbar waren. Es kam in den Versuchsreihen 2 und 4 zu signifikanten Intensitätssteigerungen von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe (bei der Versuchsreihe 2) bzw. zur over stretch Gruppe (bei der Versuchsreihe 4). Zwischen optimal stretch und over stretch bestanden in der Versuchsreihe 2 keine größeren Intensitätsänderungen mehr. Ein weiteres signifikantes Ergebnis der Versuchsreihe 2 stellte die Aktivitätssteigerung von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe dar. Aber auch dieser Effekt war nach 60 Minuten in der Versuchsreihe 3 nicht mehr verifizierbar.

Die kardiale Hypertrophie äußert sich durch eine Zunahme der zellulären Masse, die wiederum auf einem Anstieg des zellulären Proteingehalts beruht (Cooper 1997 [1]). In der Entstehung der Herzhypertrophie haben Translationsmechanismen in der Regulation der Proteinsyntheserate eine Schlüsselrolle (Stewart and Thomas 1994 [111]). Stewart und Thomas zeigten 1994, dass die Phosphorylierung des S6- Proteins der ribosomalen 40S- Untereinheit durch die Aktivierung der Proteintranslation an der besagten Regulierung der Proteinsyntheserate beteiligt ist (Stewart and Thomas 1994 [111]). Die Phosphorylierung des S6- Proteins am Carboxylende erfolgt durch eine Familie von Serin/Threonin- Kinasen, die bekannt ist unter dem Namen S6- Kinasen. Eine dieser S6- Kinasen ist die p70S6- Kinase. Chung et al. vermuteten in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1992, dass die p70S6- Kinase den Hauptaktivator des S6- Proteins darstellt (Chung et al. 1992 [58]). Die p70S6- Kinase ist sowohl an der Aktivierung der Translation als auch an der Aktivierung der Transkription entscheidend beteiligt (Chou and Blenis 1995 [31]; Laser et al. 1998 [112]). Yamazaki et al. demonstrierten 1993, dass die Dehnung kultivierter Ratten- Kardiomyozyten zu einer Aktivitätszunahme der p70S6- Kinase führte und vermuteten, dass die p70S6- Kinase auf molekularer Ebene in die Entstehung der Herzhypertrophie involviert sein könnte (Yamazaki et al. 1993 [16]). Laser et al. zeigten 1998, dass die dehnungsinduzierte Phosphorylierung und Aktivierung der p70S6- Kinase wahrscheinlich über einen PKC- abhängigen Signaltransduktionsweg erfolgt. Dabei findet die Aktivierungskaskade vermutlich von PKC über c-Raf, MEK 1/2 und ERK 1/2 zur p70S6- Kinase statt (Iijima et al. 2002 [33]). Laser et al. beschrieben als weiteren wichtigen Effekt, dass die mit dem Phorbolster TPA behandelten Kardiomyozyten eine Phosphorylierung der p70S6- Kinase zeigten, die in einer ähnlichen Zeitspanne zu beobachten war, wie auch die dehnungsinduzierte Aktivierung der p70S6- Kinase und gelangten dadurch zu dem Ergebnis, dass die dehnungsinduzierten Veränderungen der p70S6- Kinase durch TPA- Stimulation der Kardiomyozyten nachgeahmt werden können (Laser et al. 1998 [112]). Diese Aussage von Laser et al. lässt auch bei der TPA- induzierten Aktivierung der p70S6- Kinase auf eine PKC- abhängige Signaltransduktionskaskade schließen.

Die signifikanten Intensitätssteigerungen der p70S6- Kinase von der slag length Gruppe zur optimal stretch Gruppe in der Versuchsreihe 2 und die ebenfalls signifikante Aktivierung von der slag length Gruppe zur over stretch Gruppe in der Versuchsreihe 4 sind sicherlich auf dehnungsinduzierte Aktivierungsschritte zurückzuführen. Warum diese Intensitätssteigerung der p70S6- Kinase in den 60- minütigen Versuchen der Reihe 3 nicht mehr verifizierbar war, ist unklar, da in Versuchen mit kultivierten Myozyten die dehnungsinduzierte Aktivierung der

p70S6- Kinase auch noch nach 1-4 h nachweisbar war (Laser et al. 1998 [112]). Die Aktivitätssteigerung von der Kontrollgruppe zur TPA- Gruppe resultiert höchstwahrscheinlich aus der stimulierenden Wirkungsweise des Phorbolesters, welcher vermutlich eine Phosphorylierung der p70S6- Kinase über den PKC- abhängigen Signalweg bewirkt (Laser et al. 1998 [112]). Die aktivierte Form der p70S6- Kinase ist laut Aussage mehrerer Autoren sowohl an der Regulation der Translation als auch an der Regulation der Transkription beteiligt und kann somit als wichtiger Baustein in der Entstehung der Herzhypertrophie angesehen werden (Chou and Blenis 1995 [31]; Laser et al. 1998 [112]).

