

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Komm. Direktor: PD Dr. Michel Noutsias)

Einfluss von lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1) und Protein-Kinase B (PKB) auf Hypertrophie und Zellzyklusaktivität von perinatalen Kardiomyozyten im Mausmodell in vivo

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jan Deichmann
geboren am 08.10.1980 in Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Henning Ebelt
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Laufs
3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Simm

25.09.2018

20.08.2019

Meiner Familie

Referat

Die koronare Herzerkrankung und der Myokardinfarkt gehören in den Industrienationen zu den Haupttodesursachen. Laut statistischem Bundesamt sind 2014 in Deutschland über 70.000 Menschen an einer chronischen ischämischen Herzkrankheit und über 50.000 Menschen an einem Myokardinfarkt verstorben. Trotz großen technischen Aufwandes mittels interventioneller Katheteruntersuchungen und einer Vielzahl pharmakologischer Behandlungsoptionen bleibt dieses Krankheitsbild angesichts der hohen Prävalenz von gesundheitspolitischer und sozioökonomischer Relevanz. Aus diesem Grund wurde der Suche nach alternativen und insbesondere regenerativen Therapieansätzen in den letzten Jahren großes wissenschaftliches Interesse zu teil. Diese Arbeit möchte zum weiteren Verständnis von Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene beitragen und untersucht daher den Einfluss von lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1) und der Protein-Kinase B (PKB) auf Hypertrophie und Zellzyklusaktivität von perinatalen Kardiomyozyten im transgenen Mausmodell.

Die Untersuchung erfolgte an α MHC-nls-LacZ transgenen Mäusen mit einem Alter von drei und sieben Tagen. Das LacZ-Gen codiert für die β -Galactosidase und ermöglicht die gezielte Anfärbung von Kardiomyozyten. In dieser Arbeit erfolgt die gezielte Expression von Lef-1 und PKB in Kardiomyozyten mittels adenoviraler Vektoren. Es werden zur Auswertung die Parameter Herzgewicht, Zellzyklusaktivität, Apoptose, Hypertrophie, Kollagenfraktion und Proteinexpression herangezogen.

Die Auswertung ergibt für konstitutiv-aktives Lef (Lef-CA) in erster Linie einen Einfluss auf Zellhypertrophie durch eine Zunahme des Zellvolumens und des relativen Herzgewichts. Zudem kann auf molekularer Ebene ein Anstieg von Cyclin D3 beobachtet werden.

Unter aktivierter PKB hingegen zeigt sich insbesondere ein Einfluss auf die extrazelluläre Matrix durch einen vermehrten Anteil an Gefäßendothel, interstitiellem Kollagen und Gesamtkollagen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die gezielte Aktivierung von Lef oder PKB in den Herzen von neonatalen Mäusen in vivo zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Zellzyklusaktivität und die Komposition der Extrazellulärmatrix führt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1	Myokardinfarkt	2
1.1.2	Remodeling	3
1.2	Zellzyklus	5
1.3	Apoptose	8
1.4	Lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1)	10
1.5	Proteinkinase B (Akt)	13
1.6	β -catenin	16
1.7	Glycogen-Synthase-Kinase	17
1.8	D-Cycline	19
2	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Material und Methodik	22
3.1	Materialien, Geräte, Programme	22
3.2	Chemikalien, Enzyme, Lösungen	23
3.2.1	Chemikalien	23
3.2.2	Enzyme, Antikörper	24
3.2.3	Lösungen, Reagenzien	26
3.3	Versuchstiere	27
3.3.1	Haltung	27
3.3.2	Adenovirale Konstrukte	28
3.4	Virusinjektion	29
3.5	Herzisolierung	30
3.6	Histologie	30
3.6.1	Herstellung der Gewebeschnitte	30
3.6.2	Bestimmung der Zellzyklusaktivität mittels Anti-BrdU-Färbung	30
3.6.3	Apoptose-Detektion mittels TUNEL-Färbung	33
3.6.4	Quantifizierung der Größe der Kardiomyozyten	34
3.6.5	Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes des Myokards	36
3.7	Bestimmung der Protein-Expression	38
3.7.1	Proteinextraktion und -quantifizierung	38
3.7.2	SDS-PAGE	38
3.8	Statistik	40
4	Ergebnisse	41

INHALTSVERZEICHNIS

4.1 Morphometrie.....	41
4.2 Bestimmung der Zellzyklusaktivität	44
4.3 Apoptose	45
4.4 Hypertrophie	46
4.5 Interstitielle Kollagenfraktion	47
4.6 Molekularbiologische Analysen.....	50
4.6.1 Cyclin D1	52
4.6.2 Cyclin D3.....	53
4.6.3 GSK-3	54
4.6.4 β -catenin	55
4.7 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	56
5 Diskussion	57
5.1 Lef-1 58	
5.2 Proteinkinase B.....	64
5.3 Zusammenfassung	69
6 Literaturverzeichnis.....	70
7 Thesen	80

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AK	Antikörper
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AU	willkürliche Einheit (arbitrary unit)
Bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
CAK	CdK-aktivating kinase
CdK	cycline dependent kinase
CKI	CdK-Inhibitor-Protein
DAB	Diaminobenzidin
Dvl	Dishelleved Protein
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	deoxyuridine triphosphate nucleotides
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
GH	growth hormone
GSK	Glykogen Synthase Kinase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

HRP	horse-radish peroxidase
IGF	insulin-like growth factor
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Lef	lymphoid enhancer factor
kDa	kilo Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
Min	Minuten
NLS	nuclear localization sequenz
NSTEMI	non-ST-elevation infarction
PBS	phosphate buffered saline
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
TBT	Tris-buffered Tween
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
Sek	Sekunde
STEMI	ST-elevation infarction
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) zählt in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen [1]. Sie ist Folge eines chronischen atherosklerotischen Prozesses, welcher durch pathomorphologische Veränderungen der Gefäßwand und konsekutiven Verengungen der koronaren Herzgefäße gekennzeichnet ist [2]. Als anerkannte Risikofaktoren gelten unter anderem Alter, Geschlecht, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Rauchen, Adipositas, Bewegungsmangel und eine positive Familienanamnese [3]. Bei fortschreitendem Krankheitsverlauf können sich kardiale Ischämien bis zu einem fulminant verlaufenden Myokardinfarkt entwickeln. Symptomatisch werden die Patienten meist durch ein Akutes Koronarsyndrom (ACS).

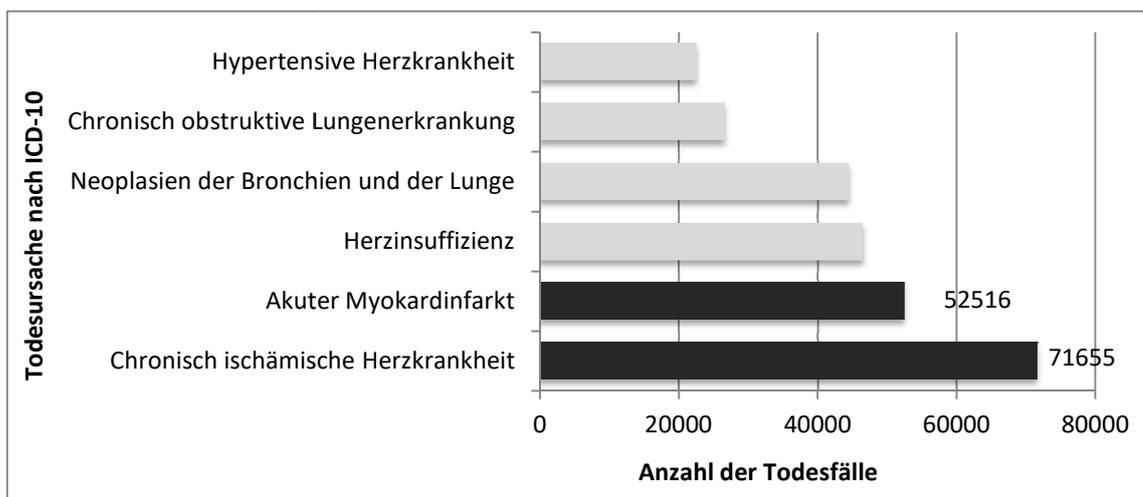


Abbildung 1: Statistisches Bundesamt. Häufigste Todesursachen nach ICD-10 in Deutschland 2014 [1].

Zu Beginn der KHK entstehen Endothelläsion aufgrund eines oder mehrere Risikofaktoren (2). Dies zieht eine Akkumulation von extrazellulären Lipoproteinen in der Intima und Expression von Adhäsionsmolekülen und Glykoproteinen mit folgender Adhäsion und Invasion von Leukozyten nach sich (3). Durch Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt es zur Entzündungsreaktion. Monozyten phagozytieren Lipide und werden zu lipidbeladenen Makrophagen oder Schaumzellen, glatte Gefäßmuskelzellen werden in Migration und

EINLEITUNG

Wachstum aktiviert; Mediatoren verursachen die Expression von *tissue factor* und Proteasen, welche den bindegewebigen Mantel um den Herd weiter schwächen (4). Beim Rupturieren der fibrösen Kappe, kommt es zu einer prokoagulatorischen Reaktion, bei der Thromben entstehen. Ein ACS kann die Folge sein (5). Bei einem Gleichgewicht zwischen prokoagulatorischen und fibrolytischen Prozessen, kann es zu einer Auflösung des Thrombus kommen (6). Allerdings kann die induzierte Thrombogenese zu einem weiteren Anstieg von Kollagen und dem Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen in der Plaque beitragen. Dies führt zu einer Zunahme der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand-Abschnitte und häufig zu kalzifizierenden Plaques (7), deren Progredienz zu pectanginösen Beschwerden führen und zur Manifestation der KHK führen kann [4].

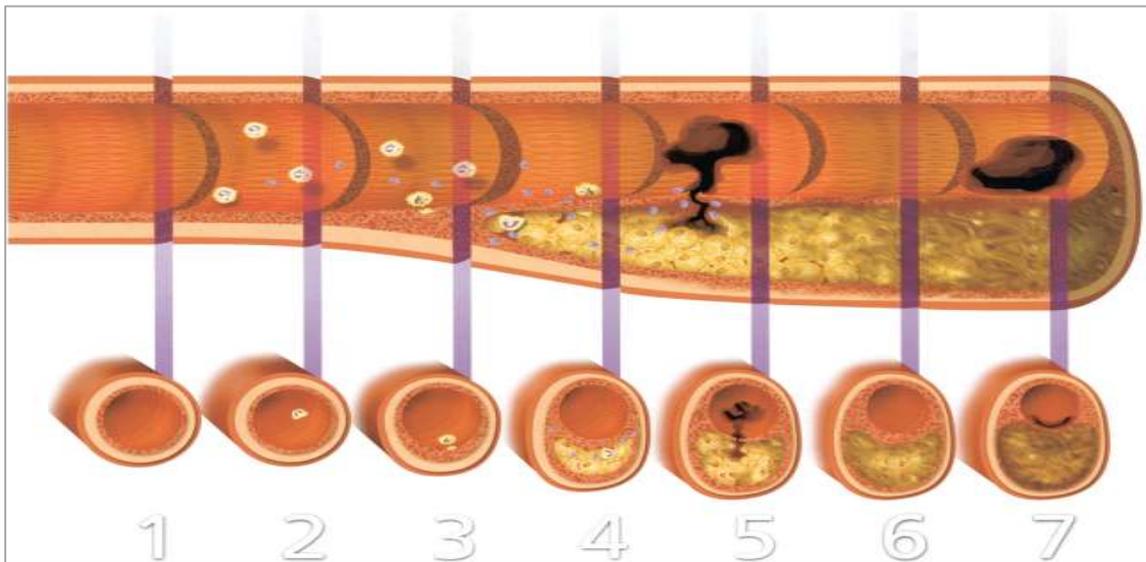


Abbildung 2: Entwicklung der Atherosklerose nach Libby [4]. Oben: Longitudinaler Anschnitt einer regelrechten Arterie (1) bis hin zur stenotisch veränderten Atherosklerose (5,6,7). Unten: Korrespondierende Querschnitte der Arterie.

1.1.1 Myokardinfarkt

Das ACS ist eine häufige klinische Manifestation der sich progredient entwickelnden koronaren Herzerkrankung. Auf der Grundlage von elektrokardiographischen und biochemischen Markern wird zwischen der instabilen Angina pectoris, dem *non-ST-elevation myocardial infarction* (NSTEMI) und dem *ST-elevation myocardial infarction* (STEMI) unterschieden. Die Progredienz der Atherosklerose beginnt schleichend und

manifestiert sich häufig erstmalig durch eine typische thorakale Schmerzsymptomatik bei Belastung, welche Ausdruck einer Sauerstoffminderversorgung des kardialen Muskelgewebes ist. Dem vitalbedrohenden Akutereignis liegt meist eine atherothrombotische Genese zu Grunde. Solche Thromben können auf der Basis einer rupturierten oder erudierten Plaque entstehen und einen akuten Verschluss von Gefäßen zur Folge haben [5]. Die Übergänge zwischen diesen Verläufen sind fließend. Das kardiale Muskelgewebe, welches von der Versorgung atherosklerotisch veränderter Gefäße abhängt, läuft zuletzt Gefahr bei dauerhafter oder akuter Minderperfusion unterzugehen.

1.1.2 Remodeling

Nach einem Myokardinfarkt unterliegt das Myokard einer Reihe von spezifischen Umbauprozessen, die unter dem Begriff *remodeling* beschrieben werden. Das *remodeling* ist dabei als ein kardialer Anpassungsprozess der Kardiomyozyten, des Bindegewebes und der Gefäßversorgung zu verstehen, der eine Antwort auf veränderte Anforderungen oder Voraussetzungen, beispielsweise bei einem Myokardinfarkt und einer Kardiomyopathie, darstellt. Unter dem Einfluss von mechanischen, neurohumoralen und genetischen Faktoren entstehen Veränderung der Ventrikelgröße, Ventrikelform und Ventrikelfunktion [6]. In der Frühphase nach einem Myokardinfarkt, kommt es durch proteolytische Abbauprozesse von Serinproteasen zur Reduzierung kollagener Anteile und zu einer Expansion der Infarktzone. Die Folge ist eine konsekutive Dilatation des Ventrikels und eine erhöhte Wandspannung.

$$K = \frac{p \times r}{2 \times d}$$

Abbildung 3: Gesetz nach LaPlace. Die Wandspannung K verhält sich proportional zum Radius r. Das heißt, bei großer Infarktzone und entsprechend großer Dilatation vergrößert sich der Radius des Ventrikels und es kommt zu einer Vergrößerung der Ventrikelspannung. K = Wandspannung, p = transmuraler Druck, r = Radius, d = Wanddicke.

In dieser strukturellen schwachen Phase besteht das besondere Risiko der Ausbildung eines Aneurysmas oder einer Ventrikelruptur. Im weiteren Ablauf führt eine Stimulation

EINLEITUNG

von dehnungssensiblen Mechanorezeptoren, die durch eine progressive Dilation aktiviert werden, zu einer vermehrten Ausschüttung von Angiotensin-II, welches für seine hypertrophiestimulierende Wirkung bekannt ist [7]. In der sich ca. ab dem dritten Tag anschließenden Spätphase kommt es in einer bis zu Monate anhaltenden Umstrukturierung und Fortsetzung hypertropher Prozesse und Veränderungen der Ventrikelarchitektur, bis ein Gleichgewicht zwischen Wandspannung und Festigkeit der Narbe durch Ausbildung von kollagenem Bindegewebe entstanden ist. Kardiomyozyten können unter diesen Umständen bis zu 70% ihres Volumens zunehmen [8]. Das Ausmaß dieses Prozesses wird unter anderem durch Größe, Lokalisation, Vaskularisation und Ausdehnung (transmural vs. nicht transmural) der Infarktzone bestimmt. Die funktionelle Einschränkung betroffener Myokardanteile, geht häufig mit einer kontraktiven Dysfunktion (*stunned myocardium*) und einem reduzierten Stoffwechsel (*hibernating myocardium*) einher [9, 10].

Neben den genannten pathologischen Prozessen, ist die kardiale Hypertrophie auch als ein wesentlicher Bestandteil einer gesunden Entwicklung zu verstehen. Wir finden diese während des normalen Wachstums und bei sportlichem Training als Teil physiologischer Konditionierung und Anpassung. Interessanter Weise werden diese physiologischen Prozesse zum großen Teil über Wachstumshormone, wie den *insulin-like growth factor* (IGF) und das *growth hormone* (GH) unter Einbeziehung des PI3/Akt Signalweges aktiviert und unterliegen damit einem anderen Regulationsmechanismus als bei krankhaften Stimuli [10, 11]. Dem gegenüber steht der pathologische Stimulus bei einem chronisch überlasteten Herzmuskel, dessen Persistenz ein *adverse remodeling* des Herzmuskels zur Folge hat, was langfristig in eine funktionelle Dekompensation bzw. Herzinsuffizienz führen kann. Zu bekannten Auslösern zählen neben der ischämischen Kardiomyopathie und dem Herzinfarkt auch die chronische arterielle Hypertonie, Klappenvitien, Myokarditis, angeborene und familiäre Prädispositionen sowie die dilatative Kardiomyopathie [10]. Biomechanischer Stress und neurohumorale Mediatoren führen hier an der Zellmembran u.a. zur Aktivierung heterodimerer G-Proteine (Gq und G11). Interessanter Weise haben beide Regulationsmechanismen die Proteinkinase B zum Ziel [11].

Eine Aktivierung der physiologische Signalkaskade bei Kardiomyozyten im Mausmodell konnte über einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor durch Wachstumshormone nachgewiesen werden und in diesem Zusammenhang eine Translokation und Aktivierung von p110 α ,

einer Klasse IA Untergruppe der PI3-Kinase. Für den pathologischen Weg hingegen scheint die Aktivierung über ein G-Protein Gq bzw. G11 von zentraler Bedeutung. Während p110 α im physiologischen Signalweg exprimiert wird, finden sich im pathologischen Signalweg eine Erhöhung von p110 γ , ebenfalls eine Klasse IB Untereinheit der PI3-Kinase. Beiden Signalwegen ist die Effektor-Kinase PKB gemein. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Akt der alleinige Regulator zwischen physiologischem und pathologischem Signalweg darstellt. Vermutet werden Einflüsse der Konzentration und der Dauer einer Konzentrationserhöhung sowie weitere Signalkaskaden, die eine physiologische und pathologische Hypertrophie stimulieren [11].

1.2 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist der geregelte Ablauf von Ereignissen in eukaryontischen Zellen zwischen den einzelnen Zellteilungen mit dem Ziel, die genetische Information der Zelle identisch zu verdoppeln und auf zwei Tochterzellen zu verteilen [12]. Dieser Ablauf wird in vier Phasen aufgeteilt: der Zellteilungsphase (Mitose) und der Interphase bestehend aus G1-Phase (*g = gap*), S-Phase (*s = synthesis*) und G2-Phase.

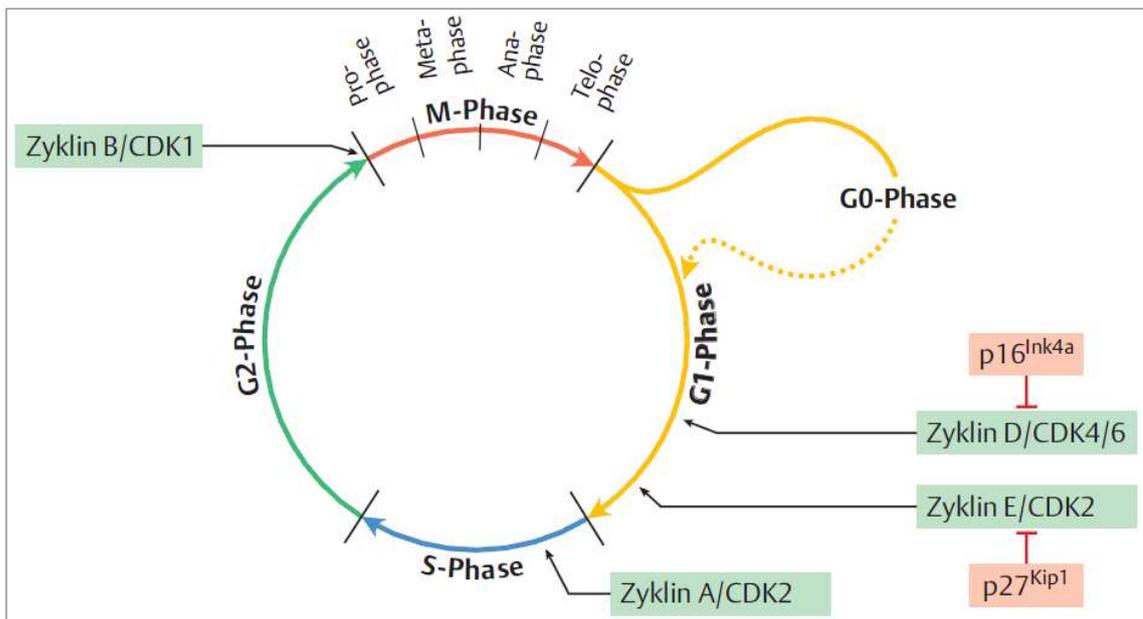


Abbildung 4: Phasen des Zellzyklus und deren Kontrolle [12].

EINLEITUNG

Die einzelnen Phasen unterliegen einer strengen Kontrolle durch regulatorische Proteine, überwiegend Kinasen, mit verschiedenen Regulationsfaktoren und Restriktionspunkten (*checkpoints*). Die G1-Phase steht in erster Linie im Zeichen des Zellwachstums und der Synthese notwendiger Proteine für die sich anschließende DNA-Replikation. Am G1-Ende kommt es im Rahmen des G1-*checkpoints* zu einer Prüfung auf die notwendigen Voraussetzungen für einen Eintritt in die Synthese-Phase (S-Phase), welche maßgeblich durch die Zellgröße, die Integrität der DNA und die Verfügbarkeit von Proteinen und Nukleinsäuren bestimmt wird. In der S-Phase kommt es dann zur Verdopplung des Genoms, so dass jedes Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden besteht. In der darauf folgenden G2-Phase werden insbesondere RNA und Proteine für die Zellteilung synthetisiert, und es kommt zum Ablauf kontrollierender Mechanismen, die Fehler der Mitose verhindern sollen. So vorbereitet und den Restriktionspunkt der G2-Phase passierend, tritt die Zelle in die Zellteilung ein, in der je ein Ein-Chromatid-Chromosom durch den Spindelapparat in das jeweilige Zytoplasma, der sich neu bildenden Tochterzellen transportiert wird [13]. Im Ablauf des Zellzyklus gibt es mehrere Restriktionspunkte, die den Zyklus kontrollieren und gegebenenfalls anhalten oder abbrechen können. Maßgeblich für die Abfolge der Prozesse und die Regulation des Zyklus sind Cycline und die Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CdK), als sogenannter Cyclin/CdK-Komplex.

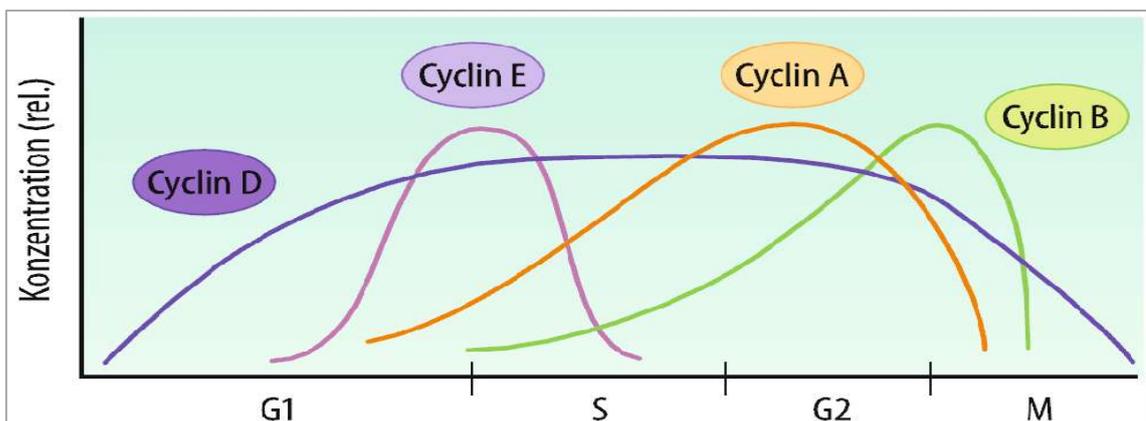


Abbildung 5: Oszillierende Expression von Cyclinen während des Zellzyklus (aus [13]).

Cycline sind zyklisch exprimierte Proteine, die CdKs als heterodimeren Cyclin/CdK-Komplex aktivieren können und einer phasenweise verlaufenden Synthese bzw. Abbau unterliegen. Cycline sind dabei die regulatorische Komponente und können

EINLEITUNG

verschiedene CdKs binden. CdKs selbst hingegen sind während des gesamten Zellzyklus relativ konstant vorhanden. Sie werden neben den Cyclinen zusätzlich durch reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung, spezifischer Inhibitorproteine (CKI) und die Regulation der subzellulären Lokalisation beeinflusst. Eine Kernlokalisierungssequenz (NLS, *nuclear localisation sequence*) ermöglicht das gerichtete Erreichen des Zellkerns.

Die Aktivität des Cyclin/CdK-Komplexes wird durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert. Bei CdK1 wirkt beispielsweise die Phosphorylierung am Threonin 161 aktivierend, eine Phosphorylierung an Threonin 14 oder Tyrosin 15 hingegen inhibierend. Eine solche Stimulierung erfolgt u.a. durch die CdK-activating Kinase (CAK), ein konstitutiv exprimiertes Dimer aus Cdk7 und Cyclin H oder die Cdc25-Phosphatase. Eine Hemmung hingegen erfolgt durch die Wee1- und Myt1-Kinase oder die *cyclin-dependent kinase inhibitors* (CKIs), welche in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die Ink4-Familie bestehend aus p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d} und der Cip/Kip-Familie bestehend aus p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Die Ink4-Familie bindet und hemmt spezifisch die Cdk4 und Cdk6 und induziert eine Arretierung der G1-Phase, während die CKIs der Cip/Kip-Familie eine wesentlich breitere Spezifität für Cyclin D-, E- und A-abhängige Kinasen zeigen [12-14].

Bei der Regulation des G1/S-Überganges kommt Cyclin D (D1, D2 und D3) eine besondere Bedeutung zu. D-Cycline binden bevorzugt an Cdk4 und Cdk6 und ermöglichen in Form des Cyclin D/Cdk4-Komplexes, die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und damit die Einleitung der für die S-Phase notwendigen Synthese von Proteinen. Die Aktivierung des Cyclin D/Cdk4-Komplexes inaktiviert durch Phosphorylierung die Familie der RB- (Retinoblastom)-Proteine. Das RB-Protein ist ein Protein, dessen regulatorische Komponente im Zellzyklus von zentraler Bedeutung ist. Es bindet E2F an der zentralen Transaktivierungsdomäne, wodurch die Transkription vieler Gene blockiert wird. Des Weiteren verfügt das RB-Protein über 16 potentielle Cdk-Phosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierung notwendige Voraussetzung für die Freisetzung von E2F ist. Die eingeleitete partielle Phosphorylierung durch den Cyclin D/Cdk4-Komplex ermöglicht die Transkription von Cyclin E1 und E2, die ihrerseits als Cyclin E/Cdk2 zusammen mit Cyclin A/Cdk2 die vollständige Phosphorylierung des RB-Proteins realisieren. Dieser Prozess kann durch CKIs inhibiert werden. P16^{Ink4a} vermag beispielsweise Cyclin D/Cdk4 und p21^{kip1} Cyclin

E/Cdk2 zu inhibieren und den Zellzyklus zu arretieren [12, 13, 15]. Cdk2 dominant-negative Zelllinien und gegen Cdk2 gerichtete Antikörper führen zu einem Arrest des Zellzyklus in menschlichen Tumorzellen [16].

1.3 Apoptose

Die Apoptose ist ein durch innere oder äußere Auslöser hervorgerufener, von der Zelle kontrollierter aktiver Prozess, der zum Absterben der Zelle führt [12]. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es nicht zu einem unkontrollierten Platzen der Zellen und Ausströmen intrazellulärer Bestandteile. Sie ist damit ein kontrolliert ablaufender programmierter Zelltod ohne begleitende Entzündungsreaktion. Morphologisch ist dieser Prozess von der Schrumpfung der Zelle, einer erhöhten Dichte, dem Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen und Kondensation des Chromatins gekennzeichnet. An der Zellmembran kommt es zur mikroskopisch sichtbaren Bildung von Bläschen (blebbing) und Fortsätzen (budding phenomenon), aus denen später die *apoptotic bodies* entstehen. Während Endonukleasen die DNA in circa 200 bp große Fragmente zerteilen, zerfällt die Zelle letztendlich in *apoptotic bodies*, welche durch Monozyten phagozytiert werden [12, 13, 17].

Der Apoptose kommt bei der Entwicklung des Organismus eine besondere Bedeutung zu. Sie ist unabdingbar bei der Differenzierung von Organen und Gliedmaßen, so z.B. bei der Ausbildung von Händen und Fingern sowie bei der Entwicklung eines hochdifferenzierten Nervengewebes. Bei der Ausbildung des Immunsystems ist es von entscheidender Bedeutung, dass Immunzellen, die sich gegen den eigenen Organismus richten, in die Apoptose überführt werden, um autoimmune Entwicklungen zu unterbinden. Dies trifft beispielsweise bei über 90% der gebildeten Lymphozyten zu. Des Weiteren ist die Apoptose ein regulierender Bestandteil stark proliferierender Gewebe, wie bei Schleimhäuten und dem Knochenmark. Eine beeinträchtigte Funktion der Apoptose ist daher häufig Grundlage für kanzerogene Prozesse. Zellen mit beschädigter DNA, deren Reparaturmöglichkeiten erschöpft oder defekt sind, können durch Lymphozyten in die Apoptose überführt werden und einen organschädigenden Prozess abwenden [12, 13].

Zur Einleitung der Apoptose kann es auf einem extrinsischen und intrinsischen Weg kommen, die maßgeblich durch Caspasen, die Bcl-Proteine und *inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs) reguliert werden. Caspasen sind katalytisch wirkende proteolytische

EINLEITUNG

Cysteinproteasen, welche Proteine an Aspartyl-Resten spalten. Alle Caspasen liegen intrazellulär als enzymatisch inaktive Pro-Caspasen vor. Ihre Aktivierung erfolgt durch Proteolyse. Die sogenannten Effektorcaspasen (3, 6 und 7), führen proteolytische Spaltung durch und können damit z.B. Reparaturenzyme und die Proteinkinase C inaktivieren. Durch Proteolyse des Inhibitors der Caspase-aktivierten DNase wird diese aktiviert und beginnt die Fragmentierung der DNA.

Die extrinsische Aktivierung der Apoptose erfolgt über einen Rezeptor der Tumornekrose-Faktor-Superfamilie (TNFR). Zu ihnen zählen TNFR-1, Fas (= CD95, APO-1) und die TRAIL-Rezeptoren. Werden über diese Rezeptoren spezifische Moleküle gebunden, bewirken sie über ihre zytosolische Domäne das Binden von Adaptermolekülen. Der *death-inducing signaling complex* (DISC) bindet die Initiatorcaspase 8 über das *fas-associated death domain protein* (FADD). Caspase 8 besitzt nur eine geringe katalytische Aktivität, führt aber aufgrund der Konzentrationserhöhung am DISC zur autokatalytischen Spaltung von Caspase 8 selbst, welche dann die Effektorcaspase 3 aktiviert [18].

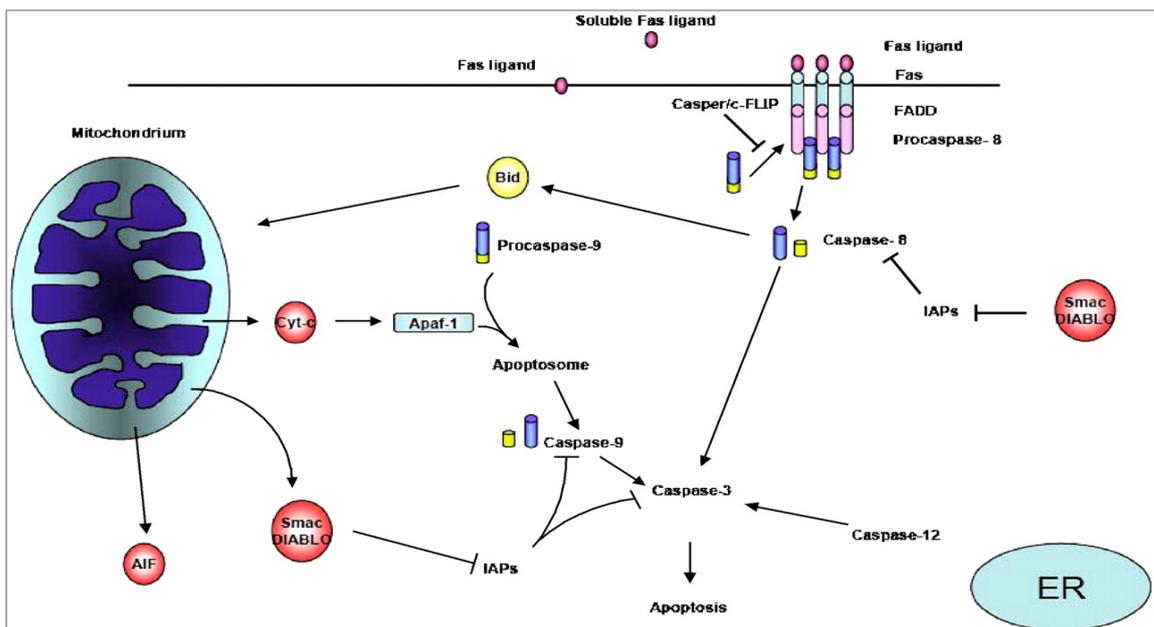


Abbildung 6: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg (aus [19]). TNF = Tumornekrosefaktor, TNFR = Tumornekrosefaktor Rezeptor, FADD = fas-associated death domain protein, tBid = truncated Bid, löst die Freisetzung von Cyt-C aus, Cyt-c = Cytochrom C, ER = endoplasmatisches Retikulum, AIF = apoptosis-inducing factor, IAPs = inhibitory of apoptosis proteins.

EINLEITUNG

Die intrinsische Aktivierung beruht maßgeblich auf der Destruktion der Zellmembran der Mitochondrien und der damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom C. Die Mitochondrienmembran wird durch ein Gleichgewicht von anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xL und pro-apoptotischen Proteinen Bid, Bad und Bim stabilisiert. Bei erhöhtem zellulären Stress, DNA-Schäden oder insbesondere bei durch Caspase 8 aktiviertem Bid, kommt es bei zunehmendem Ungleichgewicht dieser Faktoren zur Öffnung der *mitochondrial permeability transition pores* (MPTP). Dadurch kommt es zum Zusammenbruch des Membranpotentials und Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C, Smac/DIABLO, Edonuklease G und apoptosis-inducing factor (AIF). Cytochrom C bindet spezifisch an den monomeren *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf1). Dieser ändert darauf seine Konformation und es kommt zur Bildung eines Apaf1-Heptamers, dem Apoptosom. Dieses ist in der Lage, Caspase 9 zu binden und in aktive Caspase-9-Dimere zu überführen, welche ihrerseits die Caspase 3 aktivieren. Smac/DIABLO ist ein Inhibitor der IAPs und verhindert nach seiner Freisetzung eine weitere Hemmung der Caspase 3, 6 und 9 [12, 13, 17, 19].

Die Apoptose ist bei zahlreichen Erkrankungen Bestandteil pathogener Prozesse, so auch bei verschiedenen Herzerkrankungen. Es kommt dabei zur intrinsischen Aktivierung der Apoptose vor allem durch Hypoxie, Ischämie, Reperfusion sowie oxidativem Stress und der damit verbundenen Spaltung und Inaktivierung essentieller myokardialer Proteine [20]. Auf extrinsischer Ebene konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass eine verminderte Anzahl von Fas eine reduzierte Infarktgröße und Apoptoserate nach Koronarischämie zur Folge hat [21]. Bei Herzinsuffizienz kommt es nachweislich zu einem erhöhten Anteil zirkulierender Fas-Liganden [22].

1.4 Lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1)

Lef-1 ist ein auf Chromosom 4 lokalisiertes Gen, das für ein 54 kDa großes nukleares Protein kodiert und mit *T cell factor* Tcf-1, Tcf-3 und Tcf-4 zur Lef/Tcf - Familie gehört. Die anfänglich in T- und B-Zellen beobachtete Expression ist Bestandteil in einer Reihe maßgeblicher Schnittstellen, die vornehmlich Organentwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose, Polarität und Zellbewegung betreffen [23, 24]. Im Zuge der Organogenese und zellulären Differenzierung wird die Expression von Lef/Tcf-Proteinen herunter reguliert bzw. bei terminaler Differenzierung mitunter beendet. Dabei sind eine Reihe stark proliferierender Gewebe als Ausnahme bekannt: Thymus, Knochenmark, Haut, Haarfollikel, Hoden und Kolon [25-28]. Lef-1 allein verfügt nicht

EINLEITUNG

über ein Transkriptionspotential, ist aber in der Lage, über eine *high mobility group* (HMG) *domain* DNA zu binden, diese in Konfigurationsänderungen zu überführen (*sharp bend*) und über eine weitere kontext-abhängige Domäne (CAD) mit spezifischen nicht-DNA-bindenden Faktoren Transkriptionsvorgänge inhibierend und aktivierend zu regulieren [29-32].

An Lef-1 finden sich vier verschiedene funktionelle Bindungsdomänen: die transkriptionsrelevante β -catenin-Bindungsdomäne und die CAD zur Bindung weiterer Co-Faktoren am N-terminalen Ende. Am C-terminalen Ende liegen die spezifisch DNA bindende HMG-Domäne und das *nuclear localisation signal* (NLS) zur Translokation in den Zellkern [33].

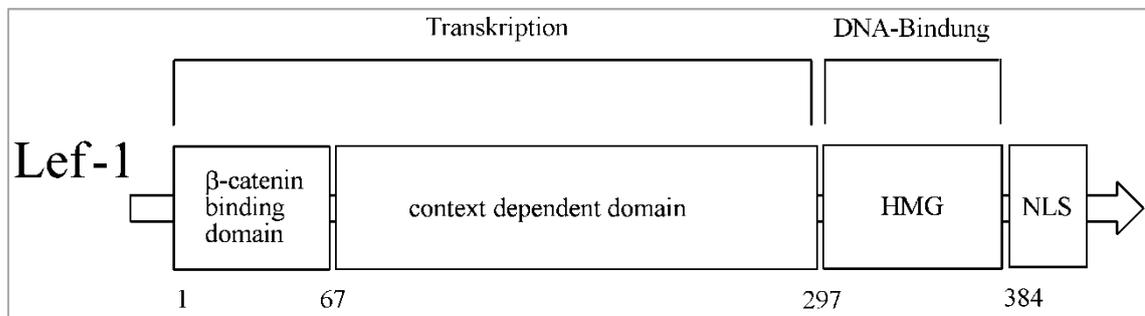


Abbildung 7: Schematische Darstellung des lymphoid enhancer factor – 1 und seiner Bindungsdomänen (Zahlen: Aminosäurepositionen). HMG: high mobility group; NLS: nuclear localisation sequence. Nach [33].

Die Lef/Tcf-Familie ist Bestandteil des Wnt-Signalweges, einer evolutionär hoch konservierten Signalkaskade, welche maßgeblicher Bestandteil von organischen Entwicklungsprozessen ist [23]. Wnt-Proteine sind cysteinreiche Glykoproteine. Beim Menschen sind 19 dieser Wnt-Gene bekannt. Die Bezeichnung Wnt setzt sich zum einen aus dem *wingless*-Gen der *Drosophila melanogaster* und zum anderen aus einem Proto-Onkogen, *integrated (int-1)* zusammen, welches in Verbindung mit Brustkrebs im Mausmodell steht [34, 35]. Der Wnt-Signalweg dient der Kontrolle und dem Abbau von β -catenin durch einen Proteinkomplex aus *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3), Axin und dem *adenomatous polyposis coli* – Protein (APC). Bei nicht aktiviertem Signalweg wird durch die im Proteinkomplex gebundene GSK-3 in Zusammenarbeit mit der *casein kinase-1* β -catenin phosphoryliert und über eine Ubiquitin-vermittelte Markierung dem steten proteolytischen Abbau durch Proteasomen

EINLEITUNG

zugeführt, wodurch ein niedriger intrazellulärer Proteinlevel von β -catenin gewährleistet wird [32, 33, 36]. Aktivierung erfährt der Wnt-Signalweg durch das Binden eines Liganden an einen Frizzled (Fz)-Rezeptor (aus der Wnt-Rezeptoren-Familie) und seinem LRP/Arrow-Corezeptor (*low-density lipoprotein receptor related protein*). Dies induziert die Bindung von Axin und dem *Dishevelled*-Protein (Dsh), welches GSK-3 inhibiert und somit den weiteren proteolytischen Abbau unterbindet. Bekannt ist, dass eine Expression von Dsh zu einer erhöhten Aktivität von PKB führt, welche im Axin/GSK-3-Komplex GSK-3 phosphoryliert und somit inhibierend wirkt [37]. Es kommt zur konsekutiven Erhöhung von β -catenin, dessen Translokation in den Zellkern und dort nach der Bindung an Lef-1/Tcf zur Auslösung von Transkriptionsvorgängen [34, 38, 39]. Wichtige Zielgene sind unter anderem c-Myc, cyclin D1, matrix metalloproteinase-7, EphB(*ephrin*) sowie VEG-F (*vascular endothelial growth factor*) [23, 40, 41].

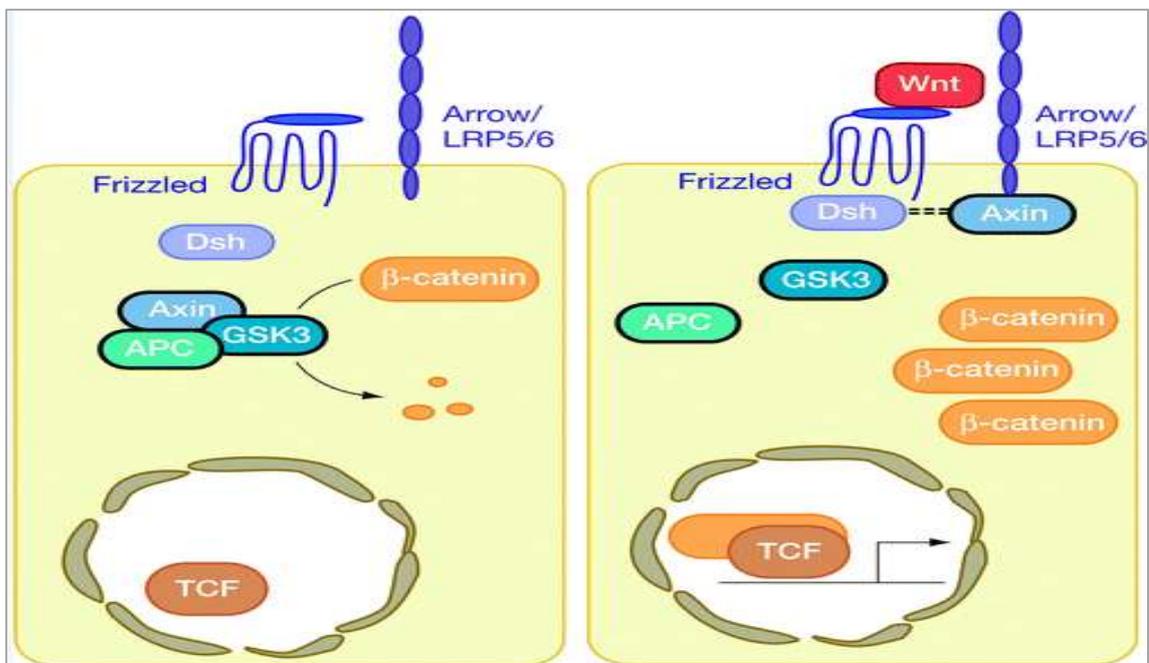


Abbildung 8: Wnt/ β -catenin (canonical) pathway [34]. Links: Steter β -catenin Abbau durch GSK-3. Rechts: Aktivierter Wnt-Signalweg. Axin bleibt gebunden, so dass der Proteinkomplex nicht proteolytisch wirksam ist. Es kommt zur intrazellulären Erhöhung von β -catenin. LRP5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein 5 / 6; Dsh: dishevelled-Protein; APC: adenomatous polyposis coli – Protein; GSK3: glycogen synthase kinase-3 β ; TCF: T cell factor; Wnt: W(Wingless)nt(Int-1).

Aufgrund seines hohen Stellenwertes in der Organogenese kommt es bei Fehlfunktionen des Wnt/Lef/Tcf - Signalweges zu verschiedenen Aberrationen und Erkrankungen, insbesondere Krebserkrankungen [42, 43].

Darüber hinaus konnten β -catenin-unabhängige regulierende Einflüsse von Lef-1 nachgewiesen werden. Hsu et al. zeigte, dass Lef-1 zusammen mit dem Co-Faktor ALY, einem ubiquitär exprimiertem nukleären Protein, die Fähigkeit zu DNA-Bindung und -Konfigurationsänderung sowie Regulation des TRC α -enhancer (*t cell receptor*), unabhängig von Wnt-Aktivierung und β -catenin-Konzentration, beibehält [31, 39, 44]. Weitere Arbeitsgruppen haben feststellen können, dass die Angiotensin-II induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten über eine Aktivierung von Lef/TFC vermittelt wird [45].

1.5 Proteinkinase B (Akt)

Die Protein Kinase B (PKB), auch bekannt als Akt, ist eine 57 kDa schwere ubiquitär vorkommende Serin/Threonin-Kinase, von der drei Isoformen bekannt sind: PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3. Sie alle sind Produkte verschiedener *Akt*-Gene aber teilen eine über 80%ige Homologie und gelten daher als eng verwandt. Da ihre enzymatische Aktivität abhängig vom Phosphorylierungsstatus ist, werden sie wie die Protein-Kinase A, Protein-Kinase G und Protein-Kinase C zur AGC-Gruppe gezählt [46].

PKB/Akt ist essentieller Bestandteil von Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen, wie Proliferation, Zellüberleben, Angiogenese und Glukosestoffwechsel [47, 48]. PKB α /Akt1 ist in die Regulation von Zellwachstum und Zellüberleben eingebunden, maßgeblich durch eine inhibierende Wirkung auf die Apoptose: PKB α /Akt1 knockout-Mäuse sind deutlich kleiner als ihre Kontrollgruppen und zeigen ein höheres Maß an Apoptoseraten [49]. PKB β /Akt2 hingegen scheint insbesondere eine regulatorische Wirkung auf Insulin-Signalkaskaden zu besitzen, denn PKB β /Akt2 knockout-Mäuse entwickeln in erhöhtem Maße eine Glukose-Stoffwechselstörungen [48, 49]. Für PKB γ /Akt3 gibt es Hinweise auf die Beeinflussung der zerebralen Entwicklung [50].

Die Erkenntnisse, die durch knockout-Mäuse erlangt wurden, lassen die Annahme zu, dass einzelne PKB/Akt-Kinasen auf bestimmte zelluläre Regulationsmechanismen Einflüsse ausüben. Versuche mit mehrfachen Deletionen konnten allerdings zeigen,

EINLEITUNG

dass diese Einflüsse nicht monokausal betrachtet werden dürfen, da es zu Kompensationsmechanismen zwischen den Kinasen kommt [48, 49].

PKB/Akt verfügt über eine *pleckstrin homology domain* (PH), eine hochaffine Proteinbindungsdomäne, die *phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate* (PIP3) binden kann. Es folgt eine Kinase-Domäne, die große Ähnlichkeit mit den Proteinkinasen A und C aufweist und an der sich eine Phosphorylierungsstelle befindet (PKB α /Akt1: Thr308, PKB β /Akt2: Thr309, PKB γ /Akt3: Thr305), mit der PKB/Akt aktiviert wird. Am C-terminalen Ende befindet sich eine hydrophobe Regulations-Domäne, die ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden kann.