4.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es anhand kleiner Mengen humanen atrialen Gewebes möglich ist, detaillierte Aussagen über den Einfluss mechanischer Dehnung und anderer Stressoren auf die Signaltransduktion im humanen Myokard zu treffen. Die durchgeführten Untersuchungen sollten besonders den Einfluss bestimmter Signaltransduktionsproteine auf die Entstehung einer Herzhypertrophie genauer prüfen. Es wurden dabei vor allem die Auswirkungen der mechanischen Dehnung auf die MAP-Signalkaskade untersucht. Dabei erwies sich die Stress- aktivierte p38 MAP- Kinase als ausgesprochen dehnungsabhängig im humanen Myokard. Speziell auf die starken Überdehnungsreize reagierte die p38 MAP- Kinase mit einer signifikanten Aktivitätssteigerung. Jedoch herrschen in der Literatur zurzeit noch widersprüchliche Ansichten darüber, ob die aktivierte p38 MAP- Kinase an der Entstehung der Herzhypertrophie beteiligt ist oder nicht. Da es allerdings noch keine Angaben zu humanem Gewebe gibt, handelt es sich in der vorliegenden Arbeit sicherlich um einen relevanten, neuen Aspekt. Als weitere wichtige Erkenntnis der vorliegenden Arbeit gilt die dehnungsinduzierte Aktivierung der p70S6- Kinase im humanen Myokard. Da sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Translation und Transkription spielt und somit einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinexpression in der Zelle hat, kann die p70S6- Kinase vermutlich als wichtiger Baustein in der Entstehung der Herzhypertrophie angesehen werden. Die Auswirkungen der Dehnung auf die Aktivierung der ERKs 1/2, die in Versuchen an Kardiomyozyten als eindeutig Hypertrophie auslösend beschrieben wurden, waren in dieser Arbeit an humanem Herzmuskelgewebe nicht verifizierbar und bedürfen daher noch weiterer Analysen.

5. Zusammenfassung

Die kardiale Hypertrophie ist eine Anpassungserscheinung des Herzens auf eine gesteigerte Druck- oder Volumenbelastung. Zu Beginn der Belastungszunahme versucht das Herz mittels zellulärer Hypertrophie die erhöhte Wandspannung und den erhöhten Druck in den Atrien und Ventrikeln zu kompensieren. Zunächst gelingt es dem Herzen auch die pathologischen Drücke zu senken, jedoch kommt es dann an einem nicht definiertem Punkt der Hypertrophie-Genese zur Verselbstständigung der daran beteiligten Mechanismen und die Hypertrophie nimmt immer weiter zu. Ein stark hypertrophierter Herzmuskel erreicht schnell die Grenzen seiner möglichen Blutversorgung und es folgen ischämische Zwischenfälle, die nicht selten zum Tod des Patienten führen. Um diesen Circulus vitiosus unterbrechen zu können, bedarf es genauer Kenntnisse der daran beteiligten molekularen und biochemischen Signaltransduktionsabläufe. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit einigen dieser Hypertrophie- auslösenden Abläufe und legte besonderes Augenmerk auf den Einfluss der MAP- Signalkaskade in der Entstehung der kardialen Hypertrophie. Zum ersten Mal wurde für derartige Untersuchungen mit humanem atrialen Herzmuskelgewebe gearbeitet, das im Rahmen von kardiochirurgischen Operationen gewonnen wurde. Das Modell der isolierten und intakten Muskelfaser erwies sich in der Versuchsdurchführung als überaus geeignet, da es zum einen eine elektrische Stimulation der humanen Herzmuskelstreifen ermöglichte und es zum anderen die Gelegenheit bot, dehnungsabhängige Versuche an den Muskelstreifen durchzuführen. Die dehnungsabhängigen Veränderungen der, an den untersuchten Signaltransduktionswegen, beteiligten Proteinkinasen wurden in Western Blot- Analysen gezeigt. Dabei stellte sich die p38 MAP- Kinase als durch Dehnung aktivierte Proteinkinase dar und speziell die pathologischen Überdehnungsreize erwiesen sich als potente Aktivierungsstimuli der p38 MAP- Kinase. Da zur Zeit noch viele gegensätzliche Meinungen über die Rolle der p38 MAP- Kinase in der Entstehung der Herzhypertrophie vorherrschend sind, werden weitere Untersuchungen diesbezüglich nötig sein. Sicherlich wäre es in Zukunft sinnvoll, die derzeitigen Versuchsmodelle und -methoden, wie z.B. das Modell der isolierten und intakten Muskelfaser und die Western- Blot- Methode, die für Analysen am humanen Herzmuskelgewebe benötigt werden, weiter zu entwickeln, da dadurch die unsichere Übertragung der aus Tierversuchen gewonnenen Resultate auf humanes Gewebe entbehrlich wäre und möglicherweise einheitlichere und aussagekräftigere Ergebnisse entstünden, die die Entwicklung viel versprechender Therapieoptionen schneller vorantreiben könnten.