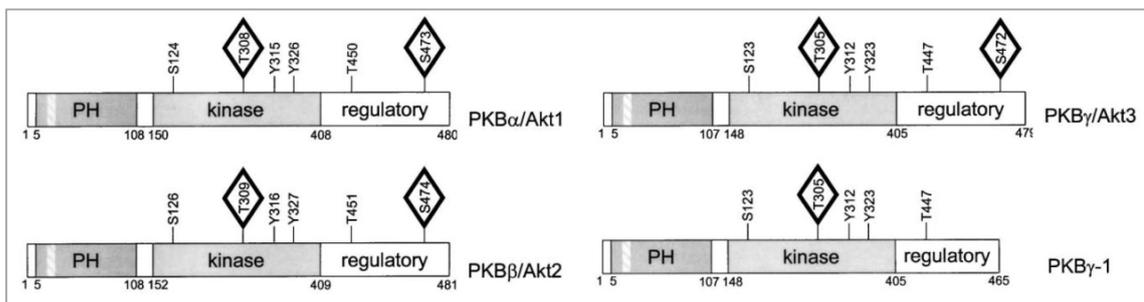


Abbildung 9: Darstellung der drei PKB/Akt Isoformen und der Splicevariante von PKB γ /Akt3 (aus [51]). Alle Isoformen besitzen eine proteinbindende PH-Domäne am N-terminalen Ende, eine zentrale Kinase-Domäne und eine regulierende Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM) am C-terminalen Ende. PKB/Akt besitzt für verschiedene Phosphorylierungsstellen an Serin- und Threonin-Stellen. Für eine vollständige Aktivierung der Kinase ist jedoch die Phosphorylierung der markierten Serin- und Threonin-Stellen (Markierung Raute) notwendig. PH-Domäne: *pleckstrin homology domain*.

Die Aktivierung von PKB/Akt (hier am Beispiel von PKB α /Akt1 erläutert) ist in der Regel abhängig von Inositol-gebundenen Membranlipiden, welche durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) an der D3-OH-Gruppe des Inositolringes phosphoryliert werden. Dies kann durch Wachstumsfaktoren und externe Stimuli eingeleitet werden. PI3K selbst besteht aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Subeinheit und wird durch Tyrosinkinasen aktiviert. Es folgt eine Rekrutierung an die Zellmembran, an der PI3K membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) an der 3-OH Gruppe phosphoryliert und damit den second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) produziert. Zur Kontrolle dieses Phosphorylierungsvorganges

EINLEITUNG

existieren die Phosphatasen *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten* (PTEN), *Src-homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase* (SHIP) und *Wortmannin*, die durch Dephosphorylierung an der 3-OH bzw. 5-OH Gruppe zur Gegenregulation fähig sind. PIP3 selbst vermag PKB/Akt nicht zu aktivieren, rekrutiert diese aber an die Zellmembran, wo es zu einer über die PH-Domäne vermittelten Konformationsänderung kommt, die eine Phosphorylierung am Threonin 308 durch die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK-1) erlaubt. PDK-1 verfügt ebenfalls über eine PH-Domäne, dessen Bindung an PIP3 eine Voraussetzung zur Aktivierung darstellt. Zur vollständigen Aktivierung von PKB/Akt bedarf es jedoch einer Phosphorylierung der Kinase- und Regulationsdomäne [51-53]. Über die Phosphorylierung von S473 der Regulationsdomäne wird aktuell noch kontrovers diskutiert. Es wird unter anderem angenommen, dass PDK-1 nach der Phosphorylierung von Thr308 in Verbindung mit der *protein kinase C-related kinase-2* (PRK2) zu einer S473-Kinase wird [54]. Darüber hinaus wird über eine mögliche Autophosphorylierung diskutiert [55], über eine Insulin-induzierte PKB/Akt-Aktivierung unter Beteiligung einer Liganden-aktivierten PDK-2 [56] und die Phosphorylierung von S473 durch eine *integrin-linked kinase* [57] bzw. deren Funktion als Katalysator [58].

In erster Linie findet sich PKB/Akt im Zytoplasma. PKB α /Akt1 und PKB β /Akt2 können jedoch mit Hilfe weiterer Proteine wie *T cell leukemia-1* (Tcl1) in den Zellkern gelangen. Eine über die PH-Domäne vermittelte Interaktion führt zur Aktivierung von PKB/Akt und fördert die Translokation in den Zellkern [59]. GSK-3 ist, wie unter 1.4. aufgezeigt wurde, ein wesentlicher Bestandteil des Wnt-Signalweges. PKB/Akt zeigt hier eine regulierende Wirkung durch die Interaktion über das Dishevelled-Protein (Dsh) und den Axin/GSK-3-Komplex. PKB/Akt inhibiert den GSK-3-abhängigen β -catenin-Abbau, erhöht damit dessen intrazelluläre Konzentration und führt zu einer erhöhten Interaktion mit Lef/Tcf [37].

PKB/Akt wird im Folgenden PKB benannt.

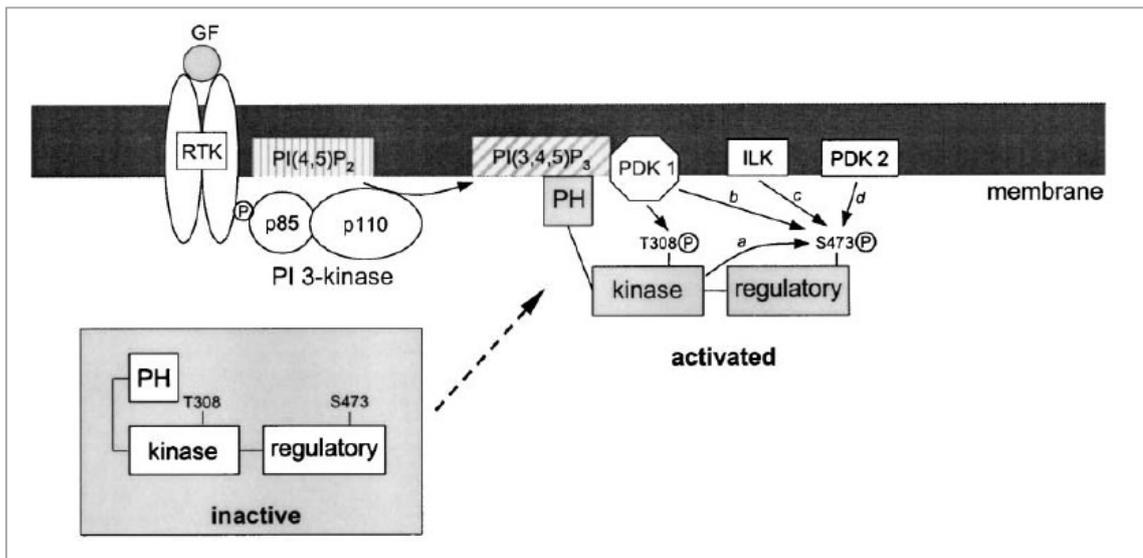


Abbildung 10: Darstellung der Aktivierung von PKB/Akt nach Nicholson [51]. Ohne Phosphorylierung der T308 und S473 ist PKB/Akt inaktiv. Unter externer Stimulation des Rezeptors (hier dargestellt durch ein Wachstumshormon und Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors) kommt es zur Rekrutierung von PI3K, dessen Aktivierung und der Produktion von PIP₃. PKB/Akt gelangt in Membrannähe und wird durch PDK-1 am T308 phosphoryliert. S473 wird durch a: Autophosphorylierung, b: PDK-1, c: ILK und/oder d: PDK-2 aktiviert. GF: growth factor; RTK: receptor tyrosine kinases; PH: pleckstrin homology domain; PDK: phosphoinositide-dependent kinase-1; ILK: integrin-linked kinase; PIP: phosphatidylinositol-phosphate.

1.6 β -catenin

Catenine wurden zunächst als Zehlladhäsionsproteine des Zytoskeletts beschrieben. Im Cadherin-Catenin-Komplex binden unter anderem α -catenin und β -catenin an das Aktinzytoskelett und bilden die *zonula adhaerens*, eine gürtelförmige Zell-Zell-Verbindung. Zudem ist β -catenin in den hoch konservierten Wnt-Signalweg eingebunden und reguliert Transkriptionsvorgänge (siehe 1.4.). Erhöhte Konzentrationen von β -catenin gehen mit verschiedenen neoplastischen Prozessen einher, ist Bestandteil zentraler Regulationsprozesse und unterliegt selbst einer Reihe von Einflüssen, welche Gegenstand wissenschaftlicher Studien sind [60-63].

In Bezug auf das Herz konnte gezeigt werden, dass β -catenin Zellwachstum von Kardiomyozyten induziert und zur Herzhypertrophie führt [64, 65]. PKB stellt dabei mit

seiner inhibierenden Wirkung auf die GSK-3 einen wesentlichen, β -catenin stabilisierenden Faktor dar [63]. Andererseits konnte die Arbeitsgruppe um Baurand et al. jedoch feststellen, dass eine Stabilisierung von β -catenin einer durch Angiotensin-II induzierten Hypertrophie in Mäuseherzen entgegenwirkt [65].

Untersuchungen bei idopathischer dilatativer Kardiomyopathie am Menschen konnten zeigen, dass eine beeinträchtigte Vaskularisierung des Myokards im Rahmen einer Kardiomyopathie von einer reduzierten β -catenin-Expression begleitet wird. Das Missverhältnis zwischen Myokardmasse und arterieller Versorgung kann bekanntlich zur Hypoperfusion und Ischämie des Herzmuskels führen. β -catenin wird an dieser Stelle als ein möglicher Faktor für die veränderte Angiogenese, Proliferation und Zellmigration diskutiert [66]. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine erhöhte β -catenin-Konzentration die Gefäßendothelproliferation fördert [60, 62, 67].

Baurand et al. haben zeigen können, dass eine Hypertrophie-induzierende Angiotensin-II Behandlung zur einer Erhöhung der Apoptoserate von Kardiomyozyten führt, eine β -catenin-Stabilisierung dieser jedoch entgegenwirkt [65]. Kim et al. untersuchte ebenfalls in verschiedenen Zellreihen (Fibroblasten und Epithelzellen der Kornea und verschiedener Tumorzellen) den Zusammenhang zwischen einer β -catenin-Überexpression und der Apoptose-Rate. Unabhängig von der Anwesenheit von Lef-1 gingen alle Zellen bei einer β -catenin-Überexpression in die Apoptose über, selbst dann, wenn im Lef-1-knockout Modell kein Lef-1 im Zellkern vorhanden war. Eine Überexpression von Lef-1 hingegen führte unter Abwesenheit von β -catenin zu keiner Steigerung der Apoptose-Rate [68].

1.7 Glycogen-Synthase-Kinase

Die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) ist eine 47 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase, die in viele Kaskaden der Zellfunktion, Genexpression, des Metabolismus und des Zytoskeletts eingebunden ist. GSK-3 scheint eine Schlüsselstelle für die Entwicklung der Hypertrophie in Kardiomyozyten einzunehmen. Es sind die zwei Isoformen GSK-3 α und GSK-3 β bekannt, welche beide ubiquitär vorliegen und sich zu 97% in ihrer katalytischen Domäne gleichen. GSK-3 β wurde bislang der größere Anteil wissenschaftlichen Interesses zuteil, da diese Isoform in der kardialen Entwicklung eine dominante Rolle einnimmt [69]. GSK-3 β ist in nicht-stimulierten Zellen aktiv und phosphoryliert Substrate, die in der Regel dadurch ihre

EINLEITUNG

Inaktivierung erfahren, wie es für die Wnt-Kaskade unter 1.4. beschrieben wurde. Für einige dieser Substrate sind maßgebliche Effekte auf kardiale Hypertrophie, Proliferation und Proteinsynthese bekannt. Zu ihnen zählen unter anderem β -catenin, eIF2B, c-myc, NF-AT, mTORC1 und Cyclin D1 [11].

Zur Inaktivierung von GSK-3 kann es durch eine Reihe von Mechanismen kommen. Eine Schlüsselrolle bei Kardiomyozyten kommt dabei PKB zu, welche durch Hypertrophiestimuli wie Angiotensin, PI3K, Endothelin und PKA eine Inaktivierung von GSK-3 induzieren kann. Eine weitere Inaktivierung von GSK-3 ist durch den Wnt-Signalweg möglich (siehe 1.4.). Die Phosphorylierung von GSK-3 an Ser9 führt zur Inaktivierung und beendet damit die Phosphorylierung von Substraten wie β -catenin, welche in Folge akkumulieren und Transkriptionsvorgänge auslösen können. Transkriptionsfaktoren, die mit der Aktivität von GSK-3 eng verknüpft sind, sind unter anderem *nuclear factors of activated T cells* (NFATs), β -catenin, c-myc und GATA4. GSK-3 wird in diesem Zusammenhang in inaktiver Form eine Hypertrophie-stimulierende Eigenschaft zugeschrieben [69-71]. Diese Regulationsmechanismen müssen jedoch differenziert betrachtet werden und erklären sich nicht ausschließlich durch monokausale Zusammenhänge. Experimentelle Ansätze mit Überexpression einzelner Faktoren oder knockout-Modellen haben in der Vergangenheit zu teilweise nur schwer interpretierbaren und widersprüchlich wirkenden Ergebnissen geführt, was auf weitere, bislang unbekannte Proteininteraktionen hindeutet.

Woulfe et al. untersuchten den Einfluss von GSK-3 β auf *pressure-overload* Hypertrophie und *remodeling* nach Myokardinfarkt im Mausmodell. Hier gelangte man zur Erkenntnis, dass GSK-3 β die Hypertrophie nach Myokardinfarkt inhibiert, jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Regulierung der Hypertrophie nach *pressure overload* hat. Darüber hinaus konnte bei einer GSK-3 β -Deletion eine reduzierte Apoptose und eine erhöhte Zellproliferation von Kardiomyozyten nachgewiesen werden [69]. Ein anderer Versuchsansatz von Hirota et al. zeigte, dass eine Inhibition von GSK-3 im transgenen Mausmodell (GSK-3-DN) nach einem Hypertrophie-Stimulus mittels transverser Aortenkonstriktion zu einer verringerten Fibrose und Apoptose führte sowie eine bessere linksventrikuläre Funktion nachwies, im Vergleich zur Kontrollgruppe [72]. Hirota et al. äußerte daher die Hypothese, dass eine persistierende Inhibition von GSK-3 eine kompensatorische Hypertrophie in Mäuseherzen induziert, Apoptose und Fibrose inhibiert und der anti-apoptotische Effekt

der GSK-Inhibition maßgeblich durch *myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1) vermittelt wird, da in GSK-3 überexprimierenden Mäusen ein erhöhtes Level an Mcl-1 nachgewiesen wurde. Mcl-1 gehört zu anti-apoptischen Proteingruppe der Bcl2-Familie [72].

Neben den Einflüssen auf Hypertrophie, Apoptose und Vaskularisierung existieren wie oben bereits kurz angesprochen ebenso Hinweise auf den Einfluss auf die Fibrosierung [72]. Diese Daten werden jedoch kontrovers diskutiert, da ebenso profibrotische wie antifibrotische Hinweise existieren [69, 71-73].

1.8 D-Cycline

D-Cycline sind Proteine, die oszillatorischen Konzentrations-Schwankungen unterliegen und im Cyclin/CdK-Komplex regulatorisch auf den Zellzyklus einwirken (siehe 1.2.). Sie können Lef-1 binden und unterliegen dem Einfluss von β -catenin und seinen Signalkaskaden. Ein erhöhter Abbau von β -catenin führt zu einer reduzierten Expression von Cyclin D1. Eine Überexpression von Cyclin D1 kann zu unkontrollierter Proliferation und Tumorgenese führen [74]. D-Cycline gehören zu den G₁-Cyclinen, die den Eintritt in die Synthese-Phase des Zellzyklus kontrollieren, zu denen E- und A-Cycline ebenfalls gezählt werden. D-Cycline aktivieren in erster Linie CdK4 und CdK6, E- und A-Cycline aktivieren insbesondere CdK2 und phosphorylieren zusammen die Tumorsuppressoren Rb, P107 und p130, wodurch es zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F kommt [75].

D-Cycline lassen sich im embryonalen Mäuse-Myokard in höherer Konzentration nachweisen als in erwachsenen Mäusen, was mit der Hypothese in Einklang zu bringen ist, dass Kardiomyozyten in der G₀-Phase die Fähigkeit zur Zellteilung verlieren bzw. reduzieren [76]. Anhand des Proteins *S-phase kinase-associated protein 2* (Skp2) untersuchte Tamamori-Adachi et al. die Effekte einer gesteigerten Expression von Cyclin D1 im Rattenmodell. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclin D1 in postischämischen Herzen zu einer Erhöhung der Zellproliferation von Kardiomyozyten und zu einer Verbesserung einer postischämischen Ventrikelfunktion führen kann. Begleitet wurde dies von einer gesteigerten Vaskularisierung und reduzierten Apoptose, welche nachweislich die Infarktgröße verringerten [77]. Dies konnte in einer Versuchsreihe von Soonpaa et al. bestätigt werden. In Cyclin D1-überexprimierenden transgenen Mäusen konnte eine 40%ige Zunahme des Herzgewichtes und Verdopplung der Myozytenanzahl nachgewiesen werden [78]. Weitere Studien

EINLEITUNG

unterstützen diesen Ansatz und postulieren eine gesteigerte DNA-Synthese bei erhöhten D-Cyclinen [76]. Wie unter 1.2. beschrieben, befinden sich erwachsene Kardiomyozyten in der postmitotischen G₀-Phase und treten nicht mehr zur Zellteilung in die Synthese-Phase ein. Di Stefano et al. untersuchten daher die Auswirkung der *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI) in CKI-knockdown-Mäusen und konnten interessanter Weise in neonatalen wie auch in erwachsenen Kardiomyozyten S-Phasen beobachten. Dem CKI wurde daher eine aktive Rolle in der Unterdrückung des Zellzyklus zugesprochen [79].

2 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit hat zum Ziel, das Verständnis für Zusammenhänge zellregulatorischer Prozesse von Kardiomyozyten zu vertiefen.

Zahlreiche Autoren haben aufzeigen können, dass dem *lymphoid enhancer factor -1* (Lef-1) und der Proteinkinase B (PKB) in Bezug auf Hypertrophie, Zellteilung und Apoptose in Herzmuskelzellen eine zentrale Rolle zukommt. In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen von Lef-1 und PKB in Kardiomyozyten weiter beleuchtet werden, indem durch Transfektion mit adenoviralen Vektoren die Expression der oben genannten Gene in Kardiomyozyten beeinflusst wird und die sich ergebenden Effekte auf Organgewicht, Zellproliferation, Apoptose, Hypertrophie und Proteinexprimierung analysiert werden.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien, Geräte, Programme

Vortexer Scientific Industries®, Vortex-Genie 2,

Reinwassersystem (MilliQH₂O) Siemens®, Ultra Clear™ RO EDI

Zentrifuge Eppendorf® Centrifuge 5415R

Histologische-Färbungen

Brutschrank Binder®, APT.Line Serie BD/ED

Deckglas Assistent

Kryotom Leica® CM 3050S

Laser-Scan-Mikroskop Leica® SP5

Mikroskop Nikon® Eclipse E600

Objektträger Menzel-Gläser, SuperFrost®Plus

PolyfreezeTissue Freezing Medium Polyscience, Inc.

Western Blot

Blotting-Papier Roth® Rotilabo, 0,35mm

Blotting-Membran Bio-Rad® #D103422

Elekro-Blotter Biometra® Fastblot

Elektrophorese Biometra® Multigel G44

Homogenisator Ika® T10 basic

MATERIAL UND METHODEN

Scanner	Canon® CanoScan Lide 60
Spektrophotometer	Bio-Rad® SmartSpec 3000

3.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

3.2.1 Chemikalien

Histologie

Aceton	Roth®
BrdU	Sigma-Aldrich®
DAB (3,3 Diaminobenzidine)	Fluka®
Entellan	Merck®
Ethanol	Roth®
Glycin	Roth®
H ₂ O ₂	Roth®
HCl	Roth®
KH ₂ PO ₄	Roth®
KCl	Roth®
MgCl ₂	Roth®
Methanol	Roth®
NaCl	Roth®
Na ₂ HPO ₄	Roth®
NaH ₂ PO ₄	Roth®
Na-desoxychelate	Sigma-Aldrich®

MATERIAL UND METHODEN

Nonidet P 40	Sigma-Aldrich®
Igepal	Sigma-Aldrich®
Triton X-100	Fluka®
Tris	Roth®
Tween 20	Sigma-Aldrich®
SDS	Sigma-Aldrich®
X-Gal	Roth®
Xylol	Roth®

Blot Western

Acrylamid, Rotiphorese Gel 40	Roth®
APS	Roth®
Milchpulver	Roth®
TEMED	Roth®

3.2.2 Enzyme, Antikörper

Histologie

Anti-BrdU	Dako® M0744
ABC Kit - Peroxidase	Vector® Vectastain Elite PK 6100
Biotin-11-dUTP	Fermentas® #R0081
Biotinylated anti-mouse, anti rabbit AK	Vector® Laboratories Inc. #BA-1400
BSA	Merck®

MATERIAL UND METHODEN

DNase I	Fermentas® #EN0525
DNase I-Buffer (10x without MnCl ₂)	Fermentas®
TdT	Fermentas® #EP0162
TdT-Buffer (5x)	Fermentas®
Neuraminidase	Sigma-Aldrich®
Fluorescein Peanut Agglutinin	Vector® Laboratories Inc. #FL-1071
Hoechst 33258	Molecular Probes, Inc.
Rhodamine labeled Griffonia Simplicifolia	Vector® Laboratories Inc. # RL-1102
Lectin I (GSL I, BSL I)	

Western Blot

BCA (A+B) Protein Assay	Thermo Scientific® #23223 #23224
Halt Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Scientific® #78430
Luminollösung SuperSignal® Pico	Thermo Scientific® #34077
Luminollösung SuperSignal® Femto	Thermo Scientific® #34094
Anti-Akt (pan) AK (C67E7) Rabbit IgG	CellSignal® #4691
Anti-beta-catenin AK (6B3) Rabbit IgG	CellSignal® #9582S
Anti-GSK-3beta AK (27C10) Rabbit IgG	CellSignal® #9315
Anti-Cyclin D1 AK (92G2) Rabbit IgG	CellSignal® #2978P
Anti-Cyclin D3 AK (DCS22) Mouse IgG	CellSignal® #2936P
Anti-GAPDH AK (14C10) Rabbit IgG	CellSignal® #2118
Anti-Lef1-AK (ab22884) Rabbit IgG	abcam®

MATERIAL UND METHODEN

HRP in IgG light, anti-mouse AK	Jackson Immuno Research
HRP in IgG, anti-rabbit AK	Vector® Laboratories Inc.
Page Ruler	Fermentas® #SM0671

3.2.3 Lösungen, Reagenzien

Histologie

LacZ Färbungslösung: 1000 ml LacZ-Waschlösung pH 7,4 enthalten 77,4 ml 1M Na₂HPO₄, 22,6 ml 1M NaH₂PO₄, 2 ml 1M MgCl₂, 1 ml 10% Na-desoxycholat und 10 ml 2% NP 40. Für 100 ml Färbungslösung werden 94 ml LacZ-Waschlösung, 2 ml 0,25M K₄[Fe(CN)₆], 2 ml 0,25M K₃[Fe(CN)₆] und 2 ml X-GAL (50 mg/ ml stock solution) verwendet.

Loading buffer (4x): 50 mM Tris, 5% SDS, 10% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycin, pH 6,8

PBS/Tween20-Lösung (10x) (phosphate buffered saline): 1000 ml einer 10fachen PBS/Tween20 Lösung enthalten 100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ und 2,5 g KH₂PO₄, welches mit MilliQH₂O aufgefüllt und zu einem pH-Wert von 7,2 – 7,4 titriert wird. Es folgt die Hinzugabe von 5 ml Tween20.

PFA 4%-Lösung (paraformaldehyd): 1000 ml 4%ige PFA-Lösung enthalten 40 g PFA. Diese werden unter Rühren und bei 60° C auf 800 ml mit MilliQH₂O aufgefüllt. Unter Zugabe weniger Tropfen NaOH wird die Lösung klar. 100 ml 10fache PBS-Lösung hinzugeben und mit MilliQH₂O auf 1000 ml auffüllen. Abschließend die Lösung filtrieren und auf einen pH-Wert von 7,0 titrieren.

Mowiol-Lösung: Für 20 ml Mowiol-Lösung werden 6 ml MilliQH₂O unter starkem Rühren mit 2,4 g Mowiol und 6 g Glycerol vermischt und für vier Stunden abgestellt. Anschließend wird unter weiterem Rühren 12 ml 0,2 M Trispuffer (pH=8,5) auf 50° C erhitzt. Nachdem die Lösung aufgeklärt ist, kann sie bei -20° C eingefroren werden.

Western Blot

RIPA-Puffer (10x): 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 1 % Triton X-100, 0,2 % Natrium-Desoxycholsäure, 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM EDTA

SDS-PAGE Puffer (10x): Für 1000 ml 10x SDS PAGE Puffer werden in 800 ml MilliQH₂O 28 g Tris, 143 g Glycin und 20 g SDS hinzugeben. Unter Rühren auf 1000 ml auffüllen.

SDS-Gel: Trenngel: 7350 µl MilliQH₂O, 3750 µl 40% Acrylamid, 3750 µl 1,5 M Tris pH 8,8, 75 µl 20% SDS, 75 µl 10% APS, 10 µl TEMED. Sammelgel: 8100 µl MilliQH₂O, 1000 µl 40% Acrylamid, 625 µl 2M Tris pH 6,8, 200 µl 10% APS, 10 µl TEMED.

SDS-Transfer Puffer: 1000 ml Transfer Puffer enthalten 2,8 g Tris, 14,3 g Glycin in MilliQH₂O. Dies wird auf einen pH von 8,3 adjustiert und mit 200 ml Methanol bzw. MilliQH₂O aufgefüllt.

TBT-Lösung: 1000 ml TBT-Lösung enthalten 61 g Tris, 90 g NaCl und 5 ml Tween20 in MilliQH₂O. Auf einen pH von 7,6 einstellen und mit MilliQH₂O auffüllen.

3.3 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um transgene α MHC-nls-LacZ-Mäuse, die freundlicher Weise von Dr. L. J. Field zur Verfügung gestellt werden. Das LacZ-Reporter-gen ist bei diesen Mäusen unter der Kontrolle des Myosin Heavy Chain-Promotors [80]. Das LacZ-Gen codiert für die β -Galactosidase, ein Enzym, welches Lactulose in Glukose und Galaktose spaltet. Dies kann immunhistochemisch genutzt werden, indem mittels X-Gal Kardiomyozytenkerne auf Kryoschnitten blau angefärbt werden können [81-83].

3.3.1 Haltung

Zucht und Haltung der Tiere finden im Tierstall des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter standardisierten Bedingungen statt. Die Raumtemperatur beträgt 22° C, die Luftfeuchtigkeit 65% und der Tag-Nacht-Rhythmus wird mit zwölf Stunden von 07:00 bis 19:00 Uhr simuliert. Der Zugang zu Wasser und Futter ist nach der ALTROMIN Standard-Diät 1320 frei verfügbar. Zur eindeutigen Identifizierung wird jede Maus am

Ohr unter Narkose markiert. Mit Ausnahme der Verpaarung werden die adulten männlichen einzeln und die weiblichen Mäuse in Gruppen gehalten.

3.3.2 Adenovirale Konstrukte

Zur Transfektion mittels adenoviraler Vektoren wird ein etabliertes Verfahren der Arbeitsgruppe Ebelt verwendet und zur Verfügung gestellt [80, 84, 85]. Der virusvermittelte Gentransfer hat sich als ein geeignetes Mittel mit hoher Transfektionseffizienz zur direkten Genexpression herausgestellt. Die Injektion von hochtitrierten Lösungen in den Thorax von neonatalen Mäusen (10^8 pfu) führt zu einer Expression der interessierenden Gene von über 71 ± 8 % in allen Herzzellen für über 50 Tage ohne den Nachweis von Herzstörungen, Inflammation und Immunantwort [85, 86]. In dieser Arbeit werden entsprechend der zu untersuchenden Gruppen vier verschiedene virale Vektoren verwendet (eGFP, Lef-CA, Lef-DN, PKB).

EGFP (enhanced green fluorescent protein) ist ein biolumineszentes Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das durch Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Seine Verwendung als fluoreszierender Marker findet große Verwendung in der Molekularbiologie und gilt als etabliertes Verfahren [87, 88]. Die hier eingesetzten Vektoren tragen ebenfalls EGFP zum indirekten Nachweis einer erfolgreichen Transfektion der Kardiomyozyten, die unter dem Fluoreszenz-Mikroskop am isolierten Herz oder am Kryoschnitt beurteilt werden kann (siehe 3.4.2.).

Als Kontroll-Vektor wird in dieser Arbeit ein für eGFP-kodierender Adenovirus (Ad-EGFP) verwendet [85, 89].

Zur Beeinflussung der Aktivität von Lef werden zwei verschiedene adenovirale Konstrukte verwendet, die jeweils unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotor stehen.

Lef -DN (lymphoid enhancer factor 1 – dominant negativ) fehlen die Basen 7-236, welche die β -catenin-Bindungsstelle (*β -catenin binding domain*) enthalten. Es entsteht somit eine dominant-negative (DN) Genvariante. Das folglich bindungsunfähige Protein ist für den β -catenin/TCF-Komplex nicht aktivierbar und ist somit kompetitiv gehemmt [28]. Zur bicistronischen Genexpression des Reportergens eGFP wird eine *internal ribosomal entry site* (IRES) aus dem Encephalomyocarditis-Virus verwendet, die das Ablesen beider Gene ermöglicht.

Bei dem Konstrukt **Lef-CA** (lymphoid enhancer factor 1 - constitutive-active) befindet sich ergänzend zum Lef-DN-Konstrukt am C-terminalen Ende des Lef-Gens ein Fragment des β -catenins, wodurch eine konstitutiv aktive Form entsteht und die Expression unabhängig von der zytosolischen β -catenin Konzentration erfolgt.

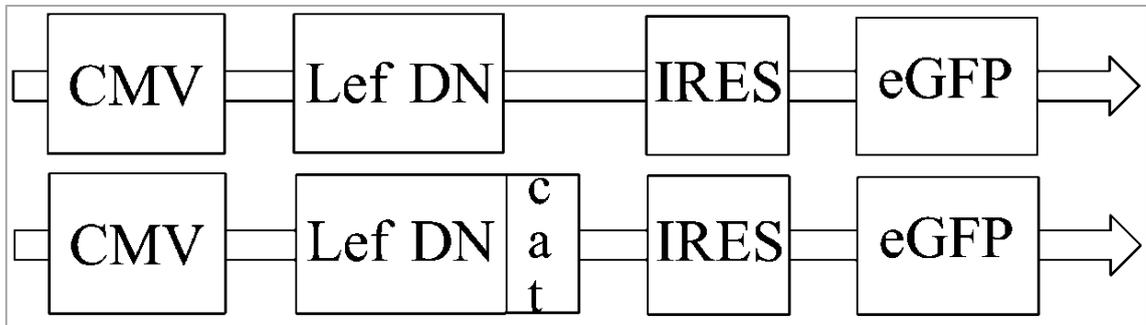


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Lef-Vektoren: oben Lef DN, unten Lef CA. CMV: Cytomegalie-Promoter, Lef DN: lymphoid enhancer factor 1 – dominant negativ, Lef CA – lymphoid enhancer factor 1 – constitive active, cat: β -catenin Fragment, IRES: internal ribosomal entry site, eGFP: enhanced green fluorescent protein

Der Vektor zur Expression von **konstitutiv-aktiver PKB** (Protein Kinase B) stammt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Simm (Universitätsklinikum Halle (Saale)) und wird freundlicher Weise für die Experimente zur Verfügung gestellt. Ausgang ist die Verbindung einer Myrinsäure mit dem N-terminalen Ende von PKB, was eine konstitutive Aktivierung der Proteinkinase ermöglicht [90, 91].

3.4 Virusinjektion

Die Injektion der rekombinanten Adenoviren erfolgt am Tag der Geburt der Mäuse und wird aus Standardisierungszwecken nur von einem Mitarbeiter (Herrn Dr. Ying Zhang) der Arbeitsgruppe durchgeführt. Zu Beginn werden die Mäuse für zwei Minuten durch Abkühlung auf Eis sediert, um dann unter Durchleuchtung mit einer kalten Lichtquelle zur Darstellung der Herzsilhouette jeweils 10 μ l der Virus-haltigen Lösung mit Hilfe einer 26-Gauge Nadel links parasternal unmittelbar in Herznähe intrathorakal injiziert zu bekommen [85]. Die Jungtiere werden anschließend zum Muttertier wieder zurückgegeben.

3.5 Herzisolation

Die Herzisolation wird entweder am dritten oder am siebenten Tag nach den Virusinjektionen durchgeführt. In einer Kammer, in welche mit Isofloran insuffliert wird, werden die Mäuse sediert und durch Genickbruch getötet. Anschließend werden die Organe Herz, Lunge und Leber isoliert und in MilliQH₂O gereinigt, abgetrocknet und gewogen.

3.6 Histologie

3.6.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Nachdem der Isolierung der Herzen, werden diese für 24 Stunden in einer 30% Saccharoselösung bei 4° C inkubiert und dann in PolyfreezeTissue® bei -20° C eingefroren. Auf diese Weise können die Herzen ohne Schädigung aufbewahrt werden.

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wird ein Leica® Krytom angewendet. Die Schnitte werden so gewählt, dass der linke und rechte Ventrikel gut erkennbar sind. Mit einer Schnittdicke von 10 µm werden die Zuschnitte fortlaufend auf drei Objektträger aufgetragen, um bei späteren Anfärbungen dicht beieinander liegende Schnitte auf verschiedenen Objektträgern zur Verfügung zu haben und vergleichen zu können.

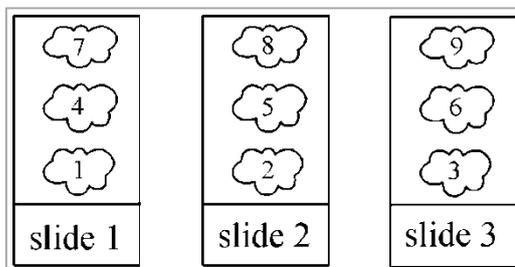


Abbildung 12: Fortlaufendes Auftragungsschema auf die Objektträger bei dem Anfertigen der Kryoschnitte

Im Anschluss werden die Präparate bei -20° C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Zellzyklusaktivität mittels Anti-BrdU-Färbung

Zur Bestimmung der Anzahl der die S-Phase durchlaufenden Kardiomyozyten werden die Zellkerne mittels 5- Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) markiert und angefärbt.

MATERIAL UND METHODEN

24 Stunden vor der Organentnahme wird jeder Maus BrdU in einer Konzentration von 33,14 µl/ g Körpergewicht intraabdominal injiziert. Über das Peritoneum kommt es zu einer systemischen Aufnahme des BrdU im gesamten Körper. Als chemisches Analogon von Thymidin wird es in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend gestattet eine Antikörper-Färbung (Anti-BrdU) die Visualisierung und Quantifizierung der BrdU-positiven Zellkerne, d.h. die Bestimmung der S-Phase durchlaufenden Zellen. Um hierbei die Kardiomyozyten von den Nicht-Muskelzellen unterscheiden zu können, werden die Präparate zusätzlich mit einer LacZ-Lösung angefärbt. Auf dem Präparat können somit LacZ- und BrdU-positive Zellen erkannt und als S-Phase durchlaufende Kardiomyozyten ausgemacht werden [92-94]. Das Färbeverfahren findet dabei in folgenden Schritten statt:

Zu Beginn werden die Präparate dreimalig für fünf Minuten in PBS/Tween20 gereinigt und anschließend über Nacht in der LacZ-Färbungs-Lösung bei 37° C inkubiert, bis die Zellen einen deutlich makroskopischen Blauschimmer zeigen. Anschließend folgt erneutes Waschen mit PBS/Tween20. Die folgenden Reinigungen erfolgen stets nach dem Prinzip des dreimaligen Waschens für fünf Minuten in PBS/Tween20. Das Fixieren der Schnitte wird durch 70% Methanol + 30% Aceton für 15 Minuten, Reinigen und zur Elimination intrazellulärer Peroxidasen die Inkubation von 3% H₂O₂ in Methanol für 10 min ermöglicht. Zur Steigerung der Permeabilität wird 0,1 % Triton X-100/ PBS dreimalig für fünf Minuten und abschließend eine Inkubation mit 4N HCl verwendet. Vor Anwendung der Antikörper werden für 30 min unspezifische Bindungsstellen mit Pferde-Serum geblockt. Im Folgenden werden die Präparate mit einem Maus-Anti-BrdU-Antikörper (1:500 zwei Stunden bei Raumtemperatur) und einem sekundären biotinylierten Anti-Maus-Antikörper inkubiert (1:1000 30 Minuten Raumtemperatur). Aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Avidin kann mittels des Vector® ABC Kits ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex an den sekundären biotinylierten Antikörper gebunden werden (30 Minuten Raumtemperatur). An das Avidin des ABC-Kits ist eine Peroxidase gekoppelt, die nun das für drei bis fünf Minuten hinzugegebene Diaminobenzidin (DAB) in einen Brauntönen umschlagen lässt. Im Abschluss werden die gereinigten Präparate in mehreren Schritten dehydriert: 30 sek 70% Ethanol, 30 Sek. 96% Ethanol, 30 Sek. Xylol, 10 Sek. Xylol und anschließend unter Entellan mit Deckgläsern abgedeckt.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Kontrolle der Färbung werden BrdU-positive Kryoschnitte des Maudarmes als Positivkontrolle sowie Schnitte von Mauserzen, denen kein BrdU verabreicht wurde, als Negativkontrolle verwendet. Die Präparate werden verblindet unter dem Mikroskop quantitativ ausgewertet.

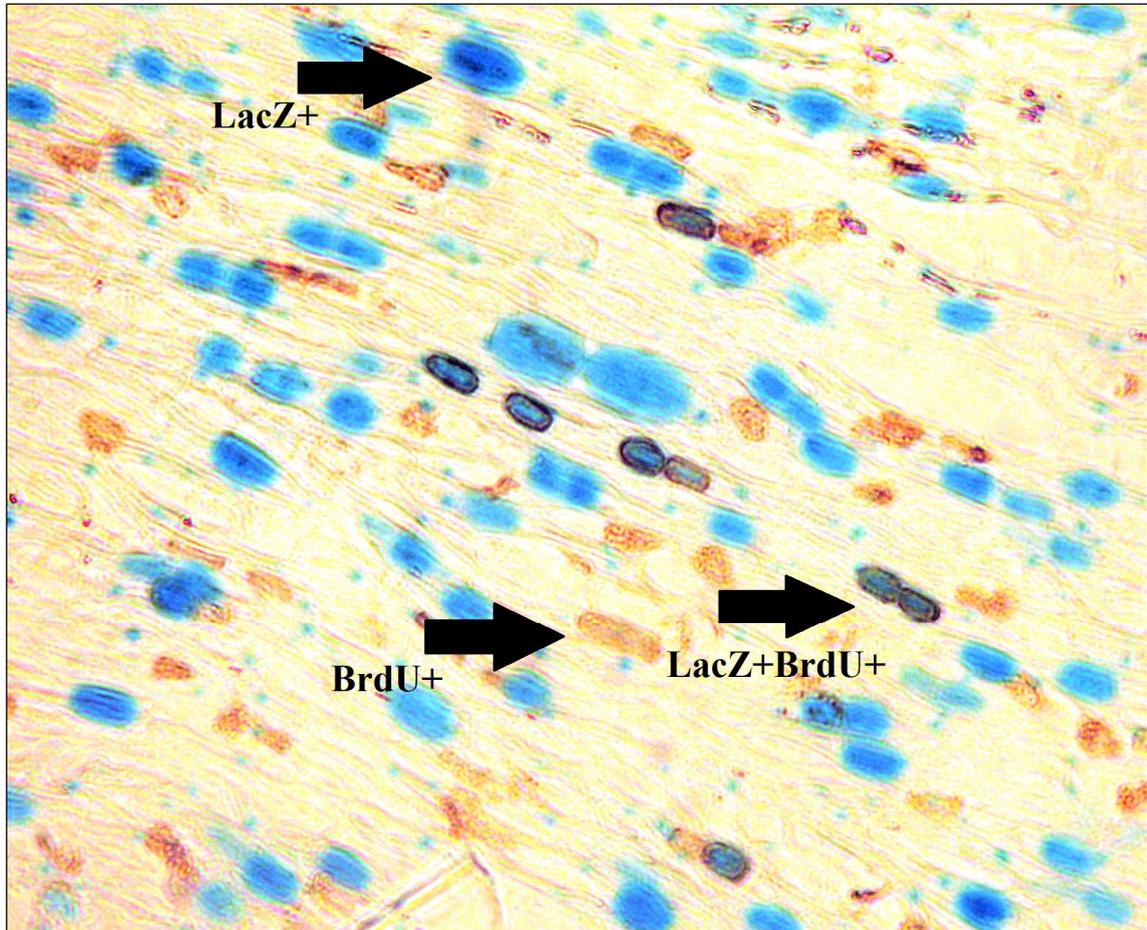


Abbildung 13: Kryoschnitt von einem Herzen einer 7 Tage alten aMHC-nlsLacZ-Maus 24h nach Injektion von BrdU. Anfärbung mittels LacZ-Färbung (blau) sowie Anti-BrdU (braun). Zu erkennen sind die Zellkerne der Kardiomyozyten anhand des Indolblau des X-Gal, welches durch die ausschließlich in den Kardiomyozyten exprimierte β -Galactosidase (Transgen: aMHC-nlsLacZ) sichtbar wird sowie das Braun des DAB im Ergebnis der Anfärbung von BrdU (Peroxidasereaktion). Auf dem Bild sind Zellen zu erkennen, in denen beide Färbungsreaktionen abgelaufen sind; sie werden als BrdU-positive Kardiomyozyten quantifiziert.

3.6.3 Apoptose-Detektion mittels TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Methode, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, ist ein etabliertes immunhistochemisches Verfahren zur Bestimmung apoptotischer Zellen. Während der zellulären Apoptose werden durch Endonukleasen DNA-Abschnitte fragmentiert, so dass freie 3'-Hydroxygruppen der DNA entstehen, an welchen von der terminalen Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) Nukleotide eingebaut werden können. Dies macht man sich immunhistochemisch zu Nutze, indem markierte Nukleotide eingesetzt werden, welche sich später anfärben lassen [95, 96]. Das Verfahren wird im Folgenden erklärt.

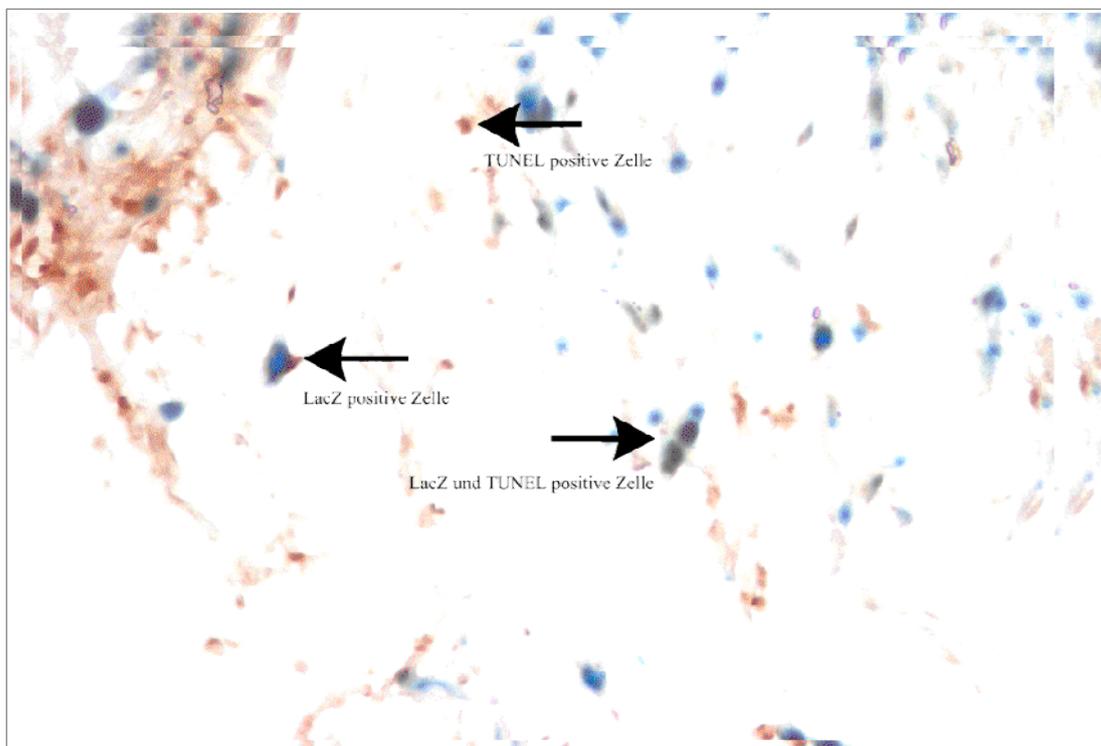


Abbildung 14: TUNEL und LacZ angefärbter Kryoschnitt. Zu erkennen sind das Indolblau des X-Gal, welches die β -Galactosidase enzymatisch aufgespalten hat und das Braun des DAB. Auf dem Bild sind Zellen zu erkennen, in denen beide Reaktionen abgelaufen sind. Sie werden als Apoptose durchlaufende Zelle gezählt.

Zunächst werden die Gewebeschnitte dreimalig für fünf Minuten in PBS gewaschen. Dann erfolgt die Fixierung mittels zehn minütiger Inkubation von 4 % PFA. Um die bei der Auszählung relevanten Kardiomyozyten identifizieren zu können, wird wieder die LacZ-Färbung wie bei der BrdU-Färbung angewendet. Anschließend erneutes

MATERIAL UND METHODEN

Reinigen und zur Elimination intrazellulärer Peroxidasen mit 3 % H₂O₂ in Methanol für zehn min inkubieren. Der 5fach TdT-Puffer wird mit PBS verdünnt und dann Biotin-11-dUTP in 1:250 dem 1fach TdT-Puffer hinzugegeben. Dieser Lösung wird nun die TdT in einem Verhältnis 1:25 beigemischt und jeweils 100 µl auf die Objektträger verteilt. Diese müssen bei 37° C für eine Stunde inkubiert werden und dabei zur Vermeidung des Austrocknens mit Deckgläsern abgedeckt werden. Nach dem Spülen mit PBS erfolgt dann die Inkubation mittels des Vector® ABC Kits. Nach der Dehydrierung und Eindeckeln kann nun das in Braun zu Darstellung kommende DAB an den apoptotischen Zellkernen und das Blau der LacZ-Färbung (Markierung aller Kardiomyozyten) lichtmikroskopisch betrachtet werden.

Die Kontrolle der Färbung wird hier durch die Inkubation eines Objektträgers mit DNase I für 10 min ermöglicht, bei welchem die induzierte Fragmentierung der DNA als Positivkontrolle mitläuft. Zur Negativkontrolle wird bei einem Objektträger kein TdT zur Färbungslösung hinzugegeben.

3.6.4 Quantifizierung der Größe der Kardiomyozyten

Zur Bestimmung der Größe und damit der Zellhypertrophie der Kardiomyozyten wird in dieser Arbeit die Myozyten-Querschnittsfläche (*myocyte cross section area*, MCSA) bestimmt. In vorangegangenen Studien hat sich diese als zuverlässiger Marker erwiesen [97-100]. Hierzu werden zum einen das Kollagen mit Fluorescein-markiertem Peanut-Agglutinin und zum anderen die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Die anschließende Betrachtung beider übereinander liegender Anfärbungen ermöglicht dann die Identifizierung der Kardiomyozyten und Bestimmung der Querschnittsfläche unter Zuhilfenahme geeigneter Computer-Software (Programm: ImageJ). Ein angeschnittener Zellkern dient hierbei als Hinweis auf einen zentralen Anschnitt und kann mit dem Programm ImageJ bei maximaler Vergrößerung gut detektiert werden. Zellen ohne dieses Kriterium werden bei der Datenerhebung nicht berücksichtigt. Zusätzlich werden die Präparate verblindet untersucht. Das Verfahren wird im Folgenden erklärt.