6. Literaturverzeichnis

Einleitung:

1. Cooper IV G. Cardiocyte adaption to chronically altered load. 1987. *Annu Rev Physiol.* 49:501-518.
2. Mondry A, Swynghedauw B. Biological adaption of the myocardium to chronic mechanical overload. Molecular determinants of the autonomic nervous system. 1995. *Eur Heart J.* 16(supplement 1):64-73.
3. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. 1990. *N Engl J Med.* 322:1561-1566.
4. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. 2001. *Am Heart J.* 141:334-341.
5. Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways (Review). 2000. *Cardiovascular Research* 47:23-37.
6. Yamazaki T, Yazaki Y. 2000. Molecular basis of cardiac hypertrophy (Review). *Z Kardiol.* Steinkopff Verlag. 89:1-6.
7. Frey N, Olson EN. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad and the Ugly. 2003. *Annu Rev Physiol.* 65:45-79.
8. Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y. Stretching cardiac myocytes stimulates proto-oncogene expression. 1990. *J Biol Chem.* 265:3595-3598.
9. Peterson MB, Lesch M. Protein synthesis and amino acid transport in isolated rabbit right ventricular muscle. 1972. *Circ Res.* 31:317-327.

10. Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG. ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. 1991. *Curr Opin Cell Biol.* 3:1025-1032.
11. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways (minireview). 1993. *J Biol Chem.* 268:14553-14556.
12. Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. 2000. *Curr Opin Cell Biol.* 12:186-192.
13. Bueno OF, De Windt LJ, Lim HW, Tymitz KM, Witt SA. The dualspecificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. 2001. *Circ Res.* 88:88-96.
14. Schramek H, Schumacher M, Wilflingseder D, Oberleithner H, Pfaller W. Differential expression and activation of MAP kinases in dedifferentiated MDCK-focus cells. 1997. *Am J Physiol.* 272:C383-C391.
15. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinase (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium (Minireview). 1998. *Circ Res.* 83:345-352.
16. Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. 1993. *J Biol Chem.* 268(16):12069-12076.
17. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng C-F, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. 2000. *EMBO J.* 19(23):6341-6350.
18. Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. 1996. *FASEB J.* 10:631-636.

19. Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH₂-terminal kinase in ventricular muscle cells. 1998a. *J Biol Chem.* 273:5423-5426.
20. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. 1998b. *J Biol Chem.* 273:2161-2168.
21. Zarubin T, Han J. 2005. Activation and signalling of the p38 MAP kinase pathway (Minireview). *Cell Research* 15(1):11-18.
22. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. 2001. *J Mol Cell Cardiol.* 33:1637-1648.
23. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. 1997. *Nature.* 386:296-299.
24. Yang TT, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. 2002. *Mol Cell Biol.* 22:3892-3904.
25. Mackay K, Mochly-Rosen D. Localization, anchoring and functions of protein kinase C isozymes in the heart. 2001. *J Mol Cell Cardiol.* 33:1301-1307.
26. Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. 1998. *J Mol Med.* 76:725-746.
27. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42 mapk and p44 mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45 mapkk) in fibroblasts. 1993. *J Cell Biol.* 122:1079-1088.