Zu Beginn werden die Kryoschnitte dreimalig für fünf Minuten in PBS/Tween20 gereinigt und dann mit 4 % PFA für 20 min fixiert. Anschließend erneutes Spülen, zuletzt in pH 5,0 PBS. Für eine Stunde werden die Objektträger unter Lichtschutz mit Neuraminidase 3,3 U/ml bei 37° C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgt die

MATERIAL UND METHODEN

Färbung mit Fluorescein-Peanut-Agglutinin 20 µl/ml für zwei Stunden, Reinigen und mit Hoechst 33258 für 10 min jeweils unter strengem Lichtschutz. Nach der Färbung erneut Waschen und die Deckgläser mit Mowiol aufbringen. Es empfiehlt sich, die Präparate weiter unter Lichtschutz aufzubewahren.

Die so gefärbten Kryoschnitte werden mit Hilfe des Leica® SP5 Lasermikroskops betrachtet und mit der Leica Application Software auf dem Computer ausgewertet. Die Bilder werden anschließend mit dem Programm ImageJ quantitativ ausgewertet. In die Auswertung gehen jene Kardiomyozyten ein, in denen deutlich ein Zellkern zu erkennen ist.

Unter ImageJ kann die Zellgrenze mit dem Mauszeiger abgefahren und markiert werden. Das Programm berechnet dann den Flächeninhalt.

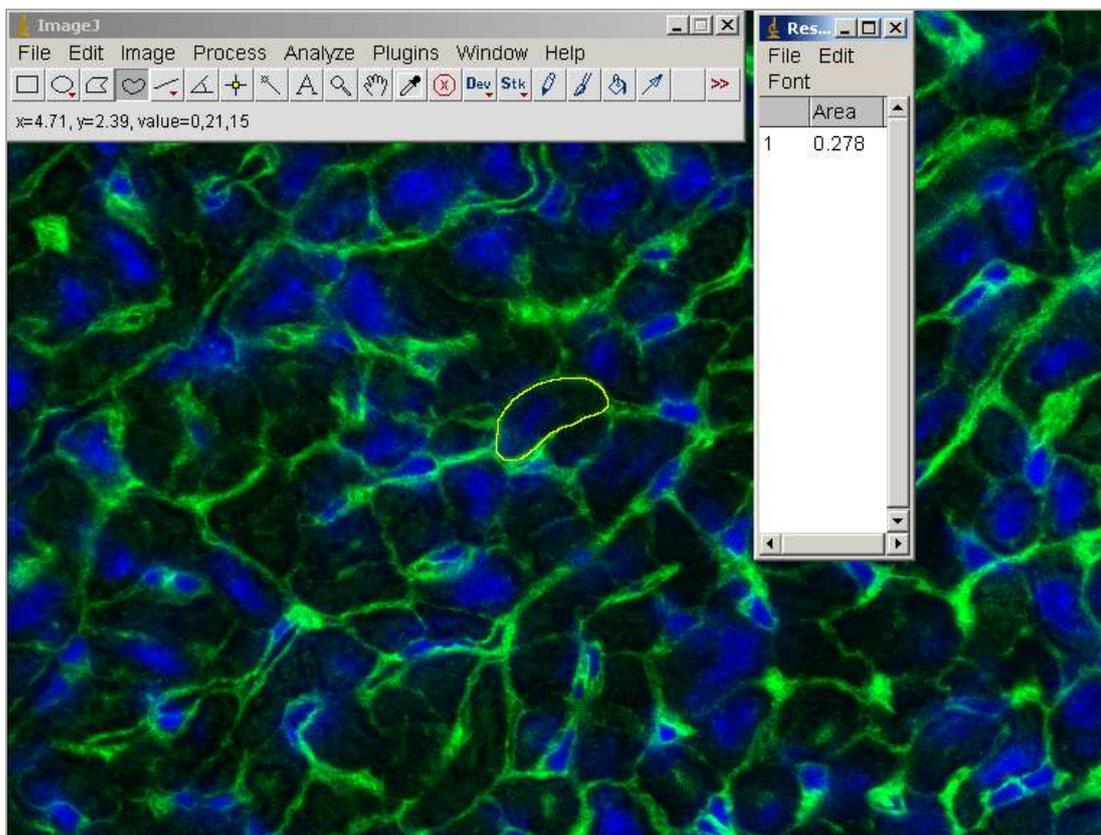


Abbildung 15: Bildschirmfoto der MCSA Bestimmung. Blau: Zellkerne, grün: Kollagen, gelb: gemessener Kardiomyozyt

3.6.5 Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes des Myokards

Für die Ermittlung der interstitiellen Kollagenfraktion (*interstitial collagen fraction*, ICF) erfolgt die in 3.6.4. beschriebene Anfärbung des Gesamtkollagens durch Fluorescein Peanut Agglutinin und zusätzlich die Darstellung des intramyokardialen Gefäßendothels mittels der Färbung durch Rhodamin-markiertem Lectin I der Wasserpflanze *Griffonia Simplicifolia*. Mit Hilfe des Programms ImageJ können dann die entsprechenden Flächenanteile auf den unter dem Mikroskop angefertigten Fotos berechnet und von einander abgezogen werden. Das Ergebnis widerspiegelt dann die interstitielle Kollagenfraktion (ICF), d.h. Gesamtkollagen abzüglich Gefäßendothel [97, 101]. Das Verfahren wird im Folgenden erklärt.

Eine simultane Anfärbung von Kollagen und Gefäßendothel ist technisch nicht möglich, da es hierbei zu einer Auslöschung des roten Rhodamin-markierten Lectins kommt. Aus diesem Grund wird bei der Herstellung der Gewebeschnitte nach dem in 3.6.1. beschriebenen Verfahren vorgegangen, so dass unmittelbar aufeinanderfolgende Schnitte (10 µm Schichtdicke) verwendet werden können.

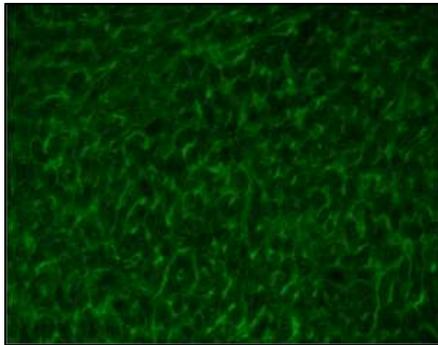
Die Objektträger werden zunächst dreimalig für fünf Minuten in PBS gewaschen und für 10 min in 4 % PFA fixiert. Zur Anfärbung des Gefäßendothel werden die Präparate zwei Stunden mit Rhodamine-labeled *Griffonia Simplicifolia* Lectin I (1:500) bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert, anschließend gewaschen und die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt. Die Anfärbung des Kollagens erfolgt wie unter 3.6.4. beschrieben mit Fluorescein-Peanut-Agglutinin. Die Präparate werden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Unter dem Leica® SP5 Lasermikroskops werden die Farbkanäle blau bzw. rot eingestellt und ein Ausschnitt aus dem Ventrikelseptum gewählt. Mit der Bearbeitungssoftware Lucia® G (Version 4.82) können die Fotos nun auf den PC gespeichert und weiter bearbeitet werden.

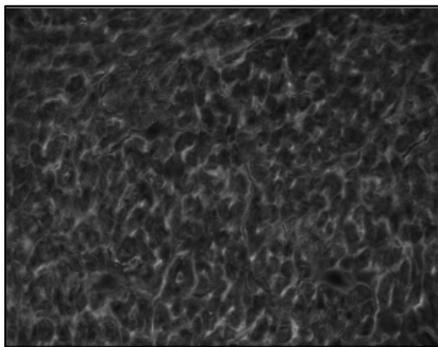
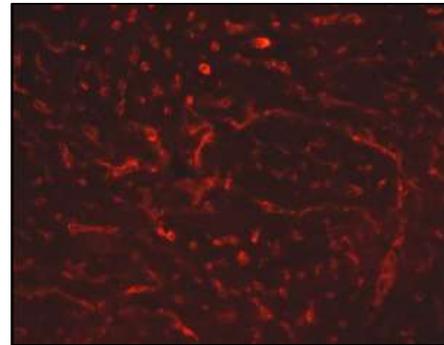
Mit der Anwendung des Programmes ImageJ ist es möglich einzelne Farbkanäle zu isolieren. Durch die *split-channels* Option wird der ausgewählte Farbkanal in 256 Graustufen dargestellt und anschließend invertiert (*Invert*). Nun wird über die *Threshold*-Funktion der obere und untere Grenzwert eingestellt, so dass nur die angefärbten (d.h. ehemals fluoreszierenden) Strukturen für die Quantifizierung erfasst

MATERIAL UND METHODEN

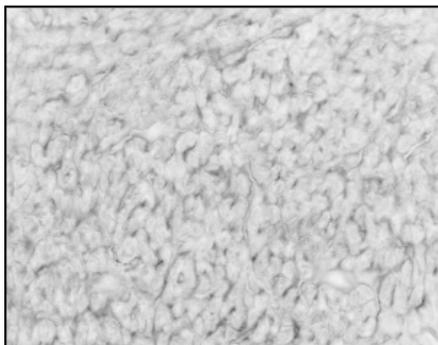
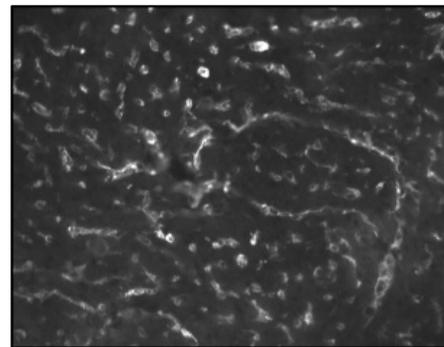
werden. Somit entstehen auf jedem Bild Flächenanteile die ImageJ berechnen kann. Abschließend werden diese Anteile gemäß $ICF[\%] = \text{Gesamt Kollagen} [\%] - \text{Gefäßendothel} [\%]$ voneinander abgezogen. Das Ergebnis entspricht der ICF.



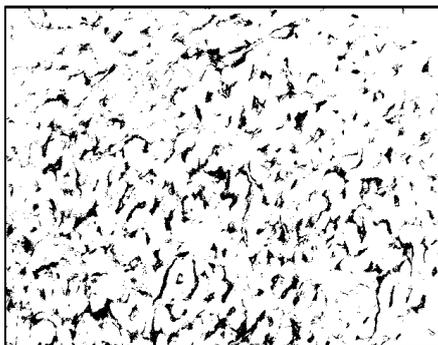
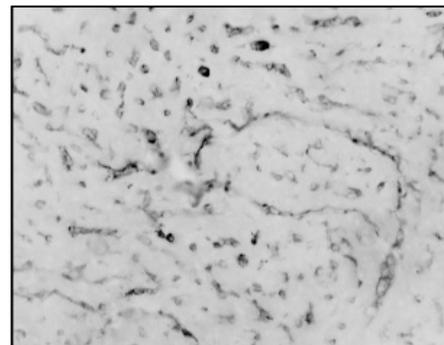
A



B



C



D

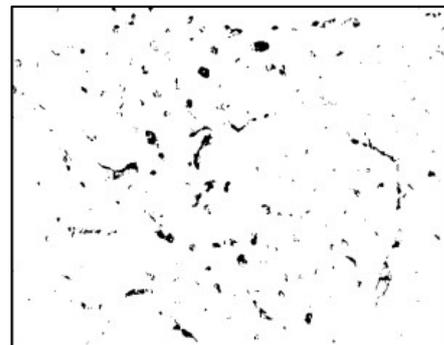


Abbildung 16: Ablauf der ICF-Bestimmung mit dem Programm ImageJ, links anhand des Gesamtkollagens (grün), rechts anhand des Gefäßendothelkollagens (rot). Von dem Original-Foto (A) wird zunächst der interessierende Farbkanal isoliert (B), invertiert (C) und letztlich anhand des festgelegten Schwellenwertes quantifiziert (D).

Bei der Aufnahme der Fotos lassen sich Kontrast- und Belichtungsunterschiede nicht vollständig verhindern. Um systematische Fehler bei der Quantifizierung auszuschließen, werden deshalb für jede Bildserie die oberen und unteren Grenzwerte (thresholds) verblindet ermittelt. Die Werte werden dabei so gewählt, dass die Intensität der Graustufen optisch zu den Farboriginalen passt und keine Artefakte entstehen. Die ICF-Quantifizierung wird bei jeder Maus an 20 verschiedenen Fotos vorgenommen. Aus den so gewonnen Einzelwerten werden die Mittelwerte bestimmt, welche dann für die weiteren Berechnungen verwendet werden.

3.7 Bestimmung der Protein-Expression

Die Herzen zur Proteinisolierung werden gemäß 3.5. vorbereitet und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -80° C in einem Eppendorf-Gefäß aufbewahrt.

3.7.1 Proteinextraktion und -quantifizierung

Für die Durchführung der SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*) muss zuvor die Homogenisation der Herzen und anschließend die Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Lysate ermittelt werden. Dazu wird das Gewebematerial in 200 µl RIPA-Puffer und dem *Protease Inhibitor Single-use Cocktail* zum Schutz vor endogenen Proteasen homogenisiert. Anschließend werden die Lysate bei 4° C für 20 min zentrifugiert (13.200 U/min) und in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Nun kann die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA Protein Assays am Spektrophotometer ermittelt werden.

3.7.2 SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine werden jeweils 30 µg Protein der Lysate verwendet. Diese werden zuvor mit einem *loading buffer* versehen und bei 95° C für 5 min erhitzt. Das SDS-Gel kann nun mit den Proben und dem Größenmarker (*page ruler*) beladen werden. Es folgen ca. 100 min Elektrophorese mit 110 V, 250 mA, 50 W bis die Bromophenolbande im unteren Bereich des Gels sichtbar ist. Die Gele

MATERIAL UND METHODEN

werden in einen SDS-Transfer Puffer überführt und zusammen mit der *blotting-membrane* aus Nitrozellulose angefeuchtet, auf dem Elektro-Blotter mit Filterpapier platziert und für 40 min bei 250 mA angeschlossen. Anschließend werden zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen die Nitrozellulosemembran in Milchpulver für eine Stunde geschwenkt und dann dreimalig für fünf Minuten in TBT gereinigt. Nun kann der erste proteinspezifische Antikörper (z.B. Anti-Akt) hinzugegeben werden und über Nacht bei 4° C auf der Schwenkplatte inkubieren. Nach dreimaligem Waschen mit TBT, kann der zweite HRP-konjugierte (*horse-radish peroxidase*) Antikörper hinzugegeben werden. Die bei der Verwendung der Luminollösung entstehende Lichtreaktion der Antikörper-Peroxidase-Konjugation kann auf dem Fotopapier Agfa® Cronex 5 zur Darstellung gebracht werden. Dafür wird die Membran mit der Luminollösung (z.B. SuperSignal® Pico) inkubiert, die *blotting membrane* in Plastikfolie verschlossen und das Fotopapier für circa fünf Minuten in eine lichtundurchlässige Entwicklermappe gelegt. Die Stärke der Belichtung kann dabei durchaus variieren und durch Änderung der Entwicklungszeit oder der Verwendung des sensitiveren SuperSignal® Femto entsprechend angepasst werden. Die Fotos werden abschließend mit einem Scanner digitalisiert und die Dichte der Banden mit ImageJ ausgewertet.

Zur Kontrolle der Methode wird zum einen die Bandenposition auf ihre Proteingröße mit dem mitgelaufenen Größenmarker abgeglichen und zum anderen jede Membran zusätzlich mit Anti-GAPDH gefärbt (Positiv-Kontrolle) und quantifiziert. Ein diesbezüglich positives Ergebnis wird als Nachweis eines regelrechten Elektrophorese- und Blottingablaufs gewertet [102].

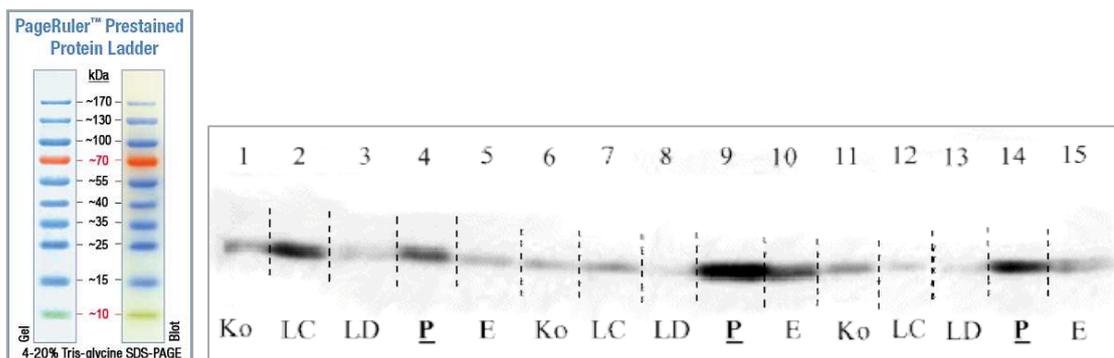


Abbildung 17: Links: Größenmarker der Firma Fermentas. Rechts: Beispielfoto einer Blotting-Membran nach Färbung mit Anti-PKB. Ko = Kontrolle, LC = Lef-CA, LD = Lef-DN, P = PKB, E = EGFP.

3.8 Statistik

In allen Graphiken werden jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen werden mittels Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) auf Signifikanz untersucht mit folgender Post-Hoc-Testung nach Bonferroni. Als Signifikanzniveau wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Vor den Versuchsreihen wird festgelegt, welches Mindestmaß an adenoviraler Transfektion vorliegen muss, damit die Herzen der einzelnen Mäuse in die Auswertung eingehen dürfen. Aus diesem Zweck ist EGFP Bestandteil der applizierten Adenoviren (siehe 3.4.), anhand dessen Fluoreszenz unter dem Mikroskop eine Einteilung der Transfektionseffizienz vorgenommen werden kann. Die Herzen werden in vier Kategorien eingeteilt. A: vollständige Präparatfluoreszenz, B: überwiegende Fluoreszenz, C: geringe, aber eindeutig nachweisbare Fluoreszenz, D: keine eindeutige Fluoreszenz. Herzen der Kategorien C und D gehen nicht mit in die Datenauswertung ein.

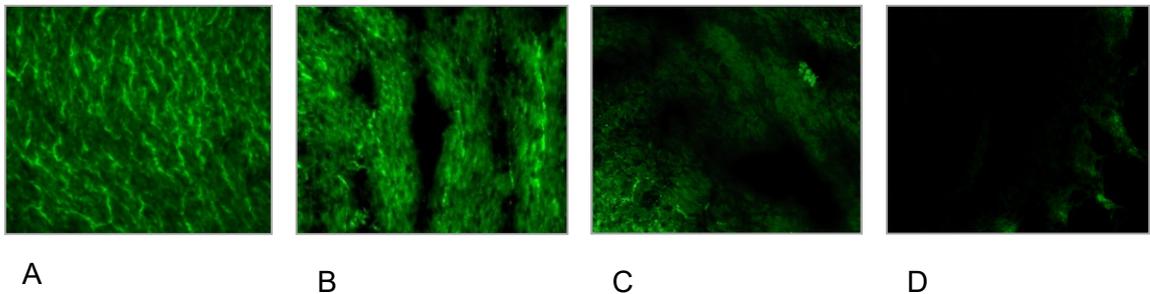


Abbildung 18: Beispiele von ungefärbten Kryoschnitten von neonatalen Maus-Herzen 3 Tage nach Transfektion mit EGFP-exprimierenden Adenoviren. EGFP-Fluoreszenz in den Kategorien A, B, C und D

4.1 Morphometrie

Die Organisolation erfolgt am jeweils dritten oder siebenten postpartalen Tag. Es werden das Körpergewicht sowie das Gewicht des Herzens, der Lunge und der Leber bestimmt. Anschließend werden die relativen (d.h. Körpergewichts-bezogenen) Organgewichte berechnet.

ERGEBNISSE

Tabelle 1: Morphologische Parameter der drei Tage alten Mäuse in Abhängigkeit von der adenoviralen Transfektion. Die relativen Organgewichte werden im Verhältnis zum Körpergewicht berechnet. Mittelwert \pm Standardfehler. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Abkürzungen: rel= relativ

Gruppe Gewicht	Kontrolle (N=16)	EGFP (N=25)	Lef-CA (N=27)	Lef-DN (N=20)	PKB (N=13)
Körpergewicht [g]	3,04 \pm 0,11	2,72 \pm 0,16	2,76 \pm 0,06	2,87 \pm 0,14	2,82 \pm 0,08
Herzgewicht [mg]	18,13 \pm 0,94	20,6 \pm 0,99	18,52 \pm 0,6	20,25 \pm 1,2	18,62 \pm 0,84
rel. Herzgew. [mg/g]	6,00 \pm 0,26	7,7 \pm 0,42	6,69 \pm 0,13	7,09 \pm 0,26	6,62 \pm 0,21
Lungengewicht [mg]	63,13 \pm 3,74	54,4 \pm 2,38	55,26 \pm 2,32	57 \pm 3,2	56,69 \pm 2,6
rel. Lungengew. [mg/g]	21,01 \pm 1,31	19,92 \pm 1,1	19,91 \pm 0,63	19,97 \pm 0,64	20,05 \pm 0,66
Lebergewicht [mg]	86,63 \pm 4,63	83,44 \pm 2,9	87,44 \pm 3,44	99,15 \pm 5	91,54 \pm 4,34
rel. Lebergew. [mg/g]	28,63 \pm 1,24	30,9 \pm 0,98	31,57 \pm 0,86	35,16 \pm 1,57	32,47 \pm 1,41

ERGEBNISSE

Tabelle 2: Morphologische Parameter der sieben Tage alten Mäuse in Abhängigkeit von der adenoviralen Transfektion. Die relativen Organgewichte werden im Verhältnis zum Körpergewicht berechnet. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Mittelwert \pm Standardfehler. Abkürzungen: rel = relativ;

Gruppe Gewicht	Kontrolle (N=19)	EGFP (N=7)	Lef-CA (N=13)	Lef-DN (N=20)	PKB (N=11)
Körpergewicht [g]	5,22 \pm 0,35	4,40 \pm 0,24	4,65 \pm 0,16	4,98 \pm 0,09	5,02 \pm 0,09
Herzgewicht [mg]	34,4 \pm 2,13	27,06 \pm 2,5	33,54 \pm 1,3	32,07 \pm 0,97	35,82 \pm 2,1
rel. Herzgew [mg/g]	6,81 \pm 0,35	6,09 \pm 0,28	7,26 \pm 0,26	6,49 \pm 0,26	7,18 \pm 0,48
Lungengewicht [mg]	106,09 \pm 5,2	90 \pm 15	101,77 \pm 3,0	109,47 \pm 5,2	116,91 \pm 3,3
rel. Lungeng. [mg/g]	21,33 \pm 1,21	16,98 \pm 2,8	22,25 \pm 1,05	21,95 \pm 0,92	23,43 \pm 0,89
Lebergewicht [mg]	166,92 \pm 9,2	151 \pm 13,5	172,4 \pm 7,6	163,2 \pm 7,14	168,6 \pm 9,15
rel. Lebergew. [mg/g]	33,01 \pm 1,62	28,6 \pm 2,54	37,15 \pm 1,26	32,67 \pm 1,19	33,75 \pm 2,01

Die Auswertung der morphologischen Parameter ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Tage alten Tieren. Bei den sieben Tage alten Mäusen zeigt sich ein Trend zu einem Anstieg der relativen Herzgewichte in den Gruppen, bei denen Lef-CA oder PKB exprimiert wurden (nicht signifikant).

Die erwartungsgemäße Gewichtszunahme der einzelnen Organe zwischen den drei und sieben Tage alten Gruppen kann in den Tabellen gezeigt werden. Im Allgemeinen

ERGEBNISSE

lässt sich feststellen, dass das Körpergewicht etwa um das 1,7fache zwischen dem dritten und siebenten Tag gestiegen ist. Das absolute Herzgewicht zeigt eine ähnliche Zunahme (Faktor 1,7).

4.2 Bestimmung der Zellzyklusaktivität

Als Maß der Zellzyklusaktivität dient in dieser Arbeit die immunhistochemische Quantifizierung des Einbaus von BrdU (Thymidinanalogon; siehe 3.6.2.).

Die Auswertung ergibt, dass sich bei den drei Tage alten Tieren der Kontrollgruppe in $0,89 \pm 0,11\%$ auf 100 gezählte Kardiomyozyten der Einbau von BrdU als Beleg einer stattgehabten S-Phase nachweisen lässt. Bei den sieben Tage alten Tieren finden sich $1,79 \pm 0,13\%$ BrdU positive Kardiomyozyten auf 100 gezählte Kardiomyozyten, d.h. auch hier ist weiterhin eine S-Phase-Aktivität nachweisbar. Die Injektion der verschiedenen Expressions-Vektoren führt weder an Tag drei noch am Tag sieben zu einer nachweisbaren Änderung der Zellzyklusaktivität.

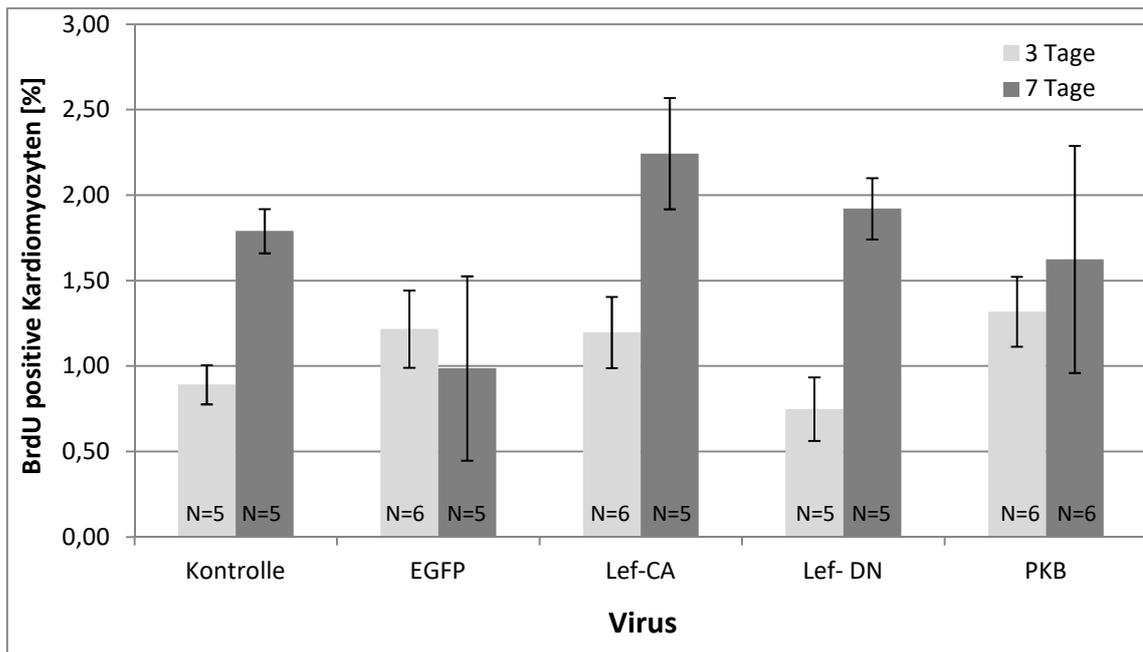


Abbildung 199: Darstellung der BrdU positiven Zellen in [%] in Abhängigkeit von der Virusintervention nach Altersgruppen. Kontrolle: unbehandelte Kontrolle; N: Anzahl.

4.3 Apoptose

Die Apoptose wird in dieser Arbeit mittels der TUNEL-Methode nachgewiesen. An die bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente können enzymatisch markierte Nukleotide eingebaut werden, welche sich anschließend anfärben lassen (siehe 3.6.3).

Die Auswertung zeigt, dass sich apoptotische Zellen insgesamt nur sehr selten beobachten lassen, was einen statistischen Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erschwert. In den unbehandelten Kontrollgruppen findet sich der Nachweis von Apoptose bei $0,25 \pm 0,08\%$ in der drei Tage alten Gruppe und bei $0,15 \pm 0,09\%$ in der sieben Tage alten Gruppe. In der sieben Tage alten Kontrollgruppe zeigt sich somit tendenziell ein Rückgang der Apoptoserate.

Die übrigen Gruppen zeigen nochmals geringere Apoptoseraten. In der Lef-CA Gruppe fällt die Apoptoserate von $0,06 \pm 0,05\%$ an Tag 3 auf $0,01 \pm 0,005\%$ an Tag 7. In der PKB-Gruppe verringert sich die Apoptoserate ebenfalls von $0,13 \pm 0,05\%$ auf $0,1 \pm 0,03\%$.

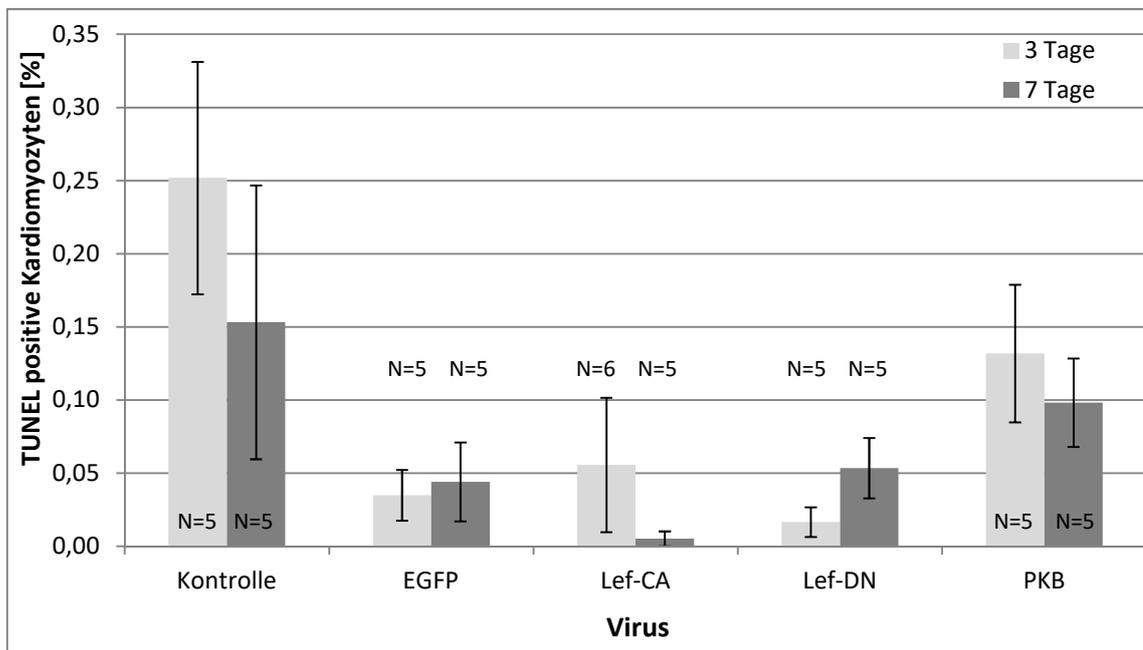


Abbildung 20: Darstellung der TUNEL positiven Kardiomyozyten in [%] in Abhängigkeit von der Virusintervention nach Altersgruppen. Kontrolle: unbehandelte Kontrolle; N: Anzahl

ERGEBNISSE

In den Gruppen EGFP und Lef-DN steigt die Anzahl nachgewiesener Apoptose tendenziell im Zeitverlauf an: in der EGFP Gruppe von $0,03 \pm 0,02\%$ auf $0,04 \pm 0,03\%$ und in der Lef-DN Gruppe von $0,02 \pm 0,01\%$ auf $0,05 \pm 0,02\%$.

4.4 Hypertrophie

Zur Analyse der Hypertrophie von Kardiomyozyten wird in dieser Arbeit die Myozytenquerschnittsfläche (MCSA) berechnet. (siehe 3.6.4.). Zur Auswertung der Daten werden mindestens fünf Mäuse je Gruppe verwendet und je Maus mindestens zehn MCSA-Messreihen vorgenommen.

In den Kontroll-Gruppen zeigen sich Kardiomyozytenquerschnittsflächen durchschnittlich von $35,4 \pm 1,1\mu\text{m}^2$ bei drei Tage alten Mäusen und von $46,3 \pm 6,2\mu\text{m}^2$ bei sieben Tage alten Mäusen. Die Querschnittsfläche erhöht sich damit innerhalb dieser 4 Tage um 30,8%.

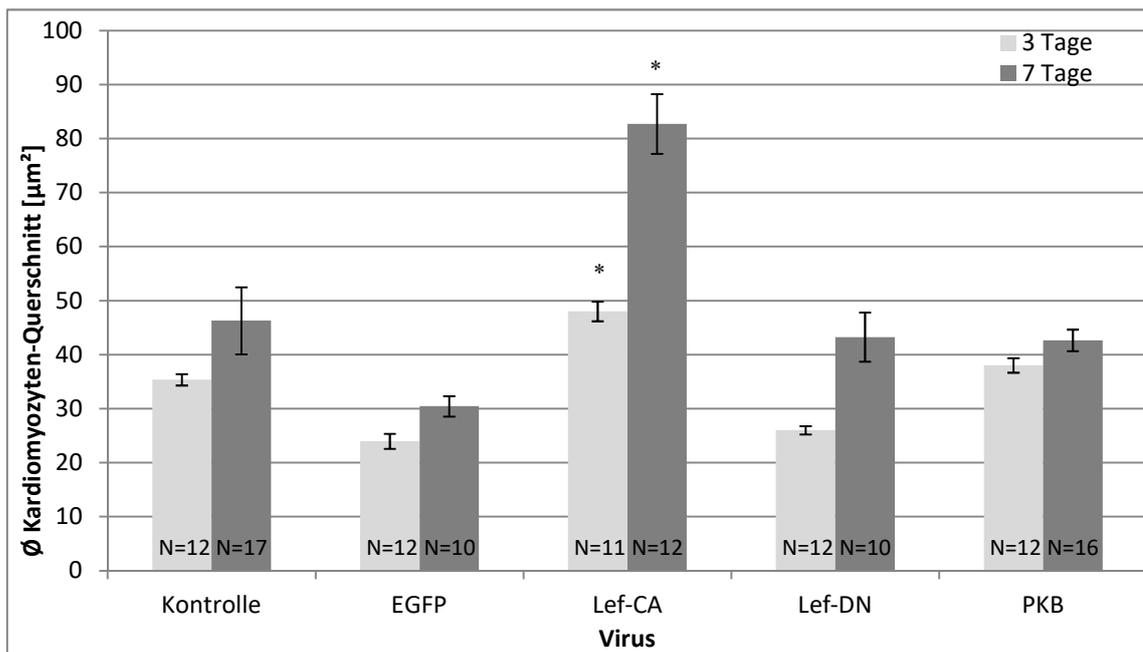


Abbildung 21: Darstellung des MCSA in [μm^2] in Abhängigkeit der Virusintervention nach Altersgruppen. Links: drei Tage alte Gruppe, rechts sieben Tage alte Gruppe. Kontrolle: unbehandelt; N: Anzahl. * = $p < 0,05$ (ANOVA).

Bei den Interventionsgruppen zeigt sich in der Lef-CA Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen eine signifikante Zunahme der Zellquerschnittsfläche sowohl bei drei

ERGEBNISSE

Tagen mit $48,0 \pm 1,8\mu\text{m}^2$ als auch bei sieben Tagen mit $82,74 \pm 5,5\mu\text{m}^2$. Zwischen den dritten und siebenten Tag, ist eine Größenzunahme 72,4% zu verzeichnen.

In den übrigen Gruppen (EGFP, Lef-DN und PKB) zeigen sich im Vergleich zur Kontrollsituation keine wesentlichen Veränderungen.

4.5 Interstitielle Kollagenfraktion

Um den Einfluss der verschiedenen rekombinanten Konstrukte auf den kardialen Kollagengehalt beurteilen zu können, wird in dieser Arbeit die interstitielle Kollagenfraktion (*interstitial collagen fraction*; ICF) untersucht (siehe 3.6.5.). Den Daten liegen mindestens fünf Mäuse je Gruppe und pro Maus mindestens zehn Messungen zu Grunde.

Bei der Quantifizierung des Gefäßendothels zeigen sich in der Kontroll-Gruppe bei den drei und sieben Tage alten Mäusen keine wesentlichen Unterschiede. Der prozentuale Flächenanteil des Gefäßendothels liegt bei den drei Tage alten Mäusen bei $2,4 \pm 0,18\%$ und bei den sieben Tage alten Mäusen vergleichbar bei $2,28 \pm 0,18\%$.

In den PKB Gruppen zeigt sich eine deutliche Zunahme des Gefäßendothels. Bei drei Tage alten Mäusen lässt sich ein tendenziell erhöhter Gefäßendothel-Anteil von $3,05 \pm 0,11\%$ und am siebenten Tag ein signifikanter Anstieg auf $3,37 \pm 0,27\%$ nachweisen ($p < 0,05$). Damit ist der Gefäßendothel-Anteil in der PKB Gruppe am dritten Tag um 28% und am siebenten Tag um 47% höher als in der Kontroll-Gruppe.

Die Gruppen EGFP, Lef-CA und Lef-DN zeigen in Bezug auf die Quantifizierung des Gefäßendothels keine wesentlichen Veränderungen.

Bei der Bestimmung des Gesamtkollagens zeigen sich in den drei und sieben Tage alten Kontroll-Gruppen ähnliche Kollagenanteile. Die drei Tage alten Tiere weisen ein Gesamtkollagenanteil von $25,01 \pm 0,86\%$ und die sieben Tage alten Tiere von $25,58 \pm 0,94\%$ auf.

ERGEBNISSE

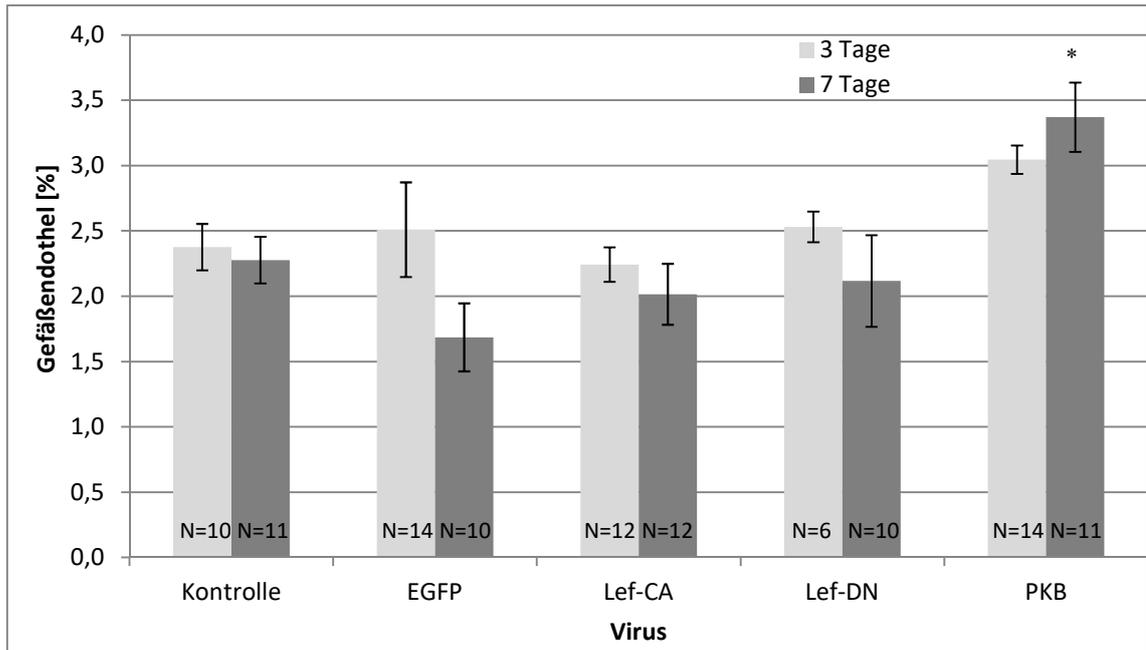


Abbildung 22: Flächenanteil in [%] des Gefäßendothels in den Herzen von neonatalen Mäusen in Abhängigkeit von der Virusintervention. Kontrolle: unbehandelte Kontrolle. N: Anzahl. *= $p < 0,05$ (ANOVA).

Bei den Interventionsgruppen zeigt sich bei den drei Tage alten Tieren keine wesentliche Veränderung: Lef-CA $21,49 \pm 1,25\%$; PKB $24,66 \pm 0,9\%$; EGFP $25,10 \pm 0,68\%$; Lef-DN $23,27 \pm 1,03\%$). An Tag 7 findet sich jedoch bei der PKB-Expression eine signifikante Zunahme des Gesamtkollagens auf $32,01 \pm 1,63\%$ an. Dies entspricht einer Erhöhung von $25,13\%$ im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

ERGEBNISSE

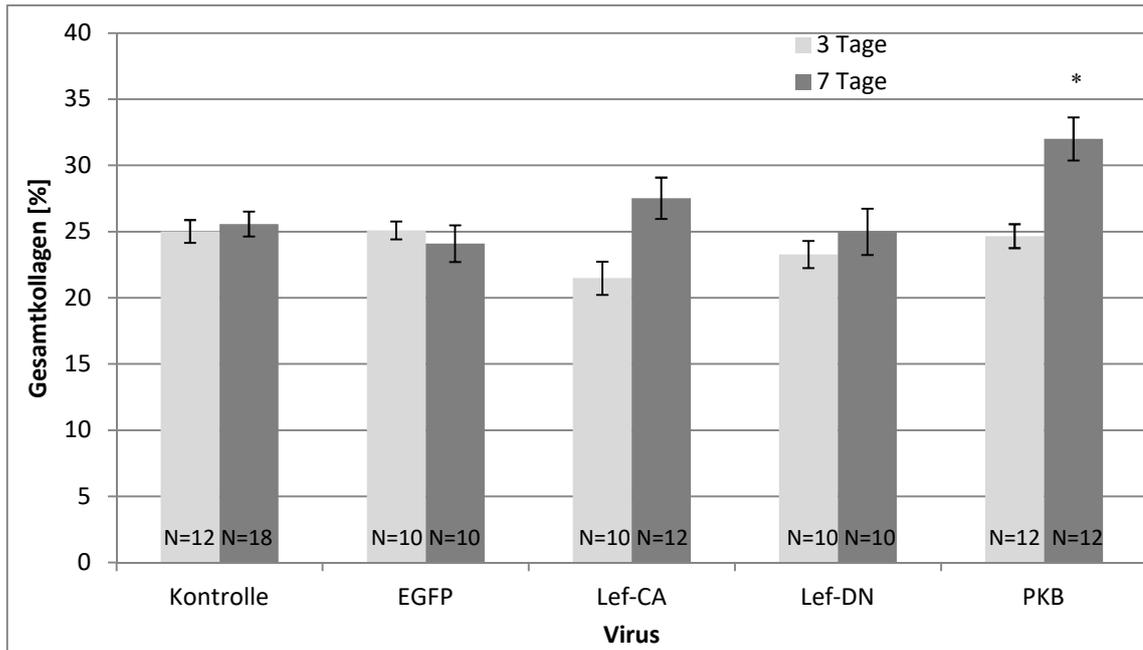


Abbildung 23: Flächenanteil in [%] des Gesamtkollagens in den Herzen von neonatalen Mäusen in Abhängigkeit von der Virusintervention. Kontrolle: unbehandelte Kontrolle. N: Anzahl. *= $p < 0,05$ (ANOVA).

Die interstitielle Kollagenfraktion (ICF) zeigt innerhalb der Kontroll-Gruppe im Zeitverlauf keine wesentlichen Veränderungen. Bei drei Tage alten Mäusen lässt sich eine ICF von $23,35 \pm 0,39\%$ und bei sieben Tage alten Mäusen von $22,06 \pm 1,1\%$ nachweisen.

Analog zum Anstieg des Gesamtkollagens steigt die ICF in der PKB-Gruppe bei sieben Tage alten Tieren an auf $28,78 \pm 1,73\%$. Dies entspricht einer Steigerung um $30,46\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

In den Gruppen EGFP und Lef-DN zeigen sich keine weiteren Auffälligkeiten

ERGEBNISSE

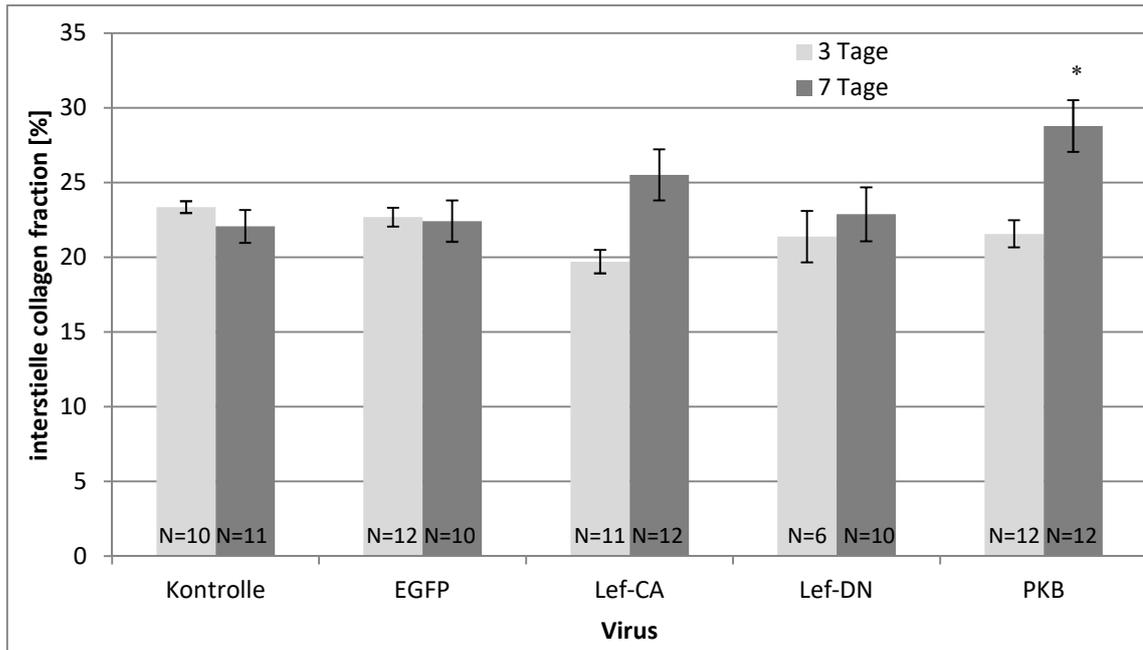


Abbildung 24: Flächenanteil in [%] der berechneten *interstitial collagen fraction* in Herzen von neonatalen Mäusen in Abhängigkeit der Virusintervention. Kontrolle: unbehandelte Kontrolle. N: Anzahl. *= $p < 0,05$ (ANOVA).

4.6 Molekularbiologische Analysen

Neben den funktionellen Auswirkungen auf Zellzyklus und Proliferation, soll in dieser Arbeit auch die unmittelbare Auswirkung der verschiedenen Konstrukte auf die Expression ausgewählter Proteine beleuchtet werden, um weitere Zusammenhänge von Signalkaskaden zu untersuchen. Dies wird hier durch die elektrophoretische Proteinauftrennung von Herzlysaten und anschließender Detektion mittels Western Blot ermöglicht (siehe 3.7.).

Dazu werden die Proteinlysate von je vier Mäuseherzen pro Gruppe genutzt und auf folgende Proteine untersucht: Cyclin D1, Cyclin D3, GSK, Akt und β -catenin. Die Kammern der SDS-Gele werden jeweils nach folgendem Schema beladen:

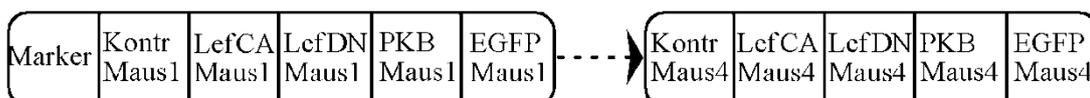


Abbildung 25: Beladung der Kammern der SDS-Gele für die Elektrophoresen.

ERGEBNISSE

Zur Kontrolle der Methode wird der Nachweis des konstitutiv exprimierten Gens GADPH erbracht.