28. Yazaki Y, Komuro I, Yamazaki T et al. Role of protein kinase system in the signal transduction of stretch-mediated protooncogene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. 1993. *Mol Cell Biochem.* 119:11-16.
29. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Mechanical stress activates protein kinases cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. 1995a. *J Clin Invest.* 96:438-446.
30. Erikson RL. Structure, expression and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. 1991. *J Biol Chem.* 266(10):6007-6010.
31. Chou MM, Blenis J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. 1995. *Curr Opin Cell Biol.* 7(6):806-814.
32. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. PDGF-and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. 1994. *Nature.* 370(6484):71-75.
33. Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey CD, Sundaravadivel B, Xu L, Mc Dermott PJ, Kuppuswamy D. C-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. 2002. *J Biol Chem.* 277(25):23065-23075.
34. Huxley AF, Niedergerke R. Measurement of the striations of isolated muscle fibres with the interference microscope. 1958. *J Physiol.* 144(3):403-425.
35. Nayler WG, Robertson PG. Mechanical alternans and the staircase phenomenon in dog papillary muscle. 1965. *Am Heart J.* 70(4):494-498.
36. Stanley EJ, Reiter M. The antagonistic effects of sodium and calcium on the action potential of guinea pig papillary muscle. 1965. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 252(2):159-172.

37. Parmley WW, Sonnenblick EH. Series elasticity in heart muscle. Its relation to contractile element velocity and proposed muscle models. 1967. *Circ Res.* 20(1):112-123.
38. Vahl CF, Bonz A, Timek T, Hagl S. Intracellular calcium transient of working human myocardium of seven patients transplanted for congestive heart failure. 1994. *Circ Res.* 74(5):952-958.
39. Bonz A, Vahl CF, Hagl S. Contractile behaviour and intracellular calcium during afterloaded contraction in mitral valve disease. 1997. *Thorac Cardiovasc Surg.* 45(6):280-286.

Material und Methoden:

40. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of the human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. 1989. *Circ Res.* 65(5):1441-1449.
41. Güth K, Wojciechowski R. Perfusion cuvette for the simultaneous measurement of mechanical, optical and energetic parameters of skinned muscle fibres. 1986. *Pflugers Arch.* 407(5):552-557.
42. Vahl CF, Bonz A, Hagl C, Hagl S. Reversible desensitization of the myocardial contractile apparatus for calcium. A new concept for improving tolerance to cold ischemia in human myocardium? 1994. *Eur J Cardiothorac Surg.* 8(7):370-378.
43. Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper G 4th, Menick DR, Zile MR, Kuppuswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. 2000. *J Biol Chem.* 275(45):35624-35630.
44. Holtzhauer M, *Biochemische Labormethoden*, 3.Auflage, 1997, S.77
45. Marquardt B, Frith D, Stabel S. 1994. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene* 9(11):3213-18.

46. Sozeri O, Vollmer K, Liyanage M, Frith D, Kour G, Mark GE 3rd, Stabel S. 1992. Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7(11):2259-62.

Diskussion:

47. Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. 2004. *Ann NY Acad Sci.* 1015:53-70.
48. Yamazaki T, Shiojima I, Komuro I, Nagai R, Yazaki Y. Interaction of cardiac myocytes and non-myocytes in mechanical stress-induced hypertrophy. 1995b. *Herz.* 20(2):109-117.
49. Kiriazis H, Gibbs CL. Papillary muscles split in the presence of 2,3-butanedione monoxime have normal energetic and mechanical properties. 1995. *Am J Physiol.* 269(5 Pt 2):H1685-94.
50. Stowe DF, Graf BM, Fujita S, Gross GJ. One-day cold perfusion of bimakalim and butanedione monoxime restores ex situ cardiac function. 1996. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):H1884-1892.
51. Koyama T, Boston D, Ikenouchi H, Barry WH. Survival of metabolically inhibited ventricular myocytes is enhanced by inhibition of rigor and SR Ca²⁺ cycling. 1996. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 2):H643-650.
52. Lopukhin SY, Peek DF, Southard JH, Belzer FO. Cold storage of the heart with University Wisconsin solution and 2,3-butanedione monoxime: Langendorff vs isolated working rabbit heart model. 1996. *Cryobiologie.* 33(1):178-185.
53. Fagbemi OS, Northover BJ. Long-term preservation of the rat isolated heart with staurosporine and 2,3-butanedione monoxime. 1995. *Transplantation.* 59(7):947-951.