Zunächst werden zu Validierung der veränderten Genexpression durch die eingesetzten rekombinanten Adenoviren neben dem indirekten Transfektionsnachweis mittels EGFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 18) zusätzlich ein direkter Proteinnachweis mittels Western blot durchgeführt, in dem die zur Expression gebrachten Gene quantifiziert werden.

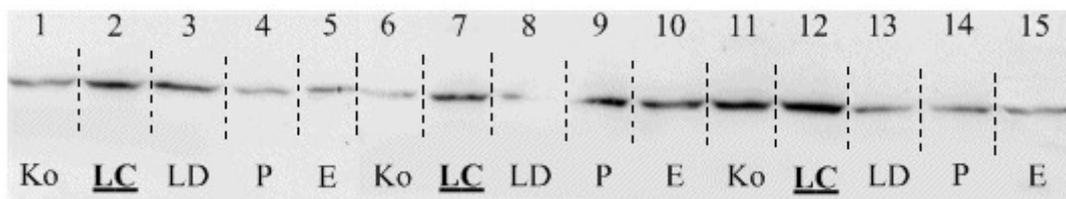


Abbildung 26: Western Blot mit Anti-Lef-1. Ko = Kontrolle, LC = Lef-CA, LD = Lef-DN, P = PKB, E = eGFP.

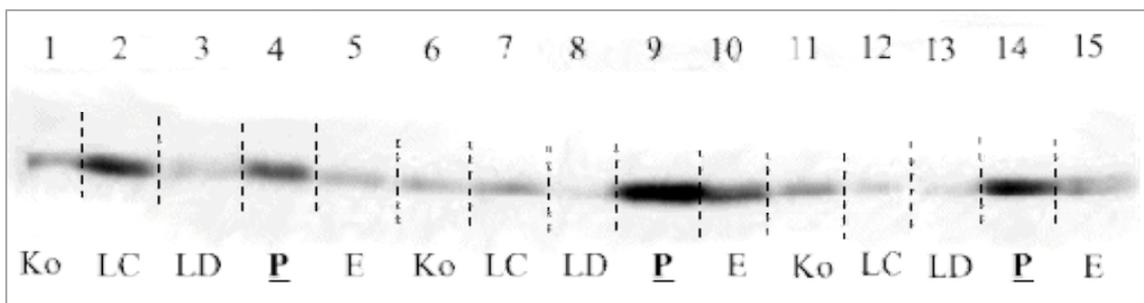


Abbildung 27: Western Blot mit Anti-PKB. Ko = Kontrolle, LC = Lef-CA, LD = Lef-DN, P = PKB, E = eGFP.

Die Lef-CA und PKB Gruppe zeigt beim Einsatz eines Lef-1- bzw. Akt-Antikörpers den erwarteten Nachweis der rekombinant exprimierten Proteine. Es zeigt sich, dass der verwendete Lef-Antikörper jedoch nicht an die dominant-negative Isoform Lef-DN bindet.

In der Kontrollgruppe ist eine deutliche Expressionssteigerung von PKB zwischen Tag 3 und Tag 7 zu erkennen (Zunahme um 108,68%). Die PKB-Gruppe selbst zeigt erwartungsgemäß die höchsten Proteinkonzentrationen bei drei und sieben Tagen.

ERGEBNISSE

In den Gruppen EGFP, Lef-CA und Lef-DN zeigt sich eine ähnliche hohe Konzentration und Zunahme am siebenten Tag wie in der Kontrollgruppe.

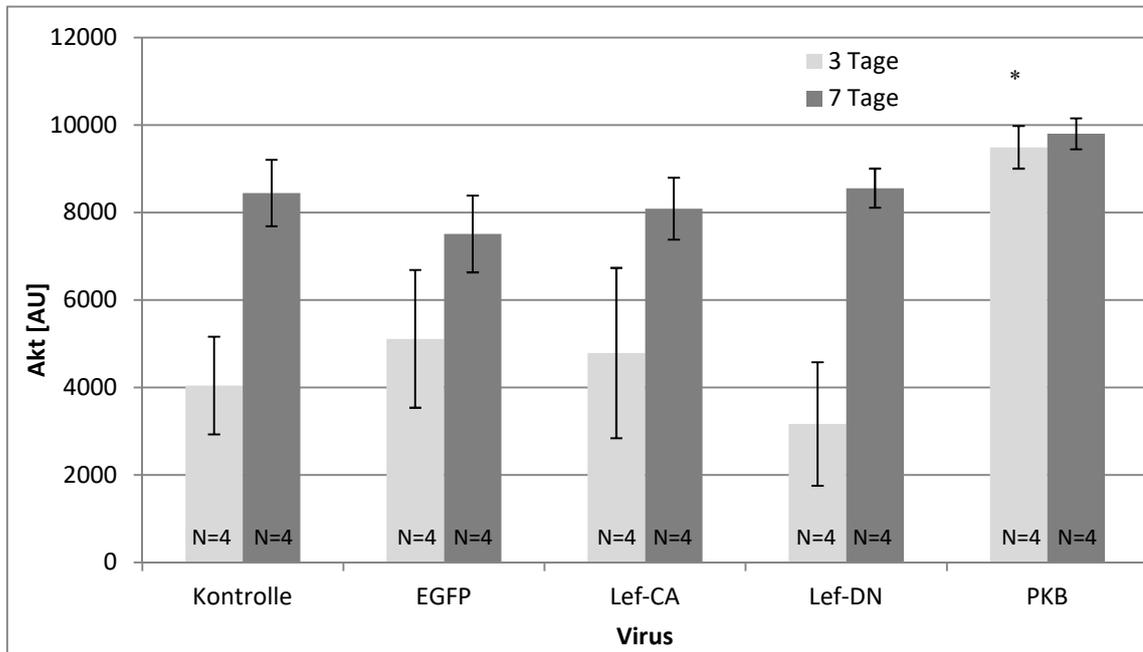


Abbildung 28: Proteinexpression von PKB in Abhängigkeit von den verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukten (Western Blot). Kontrolle: unbehandelte Kontrolle. $*=p<0,05$ (ANOVA).

4.6.1 Cyclin D1

In der Kontrollgruppe zeigt sich bei drei und sieben Tage alten Mäusen eine vergleichbare Expression von Cyclin D1.

Nach Expression der rekombinanten Konstrukte Lef-CA und PKB zeigt sich ein heterogenes Bild. Bei Lef-CA lässt sich nach drei Tagen ein tendenziell geringerer Cyclin D1-Proteinanteil von im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachweisen (-9,28%) am siebenten steigt dieser jedoch über das Niveau der Kontroll-Gruppe hinaus (+21,07%).

Bei PKB zeigt sich eine abweichendes Bild: zunächst ist die Proteinexpressionen bei drei Tage alten Mäusen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nahezu gleich (+1,24%), nach sieben Tagen fällt in der PKB-Gruppe jedoch das Expressionslevel auf 60% des Wertes der sieben Tage alte Kontrollgruppe.

ERGEBNISSE

Bei der EGFP-Gruppe zeigt sich ebenfalls an Tag 3 eine tendenziell geringe Expression von Cyclin D1, die an Tag 7 jedoch das Niveau der Kontrolle leicht übersteigt. Nach gezielter Expression von Lef-DN entspricht die Cyclin D1-Expression weitestgehend der Kontrollsituation.

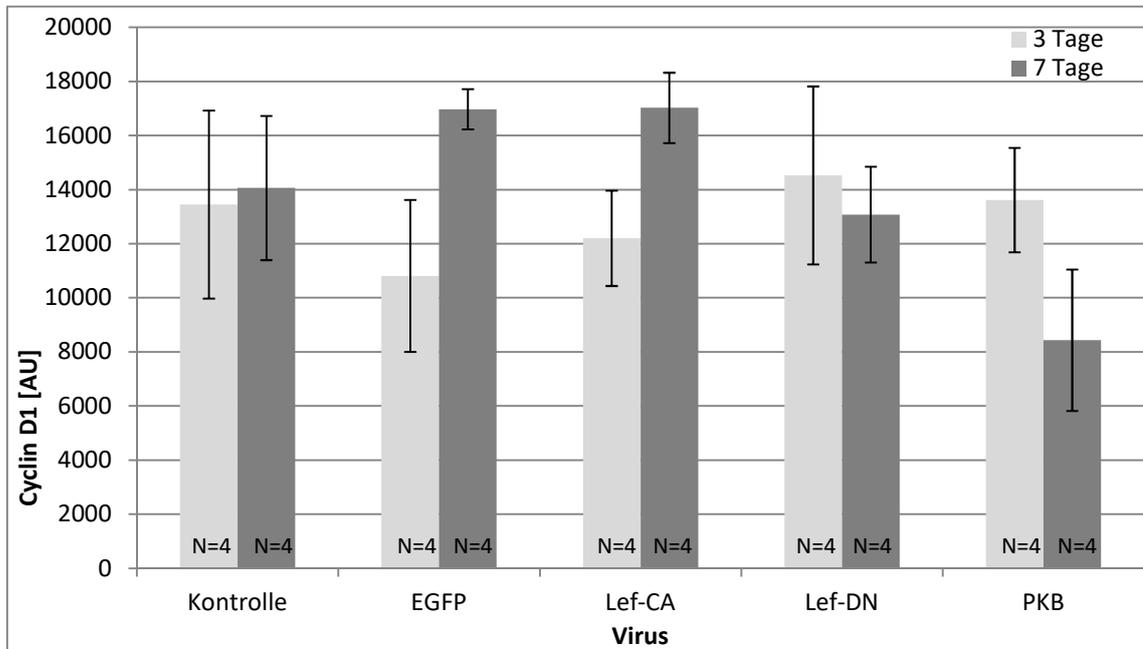


Abbildung 29: Proteinexpression von Cyclin D1 in Abhängigkeit von den verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukten (Western Blot). Kontrolle = unbehandelte Kontrolle.

4.6.2 Cyclin D3

Bei der quantitativen Bestimmung von Cyclin D3 weist die Kontroll-Gruppe zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein relativ niedriges Proteinexpressionsniveau auf. Im Vergleich zu Tag 3 nimmt bei sieben Tage alten Mäusen der Cyclin D3 Anteil um 29,43% ab.

Hingegen zeigt sich bei der Lef-CA Gruppe ein deutlicher und signifikanter Anstieg von Cyclin D3. Nach drei Tagen steigt der gemessene Proteinanteil um 132,16% und bei sieben Tagen um 75,28%.

Die PKB-Gruppe zeigt keine wesentlichen Veränderungen gegenüber der Kontroll-Gruppe.

ERGEBNISSE

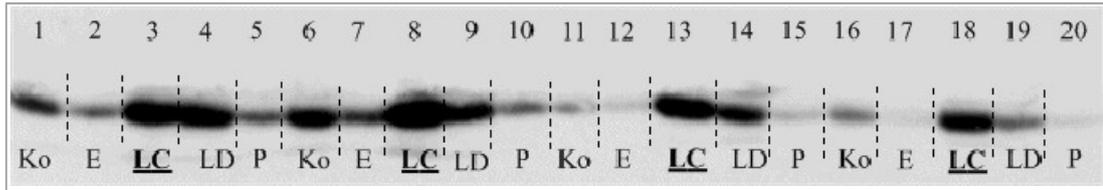


Abbildung 30: Western Blot zur Quantifizierung von Cyclin D3 sieben Tage nach Injektion der verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukte. Ko = Kontrolle, E = EGFP, LC = Lef-CA, LD = Lef-DN, P = PKB.

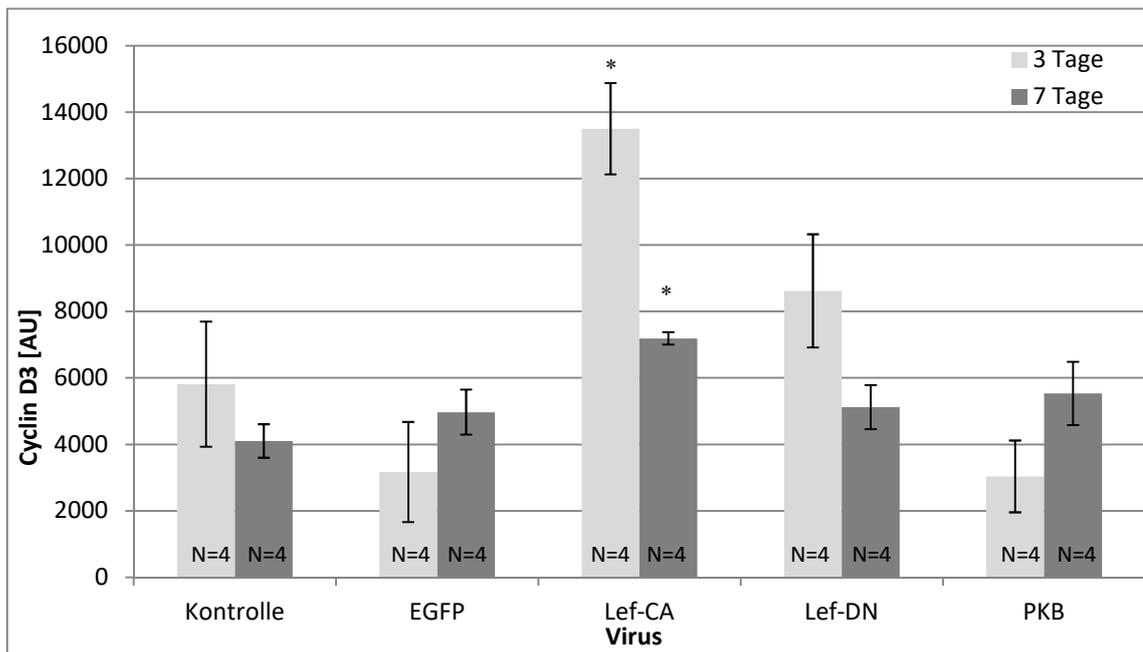


Abbildung 31: Proteinexpression von Cyclin D3 in Abhängigkeit von den verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukten (Western Blot). Kontrolle= unbehandelte Kontrolle. *= $p < 0,05$ (ANOVA).

4.6.3 GSK-3

Bei der Untersuchung der GSK-3 (*glykogen synthase kinase - 3*) lässt sich feststellen, dass es zu einem allgemeinen Expressionsanstieg in allen Gruppen im Zeitverlauf kommt.

In der Kontroll-Gruppe steigt das GSK-3-Level um 70,61% zwischen drei und sieben Tage alten Mäusen.

ERGEBNISSE

In der PKB-Gruppe findet sich die höchste GSK-3-Expression gegenüber der Kontrollgruppe sowohl bei drei (+103,44%) als auch bei sieben Tagen (+41,47%). Der prozentuale Anstieg in der PKB Gruppe innerhalb von vier Tagen fällt jedoch deutlich geringer aus als in der Kontrollgruppe (+18,64%).

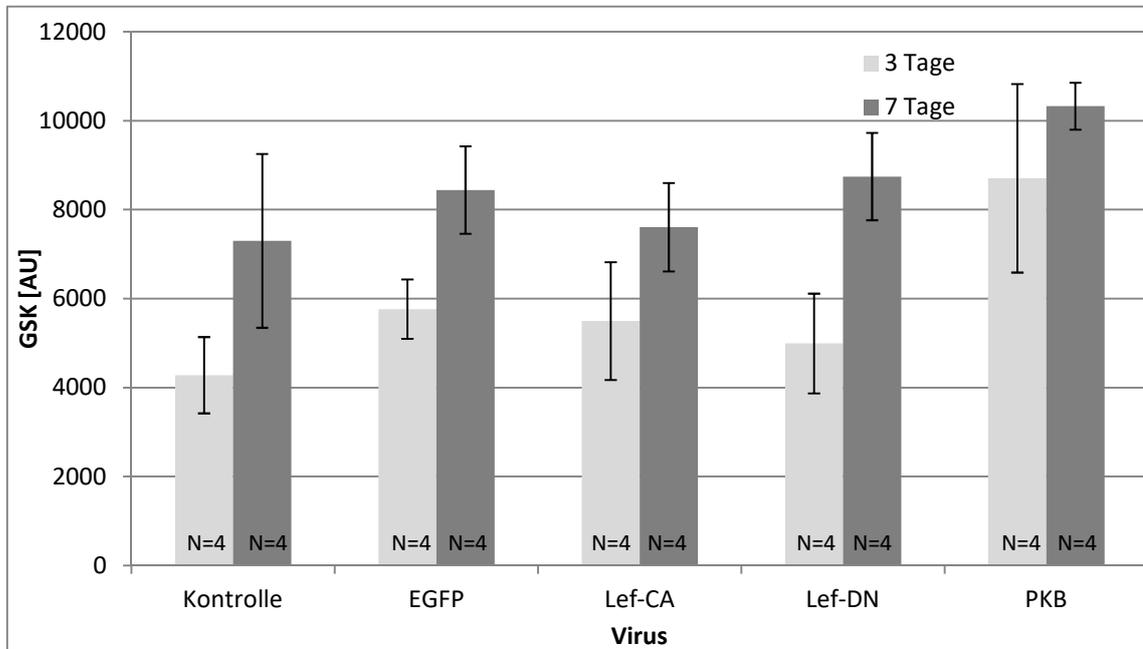


Abbildung 32: Proteinexpression von GSK in Abhängigkeit von den verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukten (Western Blot). Kontrolle= unbehandelte Kontrolle.

4.6.4 β -catenin

Die Kontroll-Gruppe zeigt bei drei Tagen die höchste Proteinkonzentration an β -catenin von allen untersuchten Gruppen. An Tag 7 fällt die Konzentration jedoch deutlich um 52,01% ab.

In den Behandlungsgruppen zeigen sich in Bezug auf die β -catenin-Expression keine relevanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollsituation. Einzig in der PKB-Gruppe lässt sich tendenziell eine geringe β -catenin-Expression sowohl bei drei Tage als auch bei sieben Tage alten Mäusen detektieren.

ERGEBNISSE

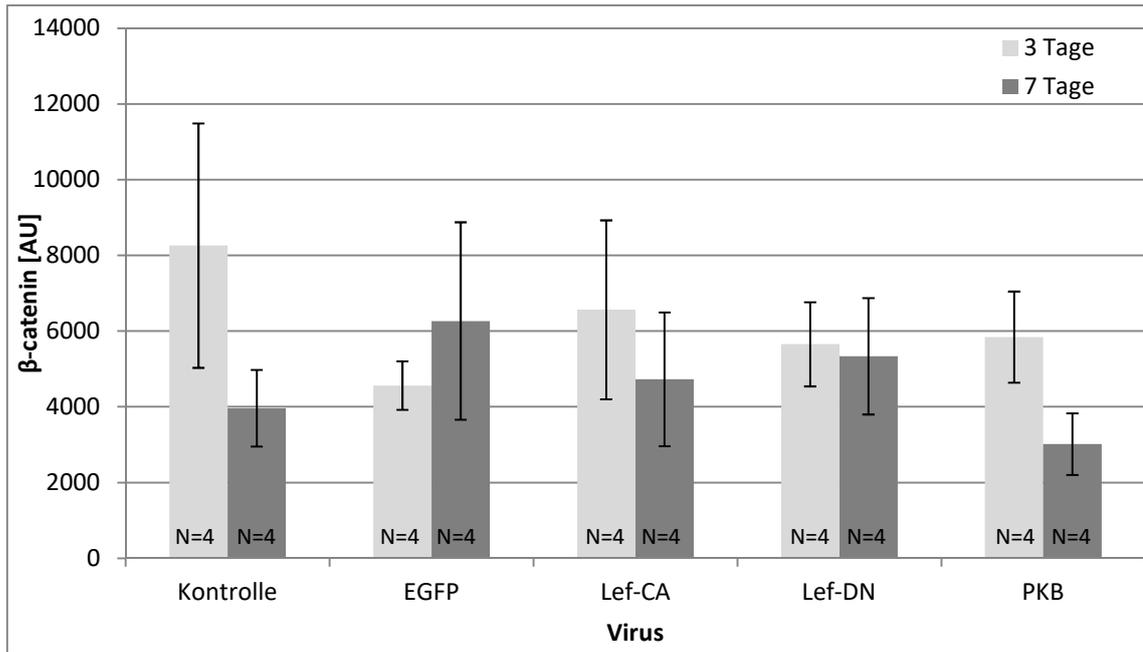


Abbildung 33: Proteinexpression von β -catenin Abhängigkeit von den verschiedenen adenoviralen Expressionskonstrukten (Western Blot). Kontrolle = unbehandelte Kontrolle.

4.7 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die Auswertung der morphometrischen Parameter kann tendenziell einen Anstieg der relativen Herzgewichte im Sinne einer kardialen Hypertrophie nach gezielter Expression sowohl von Lef-CA als auch von aktivierter PKB bei sieben Tage alten Mäusen aufzeigen. Dies geht im Falle der Expression von Lef-CA einher mit einer gesteigerten Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten sowie einem Anstieg der Myozytenquerschnittsfläche und es findet sich ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von Cyclin D3. Nach Expression von PKB findet sich dagegen eine Zunahme der Kapillardichte, des Gesamtkollagens sowie der interstitiellen Kollagenfraktion im Sinne einer vermehrten Fibrose.

5 Diskussion

In den Industrienationen stellen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems weiterhin die Haupttodesursache dar [1]. Diese sind u.a. Folgeerscheinungen eines chronischen artherosklerotischen Prozesses, der zu einer Verengung der Koronargefäße führt. Als Konsequenz einer dauerhaften Verengung der Gefäße, kommt es zur Ischämie oder zu einem fulminanten Herzinfarkt. Auf zellulärer Ebene bedeutet eine Minderperfusion und ein Sauerstoffmangel eine Schädigung und Absterben von Kardiomyozyten. Im klinischen Alltag haben pharmakologische und interventionelle Behandlungen bereits eine deutliche Verringerung der Morbidität und Mortalität erreichen können [103, 104].

Ungeachtet dessen ist der durch Ischämie hervorgerufene Zellschaden in der Regel irreparabel, da sich adulte Kardiomyozyten vorrangig in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und die Fähigkeit zum Wiedereintritt in die Zellteilung verloren haben [75, 77, 78]. Die regulierenden Mechanismen und Kaskaden des Zellzyklus von Kardiomyozyten sind daher von großem Interesse.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits zeigen können, dass Lef-1 und PKB einen wichtigen Stellenwert bei der Regulierung des Zellzyklus und der Hypertrophie von Kardiomyozyten haben [45, 64]. Diese Arbeit will die Auswirkungen untersuchen, die sich aus einer gezielten Veränderung der Genexpression von Lef und PKB in neonatalen Kardiomyozyten in Bezug auf Proliferation, Hypertrophie und Remodeling ergeben.

Um eine dauerhafte in vivo-Expression zu ermöglichen, steht die Verwendung von verschiedenen adenoviralen Vektoren zur Verfügung. Die Verwendung von adenoviralen Vektoren ist bereits in der Arbeitsgruppe gut etabliert und zeigt verlässliche und hohe Transduktionsraten von 78 +/- 8% [85], so dass sich für dieses Verfahren entschieden wurde.

Die herznahe Injektion der Virus-Suspensionen unter Kaltlicht-Durchleuchtung stellt bei neonatalen Mäusen eine besondere Herausforderung dar. Daher werden diese Eingriffe stets von einem erfahrenen Mitarbeiter durchgeführt, um hierbei eine höchstmögliche Anwendungssicherheit zu gewährleisten. Da die genaue Platzierung der Nadel und folglich die Aufnahme der Viren durch die Kardiomyozyten unterschiedlich ausfallen, werden nur jene Mäuse in die Versuche aufgenommen,

deren Herzen eine entsprechende EGFP-Fluoreszenz als Nachweis der erfolgreichen viralen Transfektion aufweisen (siehe Abb. 21).

5.1 Lef-1

Kardiomyozyten unterliegen einer Vielzahl von Regulationsmechanismen. Lef-1 stellt mit seiner Fähigkeit Transkriptionsvorgänge auszulösen, einen zentralen Mediator des Wnt-Signalweges dar. Störungen dieser Kaskade lösen Fehlentwicklung, Krankheit und Dysfunktionen aus [42, 105]. Lef-1 erfährt eine wesentliche Aktivierung durch β -catenin, welches ebenfalls durch den Wnt-Signalweg unter Kontrolle der GSK reguliert wird [34, 39].