54. Bauza G, Le Moyec L, Eugene M. pH regulation during ischaemia-reperfusion of isolated rat hearts, and metabolic effects of 2,3-butanedione monoxime. 1995. *J Mol Cell Cardiol.* 27(8):1703-1713.
55. Kivisto T, Makiranta M, Oikarinen EL, Karhu S, Weckstrom M, Sellin LC. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) increases initial yields and improves long-term survival of isolated cardiac myocytes. 1995. *Jpn J Physiol.* 45(1):203-210.
56. Hebisch S, Bischoff E, Soboll S. Influence of 2,3-butanedione monoxime on heart energy metabolism. 1993. *Basic Res Cardiol.* 88(6):566-575.
57. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. 1997. *Annu Rev Physiol.* 59:551-571.
58. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by 70 kD S6 protein kinases. 1992. *Cell.* 69:1227-1236.
59. Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y et al. Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. 1990. *J Biol Chem.* 265:3595-3598.
60. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaption of cultured cardiac cells: an in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. 1992. *J Biol Chem.* 267:10551-10560.
61. Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van Bilsen M et al. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. 1993. *Annu Rev Physiol.* 55:77-95.
62. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. 1988. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:339-343.

63. Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. 1993. *Annu Rev Physiol.* 55:55-75.
64. Morgan HE, Baker KM. Cardiac hypertrophy. 1991. *Circulation.* 83:13-25.
65. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. 1992. *Sciences.* 258(5082):607-611.
66. Keenan C, Kelleher D. Protein kinase C and the cytoskeleton. 1998. *Cell Signal.* 10(1):225-232.
67. Mellor H, Parker PJ. The extended PKC superfamily. 1998. *Biochem J.* 332:281-292.
68. Seko Y, Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125^{Fak}) in cultured rat cardiac myocytes. 1999. *Biochem Biophys Res Commun.* 259:8-14.
69. Clerk A, Sugden PH. Specific signalling from PKC isoforms to MAPK cascades. 2001. *Circ Res.* 89(10):847-853.
70. Pan J, Singh US, Takahashi T, Oka Y, Palm-Leis A, Herbelin BS, Baker KM. PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. 2005. *J Cell Physiol.* 202:536-553.
71. Strait JB, Samarel AM. Isoenzyme-specific protein kinase C and c-Jun N-terminal kinase activation by electrically stimulated contraction of neonatal rat ventricular myocytes. 2000. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1553-1566.
72. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. 1996. *J Biol Chem.* 271(52):33592-33597.

73. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. 1993. FEBS Lett. 317:271-275.
74. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. 1994. J Biol Chem. 269:32848-32857.
75. Post GR, Goldstein D, Thuerauf DJ, Glembotski CC, Brown JH. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. 1996. J Biol Chem. 271:8452-8457.
76. Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Yamashita T, Ishido S, Hotta H, Yokoyama M. Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. 2000. J Mol Cell Cardiol. 32:947-960.
77. Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Bogoyevitch MA, Cowley S, Sugden PH. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. 1995. J Biol Chem. 270:28092-28096.
78. Thorburn J, Frost JA, Thorburn A. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. 1994. J Biol Chem. 269:1565-1572.
79. Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, Mc Donough PM, Glembotski CC. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization and cardiac-specific gene expression. 1997. J Cell Biol. 139:115-127.

80. Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJ, Steyger PS, Roberts CT Jr. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. 1999. *J Biol Chem.* 274:24858-24864.
81. Schönwasser D, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isotypes. 1998. *Mol Cell Biol.* 18(2):790-798.
82. Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. 1993. *EMBO.* 12:1681-1692.
83. Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. 2002. *Hypertension.* 39:233-238.
84. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. 2000. *Cell Signal.* 12:1-13.
85. Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. 1997. *Science.* 275:90-94.
86. Clerk A, Sugden PH. Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-jun transcription factors in rat ventricular myocytes. 1997. *Biochem J.* 325:801-810.
87. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. 1996. *Circ Res.* 79:161-172.

88. Maulik N, Watanabe M, Zu YL, Huang CK, Cordis GA, Schley JA, Das DK. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. 1996. FEBS Lett. 396:233-237.
89. Zu YL, Ai Y, Gilchrist A, Maulik N, Watras J, Sha'afi RI, Das DK, Huang CK. High expression and activation of MAP kinase activated protein kinase 2 in cardiac muscle cells. 1997. J Mol Cell Cardiol. 29:2159-2168.
90. Clifton AD, Young PR, Cohen P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. 1996. FEBS Lett. 392:209-214.
91. Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. 1995. Mol Cell Biol. 15:505-516.
92. Fukunaga R, Hunter T. MNK-1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying a protein kinase. 1997. EMBO J. 16:1921-1933.
93. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. 1997. EMBO J. 16:1909-1920.
94. Petrich BG, Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodelling and heart failure-new insights from transgenic studies. 2004. Trends Cardiovasc Med. 14:50-55.
95. Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodelling and restrictive cardiomyopathy. 2001. Proc Natl Acad Sci USA. 98(12):283-288.
96. Zhang S, Weinheimer C, Courtois M, et al. The role of the grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. 2003. J Clin Invest. 111:833-841.

97. Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molkentin JD. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. 2003. *J Clin Invest.* 111(10):1475-1486.
98. Molkentin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. 2000. *Circ Res.* 87:731-738.
99. Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y, Xiao RP. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. 2002. *Circ Res.* 90(2):190-196.
100. MacKenna DA, Dolfi F, Vuori K, Ruoslahti E. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. 1998. *J Clin Invest.* 101(2):301-310.
101. Papakrivopoulou J, Lindahl GE, Bishop JE, Laurent GJ. Differential roles of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38MAPK in mechanical load-induced procollagen alpha(I) gene expression in cardiac fibroblasts. 2004. *Cardiovasc Res.* 61(4):736-744.
102. See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, Itescu S, Krum H. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodelling following myocardial infarction in the rat. 2004. *J Am Coll Cardiol.* 44(8):1679-1689.
103. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. 2001. *Physiol Rev.* 81:807-869.
104. Barr RK, Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). 2001. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:1047-1063.

105. Choukroun G, Hajjar R, Fry S, et al. Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH₂-terminal kinases. 1999. *J Clin Invest.* 104:391-398.
106. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling. 2003. *Circ Res.* 93:874-883.
107. Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, et al. The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. 2002. *J Clin Invest.* 110:271-279.
108. Petrich BG, Molkenin JD, Wang Y. Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via creloxp-mediated DNA recombination. 2003. *FASEB J.* 17:749-751.
109. McDonough PM, Hanford DS, Sprenkle AB, Mellon NR, Glembotski CC. Collaborative roles for c-Jun N-terminal kinase, c-Jun, serum responsive factor and Sp1 in calcium-regulated myocardial gene expression. 1997. *J Biol Chem.* 272:24046-24053.
110. Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. 1995. *J Biol Chem.* 270(50):29710-29717.
111. Stewart MJ, Thomas G. Mitogenesis and protein synthesis: a role for ribosomal protein S6 phosphorylation. 1994. *BioEssays.* 16:809-815.
112. Laser M, Kasi VS, Hamawaki M, Cooper IV G, Kerr CM, Kuppuswamy D. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. 1998. *J Biol Chem.* 273(38):24610-24619.

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Georg Ertl für die Förderung und Initiierung dieser Arbeit danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kai Schuh danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein herzlicher Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bonz und Dr. med. Ulrich Hofmann für das entgegengebrachte Vertrauen, ihre ständige, motivierende Unterstützung und intensive Betreuung, die es mir möglich machten, wissenschaftliches Arbeiten kennen zu lernen.

Dr. med. Martin Laser danke ich für die Anregung der Themenwahl dieser Arbeit und die Betreuung, am Ende auch über einige Kilometer Entfernung.

Für das freundliche, einmalige Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden möchte ich Katharina Meder, Stefan Heuer, Kathrin Römer, Anni Thoma und Hong Han danken. Marco Abesser, Kai Han, Charlotte Dienesch, Helga Wagner und Rougxue Wu danke ich für ihre spontane Hilfe im Laboralltag.

Hervorheben möchte ich Dr. med. Oliver Ritter, dessen kompetente Ratschläge für mich von großem Wert waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Daniel, der immer für mich da war und mich mit viel Geduld immer wieder in meiner Arbeit bestärkte. Auch meiner Großmutter und meinen Eltern, den ich diese Arbeit widmen möchte, möchte ich von ganzem Herzen danken, denn ohne sie wären weder das Studium noch die Promotion möglich gewesen.

Lebenslauf

Personalien:

Name: Mandy Weißenburg
Geburtsdatum: 14.09.1979
Geburtsort: Halle/ Saale
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1986 – 1991 Grundschule Bennstedt
1991 – 1998 Landesgymnasium August-Hermann-Francke, Halle/ Saale
Juni 1998 Abitur

Hochschulausbildung:

April 1999 Aufnahme des Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen
März 2001 Ärztliche Vorprüfung in Göttingen
März 2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Göttingen
Oktober 2002 Wechsel des Studienortes, Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
September 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Würzburg
Oktober 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Würzburg

Berufliche Tätigkeit:

seit Februar 2006 Assistenzärztin in der Medizinischen Abteilung des Spitals Schwyz, Schweiz