In der Literatur finden sich zum direkten Einfluss von Lef-1 vorwiegend Untersuchungen zu Hypertrophie und Zellwachstum in Darmtumor-Zellen [26] und in B- und T-Zellen bei Mäusen und Menschen [25, 106, 107], jedoch bislang weniger zu Zellzyklusaktivität und Cyclin-Expression in Kardiomyozyten. Vorausgehende Arbeit von N. Schwarz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ebelt zeigen, dass sich unter der Verwendung eines adenoviralen Gentransfers mit konstitutiv-aktiven und dominant-negativen Formen von Lef-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten ein Einfluss auf den Zellzyklus in der Zellkultur darstellen lässt. Bei der konstitutiv-aktiven Form von Lef-1 befinden sich vermehrt Kardiomyozyten in der G2-Phase und weniger Zellen in der G0/G1-Phase im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Dies lässt annehmen, dass die Expression von konstitutiv-aktivem Lef-1 in Kardiomyozyten zu einem G2-Phasen-Arrest führt und dieser typisch für hypertrophes Wachstum ist.

Weitere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen bei der Verwendung von murinen Stammzellen, dass sich unter der Expression von Lef-1 muskelspezifische Proteine (Pax7, Myf5, MyoD) aktivieren lassen [108]. Ein direkter Effekt auf Kardiomyozyten konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

In hämatopoetischen Stammzellen wird Lef-1 eine zentrale Rolle in der Regulierung von Zellteilung und Proliferation zugeschrieben [106]. Bei kongenitalen Störungen der Myelopoese fällt eine deutlich geringere Konzentration von Lef-1 und damit verbunden eine verringerte Expression der *target genes* wie *Cyclin D*, *c-myc* und *survivin* sowie eine verringerte Proliferation und gesteigerte Apoptose auf [106]. In Bezug auf die hier vorliegende Untersuchung unterstützt dies den gewählten Ansatz, dass eine

DISKUSSION

Expression von Lef-1 auch in Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Proliferation und Inhibition der Apoptose führen könnte.

In dieser Arbeit zeigt sich unter dem Einfluss eines aktiven Lef-1 (Lef-CA) bei perinatalen Mäusen eine tendenzielle Zunahme des relativen Herzgewichts. Auf der Suche nach den möglichen Faktoren, welche diesen Effekt begründen, zeigen sich eine vermehrte Proliferation, eine Zunahme der Myozytengröße und eine gesteigerte Expression von Cyclin D3.

D-Cycline regulieren bekannterweise im CdK4- und CdK6-Komplex insbesondere den G1/S-Übergang des Zellzyklus, so dass eine erhöhte Cyclin D3-Konzentration eine erhöhte Zellzyklusaktivität erklären und eine relative Herzgewichtszunahme zur Folge haben kann. In dieser Untersuchung ist die Expression von Cyclin D3 unter aktivem Lef-1 bei drei Tage alten Mäusen signifikant höher, ohne dass jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits ein Effekt auf die S-Phase (BrdU-Einbau) nachweisbar wäre. Möglicherweise besteht hier eine Latenzphase zwischen der Expression von Cyclin D3 und einer Steigerung der S-Phase-Aktivität, so dass der Effekt auf den Zellzyklus (in S-Phase befindliche Kardiomyozyten) nicht detektiert wurde. Für Cyclin D1 lässt sich ein vergleichbarer Effekt anhand der vorliegenden Daten nicht nachweisen, wenngleich Cyclin D1 als *target gen* von Lef-1 in anderen Zellarten bekannt ist [63, 74].

In weiteren Mausmodellen sind in vorherigen Studien proliferationssteigernde Effekte von D-Cyclinen nachgewiesen worden [76, 109]. Während der allgemeine Einfluss und das regulierende Einwirken von D-Cyclinen und CDKs anerkannt sind (siehe 1.8.), haben weiterführende Untersuchungen aufgezeigt, dass die jeweilige Konzentration und der Zugang zum Zellkern für Cyclin D1, D2 und D3 unterschiedlich ausfallen. Pasmurathi et al. haben im transgenen Mausmodell zeigen können, dass es unter der Expression von Cyclin D1, D2 und D3 zu einer vermehrten DNA-Synthese kommt. Nach einer herbeigeführten kardialen Ischämie, kommt es zu einer *zytosolischen* Zunahme von Cyclin D1 und D3 bei MHC-cycD1 und MHC-cycD3 Mäusen sowie gleichzeitig zu einer Reduktion der DNA Synthese. Im Gegensatz dazu zeigen MHC-cycD2 Mäuse nach kardialer Ischämie weiterhin eine hohe nukleäre Konzentration, die zu einer vermehrten DNA-Synthese, Steigerung der Zellproliferation und Reduzierung der Infarktgröße führt. Es wird angenommen, dass dieser Effekt für Cyclin D2 auf eine erhöhte Translokationsfähigkeit in den Zellkern zurückzuführen ist [76].

DISKUSSION

Der unmittelbare Zusammenhang zwischen einer Überexpression von β -catenin und einer Lef-1-vermittelten Erhöhung von Cyclin D1 ist bereits in Darmtumor-Zellen nachgewiesen [74]. Im Plasmid-Vektor-Modell mit aktiven und inaktiven Mutationen des Wnt-Signalweges kann gezeigt werden, dass eine Stabilisierung von β -catenin eine zuverlässige β -catenin/Lef-1-Komplex-vermittelte Erhöhung von Cyclin D1 zur Folge hat.

In der vorliegenden Untersuchung befindet sich am C-terminalen Ende des konstruierten Lef-Gens ein Fragment des β -catenins, wodurch eine konstitutiv aktive Form entsteht und die Expression somit unabhängig von der zytosolischen β -catenin Konzentration erfolgt. Unter dieser konstitutiven Aktivierung des β -catenin/Lef-1-Komplexes, lässt sich der oben nachgewiesene Effekt auf Cyclin D1 bei murinen Kardiomyozyten in vivo nicht bestätigen. Interessanter Weise zeigt sich jedoch ein positiver und signifikanter Effekt bei Cyclin D3.

Verschiedene Autoren haben bereits unterschiedliche Zellkern Translokationsfähigkeit diskutiert [76, 77]. In dieser Versuchsanordnung ist unter dem konstitutiv aktivierten Lef-1, β -catenin ebenfalls unabhängig aktiviert und es kommt zu keiner wesentlichen Veränderung der zytosolischen β -catenin Konzentration. β -catenin scheint somit kein regulierender Schlüssel bei der Translokation in den Zellkern zu sein.

Als ein möglicher Inhibitor für einen eingeschränkten Zugang von Cyclinen zum Zellkern haben Tamamori-Adachi et al. den CDK Inhibitor p27kip1 beschrieben [77]. Es kann gezeigt werden, dass Cyclin D1 mit Hilfe einer nukleären Lokalisationssequenz (*Cyclin-D1-NLS*) zu einer erhöhten Translokation in den Zellkern und zu einer erhöhten Proliferation bei Kardiomyozyten der Ratte führt. Dieser Effekt ist jedoch auf ein bis zwei Zellzyklen limitiert. Tamamori-Adachi et al. haben einen Anstieg des CDK-Inhibitors p27kip1 während der Zyklen beobachtet und schlussfolgern, dass dessen Anstieg zur Limitierung der Proliferation führt. Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) wirkt als ein negativer Regulator auf p27kip1. Bei dessen zusätzlichem Einsatz zeigt sich eine verbesserte Proliferation von *Cyclin-D1-NLS*, welche die Autoren auf die ausbleibende Inhibition von p27kip1 auf Cyclin D1 zurückführen [77].

Für diese Arbeit und deren Ergebnisse, lässt sich ebenfalls vermuten, dass ein proliferationssteigernder Effekt von intrazellulärem Cyclin D von der

DISKUSSION

Translokationsfähigkeit in den Zellkern abhängt. Negativ regulierende Effekte wie sie Tamamori-Adachi et al. beschreiben haben, dürfen auch für die hier untersuchten Cycline D-Effekte angenommen werden.

Anhand der vorliegenden Messergebnisse kann als Grund für die Zunahme des relativen Herzgewichts in der Lef-CA Gruppe ein signifikanter Anstieg des Zelldurchmessers im Sinne einer Kardiomyozyten-Hypertrophie nachgewiesen werden. Dies bestätigt bisherige Erkenntnisse, dass D-Cycline im Cyclin-D/CDK4-Komplex die Hypertrophie von Kardiomyozyten der Ratte induzieren [79].

β -catenin ist als Co-Faktor von Lef-1 allgemein akzeptiert (siehe 1.4.). Eine gesteigerte Expression bzw. Aktivierung von β -catenin löst vermehrt Transkriptionsvorgänge aus [106]. Bisherige Studien haben die Auswirkung einer induzierten β -catenin Expression auf Lef-1 untersucht. Diese vorliegende Studie untersucht die Auswirkung auf β -catenin unter einer gesteigerten Expression von Lef-1 [63, 110]. In den eigenen Daten findet sich jedoch weder in der Lef-CA Gruppe noch in der Lef-DN Gruppe der Nachweis einer relevanten Expressionsbeeinflussung von β -catenin.

In vielen Literaturquellen findet sich die Aussage, dass sich postnatale Kardiomyozyten in der G0-Phase befinden und ihre Fähigkeit zur Zellteilungsfähigkeit verloren haben [75, 77]. In dieser Studie findet sich eine S-Phase-Aktivität von 0,5-2 auf 100 Kardiomyozyten in allen Gruppen einschließlich der Kontrollgruppe (gemessen am 24stündigen BrdU-Einbau).

Die Frage nach der postnatalen Teilungsfähigkeit von Kardiomyozyten ist ein in der Wissenschaft noch nicht einheitlich diskutiertes Thema, jedoch von hohem medizinischem Interesse, da bei kardialen Krankheitsbildern wie Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt die mangelnde Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten ein wesentliches Kriterium für die Schwere der Erkrankung darstellt. Diesbezüglich haben sich bereits viele Autoren geäußert. Einigkeit besteht darin, dass die Proliferationsfähigkeit adulter Kardiomyozyten stark eingeschränkt ist [111].

Zellteilung ist bei der Entwicklung des Herzens, wie auch bei anderen Organen, eine unverzichtbare Eigenschaft. Im präkardialen Mesoderm zeigen tierische Herzzellen in vitro noch eine ausgeprägte Zellteilungsfähigkeit [112], verlieren diese jedoch mit zunehmenden Alter [113], so dass Zellwachstum der Kardiomyozyten mittels Hyperplasie zunehmend durch Hypertrophie ersetzt wird [75]. Im Herz der Ratte wird

DISKUSSION

dieser Wechsel am dritten bzw. vierten postnatalen Tag diskutiert [114]. Im Rahmen von kardiologischen Erkrankungen findet sich somit in adulten Kardiomyozyten vornehmlich ein hypertropher Anpassungsprozess. In verschiedenen Organen, wie Leber und Muskelzellen, konnte jedoch *in vivo* eine hyperplastische Regenerationsfähigkeit bei Säugetieren nachgewiesen werden [115-117]. Da eine solche Regenerationsfähigkeit in Kardiomyozyten nicht gefunden werden konnte, wurde angenommen, dass Kardiomyozyten terminal differenzierte Zellen sind und ihnen ein Wiedereintritt in den Zellzyklus verwehrt bleibt [75, 79, 118, 119]. Viele folgende Studien zeigten jedoch im Tiermodell eine niedrigfrequente manipulationsfähige Zellzyklusaktivität in Kardiomyozyten [120], so dass den aktivierenden und inhibierenden Faktoren des Zellzyklus ein hohes wissenschaftliches Interesse zu Teil wurde.

Als ein vielversprechender Ansatz gilt dabei die Regulation und Kontrolle des Zellzyklus. CKIs (*CDK-Inhibitors*) haben dabei einen wesentlichen regulatorischen Einfluss (siehe 1.2.). Bei murinen Kardiomyozyten kann mit zunehmenden Alter eine steigende Konzentration von CKIs der INK4- und CIP/KIP- (p21, p27, p57) Familie nachgewiesen werden [121], so dass deren inhibierender Einfluss für eine reduzierten Zellzyklusaktivität im Alter angenommen wird. CKIs inhibieren CDKs (*cyclin dependent kinase*) durch Phosphorylierung und hemmen u.a. die Zellteilung. Im CKI-knockdown-Model zeigt sich eine deutliche Zunahme an Zellteilung bei postnatalen Mäusen [79]. P21-knockout Mäuse zeigen interessanter Weise keine Fehlentwicklung, hingegen zeigen p27-knockout-Mäuse eine Prädisposition zu Hypophysentumoren und allgemeiner Hyperplasie mit 20% erhöhtem Herzgewicht. Da die Abwesenheit von p21 und p27 zu keiner groben Fehlentwicklung führt, liegt der Verdacht von Kompensationsmechanismen nahe. P57 hingegen ist in der embryonalen Phase stark exprimiert und postnatal nicht mehr nachweisbar. P57-knockout Mäuse unterliegen starken Fehlentwicklung und Defekten. In menschlichen Herzzellen unterliegt interessanterweise p21 postnatal einer steigenden Konzentration, p27 steigt bis zur 25 postnatalen Woche und verbleibt dann konstant, p57 hingegen unterliegt einer Konzentrationsabnahme und verbleibt auf niedrigem Level [79]. Es gibt daher Grund zur Annahme, dass die reduzierte und eingeschränkte Zellteilungsfähigkeit von Kardiomyozyten auch in dieser Arbeit durch phosphorylierende Proteine reguliert wird und der Zellzyklusarrest von Kardiomyozyten durch die intrazelluläre Konzentration von inhibierenden Faktoren, wie den CKIs, kontrolliert wird.

DISKUSSION

Ein signifikanter Effekt von Lef-1 auf die Zellproliferation von Kardiomyozyten kann in dieser Untersuchung nicht dargestellt werden. In Untersuchungen bei B-Lymphozyten kann jedoch nachgewiesen werden, dass Lef-1 für Zellproliferation und Überleben notwendig ist und ein Verlust von Lef-1 zu einer vermehrten Apoptose führt [25]. Letzteres kann in der eigenen Arbeit für murine Kardiomyozyten nur im Trend bestätigt werden.

Einen entgegengesetzten Effekt im Sinne einer gesteigerten Apoptose wurde in dieser Arbeit in der dominant-negativen Gruppe von Lef-1 (Lef-DN) erwartet. Chen et al. hatten bereits im transgenen dominant-negativen Lef-1-Mausmodell eine deutlich erhöhte Apoptose und Abnahme der Zellgröße von Kardiomyozyten in vivo nachweisen können [64]. Diese Effekte können jedoch anhand der vorliegenden eigenen Daten nicht bestätigt werden. Die Lef-DN Gruppe zeigt keinen relevanten Unterschied in Bezug auf die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Bewertung dieser Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die gezählten Apoptose-Ereignisse insgesamt sehr selten sind und Apoptoseraten unterhalb des Promillebereichs zwischen 0,02% und 0,05% verglichen werden müssen, was die statistische Aussagekraft stark einschränkt.

In weiteren Untersuchungen mit dominant-negativen Formen von Lef-1 im transgenen Mausmodell kann ein Zellwachstum-hemmender Einfluss festgestellt werden [64]. In der Lef-DN Gruppe der vorliegenden Arbeit zeigen sich übereinstimmend tendenziell reduzierte Zelldurchmesser bei drei und sieben Tage alten Mäusen.

Die Bedeutung von β -catenin bei der Regulierung von Hypertrophie von Kardiomyozyten wurde bereits mehrfach herausgestellt [63, 64]. Zum Einen ist β -catenin ein Regulator von stressinduzierter Hypertrophie bei Kardiomyozyten im transgenen Mausmodell, zum anderen zeigt sich im Rattenmodell mit adenoviral-vermitteltem konstitutiv-aktivem β -catenin eine verringerte Apoptose und ein erhöhtes Zellüberleben bei Kardiomyozyten [63, 64]. Hahn et al. können zeigen, dass es im transgenen Mausmodell unter einer Expression von β -catenin zu einer Erhöhung der in S-Phase befindlichen Kardiomyozyten, Steigerung von Cyclin D1 und zur Zellhypertrophie von Kardiomyozyten kommt. Im klinischen Experiment mittels Myokardinfarkt bei Ratten zeigt sich zudem eine reduzierte Infarktzone unter stabilisiertem β -catenin [110].

DISKUSSION

Interessanterweise zeigten Baurand et al. entgegen der verbreiteten Studienlage, dass eine verringerte Expression von β -catenin im transgenen Mausmodell ebenfalls zu einer milden kardialen Hypertrophie und eine Stabilisierung von β -catenin zu einem verringerten kardialen Zellwachstum führen kann [65].

In dieser Arbeit kann unter der Expression (Lef-CA) bzw. Inhibition (Lef-DN) von Lef-1, entgegen den Erwartungen, keine veränderte β -catenin-Konzentration festgestellt werden.

5.2 Proteinkinase B

Kinasen sind phosphorylierende Enzyme, denen bei der intrazellulären Kommunikation eine besondere Bedeutung zukommt. Die Phosphorylierung von Proteinen ist dabei ein zentraler Mechanismus, mit welchem Aktivität und Funktionalität von Effektoren beeinflusst und Signaltransduktion möglich werden kann. Kinasen selbst können durch Rezeptoren, *second messenger* und andere Kinase aktiviert werden. Die PKB gehört mit verschiedenen Isoformen zu den *akt*-Genen (siehe 1.5.) und ist bekannt für ihre Relevanz bei Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen wie Proliferation, Zellüberleben, Angiogenese und Glukosestoffwechsel [47, 48].

Mäuse, bei denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine konstitutiv-aktive Proteinkinase B exprimiert wird, zeigen nach sieben Tagen eine Zunahme des relativen Herzgewichtes. Dies reiht sich in die Ergebnis anderer Studien ein, welche ebenfalls unter aktivierter PKB ein erhöhtes Herzgewicht nachweisen konnten [91]. Cook et al. haben im transgenen Mausmodell unter erhöhter PKB-Expression neben einem erhöhten Herzgewicht auch einen reduzierten Zelltod und eine erhöhte Induktion von Hypertrophie nachgewiesen [122]. In der vorliegenden Untersuchung kann jedoch der Effekt auf die Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten anhand der Myozytenquerschnittsfläche nicht nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache hierfür sei das Alter der Mäuse erwähnt, welches in dieser Untersuchung drei und sieben Tage, hingegen in der Untersuchung bei Cook et al. sechs Wochen betrug. Es ist also denkbar, dass ein Effekt auf die kardiale Hypertrophie unter einer vermehrten PKB-Expression abhängig vom Entwicklungsstatus der Tiere ist.

PKB ist ein bekanntes Onkogen und gut untersuchter Regulator des Zellzyklus und der Proliferation in Tumorzellen [123, 124]. In vielen Tumorzellen wurde ein erhöhter PKB-

DISKUSSION

Level beobachtet [48, 123], hierzu zählen u.a. Karzinome des Pankreas, Ovars, Rektums und der Brust. Auf der anderen Seite verfügen Kardiomyozyten postnatal nur über eine geringe Zellzyklusaktivität, so dass diese für onkogene Prozesse und Mutationen wenig anfällig sind. Dies wurde zum Anlass genommen, in dieser Arbeit die proliferative Wirkung von aktivierter PKB in Kardiomyozyten zu untersuchen. Der Effekt hinsichtlich der Zellzyklusaktivität fiel jedoch weniger hoch als erwartet aus. Es zeigt sich lediglich ein geringer Anstieg nach drei und sieben Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Hinweise eines direkten Einflusses von PKB auf den Zellzyklus kann bislang in T-Zellen, Thymus- und Brustkrebs-Zellen nachgewiesen werden [91]. Vergleichbare Untersuchungen mit aktivierter PKB in Kardiomyozyten in vivo existieren bislang nicht. Es kann diskutiert werden, ob der geringe Effekt von PKB auf die Proliferation durch die determinierte Arretierung des Kardiomyozyten in der G₀-Phase zu erklären ist. PKB allein hat somit offenbar keinen proliferationssteigernden Effekt auf Kardiomyozyten.

Der PI3K/PKB Signalweg ist für seine hemmende Wirkung auf die Apoptose bekannt. Die Proteinkinase B phosphoryliert hierzu eine Reihe von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bad, Bax und Mdm2 und beeinflusst das Überleben von Zellen [53]. PKB (Akt1) Knockout-Mäuse sind kleiner und weisen höhere Raten von Apoptose im Hoden sowie eine reduzierte Spermatogenese [125] und höhere Raten an spontaner Apoptose in Thymuszellen auf [91].

Vor diesem Hintergrund hätte eine Abnahme der Apoptoserate in der PKB-Gruppe erwartet werden können. Dies kann jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht gezeigt werden. Es zeigt sich zwar eine tendenziell geringere Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe, ohne dass jedoch statistische Signifikanz erreicht wird. Wie bereits angemerkt, stellt die Apoptose bei drei und sieben Tage alten Mäuse ein sehr seltenes Ereignis dar, was den quantitativen Nachweis von Veränderungen erschwert. Auch in menschlichen gesunden Herzen wird die Prävalenz für die Apoptose von Kardiomyozyten mit 1:10.000 angegeben [126].

Cook et al. haben in einem transgenen Mausmodell unter aktivierter PKB neben einer reduzierten Apoptose eine erhöhte Konzentration von *insulinlike growth factor-binding protein-5* (IGFBP-5) nachweisen können und schreiben diesem ebenfalls eine kardioprotektive Wirkung zu [122].

DISKUSSION

Während sich unter gezielter Expression von Lef-CA vor allem ein Anstieg der S-Phase-Aktivität und eine Erhöhung von Cyclin D3 mit einer begleitenden Hypertrophie und reduzierter Apoptose beobachten lässt, finden sich in der PKB Gruppe insbesondere Veränderungen im Bereich der extrazellulären Matrix. In der aktuellen Literatur finden sich nach Kenntnis des Autors derzeit keine Studien zu den Einflüssen von PKB auf die Kollagensynthese von murinen Herzen. Hinweise für einen synthesessteigernden Effekt auf Laminin und Kollagen Typ IV unter der Expression von PKB konnte an Zellmembranen (Ovarzellen des Hamsters) *in vitro* über eine Aktivierung von *fibroblast growth factor* (FGF) nachvollzogen werden [127].

Der Stoffwechsel der Matrix wird überwiegend durch Fibroblasten reguliert. Diese Zellen haben eine homöostatische Eigenschaft und synthetisieren bzw. erhalten die Struktur der extrazellulären Matrix. Anhand der eigenen Daten kann ein synthesessteigernder Effekt auf die Fibroblasten durch PKB angenommen werden. In der PKB-Gruppe zeigt sich bereits nach drei Tagen der Anteil des Gefäßendothels erhöht und nach sieben Tagen sind interstitielles Kollagen, Gefäßendothel und das Gesamtkollagen signifikant erhöht. Mit diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass das erhöhte relative Herzgewicht nach sieben Tagen in der PKB-Gruppe vor allem auf eine vermehrte kardiale Kollagenzunahme zurückzuführen ist.

D-Cycline sind wie oben beschrieben oszillatorisch wirkende Proteine und wirken im Cyclin/CdK-Komplex regulatorisch auf den Zellzyklus ein. Dabei wird ihre Expression u.a. durch Lef-1 reguliert [74]. In dieser Untersuchung kann ein signifikanter Anstieg von Cyclin D3 unter Lef-CA bei drei und sieben Tage Mäusen beobachtet werden, für Cyclin D1 zeigte sich dagegen ein sehr heterogenes Bild. Vergleichbare Studien in murinen Kardiomyozyten finden sich in dieser Hinsicht in der Literatur nicht. Shtutman et al. beschreiben, dass eine Überexpression von β -catenin in Tumorzellen des Kolonkarzinoms durch die Bindung von Lef-1 zur einer deutlich erhöhten Transkription von Cyclin D1 führt [74]. Dieser Effekt konnte ebenfalls für Cyclin D3 nachgewiesen werden. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest die Annahme, dass eine Aktivierung des Lef-1/ β -catenin Komplexes zu einer Erhöhung von D-Cyclinen führt, hier von Cyclin D3.

Unter Lef-CA zeigt sich keine wesentliche Beeinflussung der GSK-3. Hingegen scheint jedoch eine erhöhte PKB-Konzentration eine vermehrte GSK-3 Expression zur Folge zu haben. Dazu muss kritisch angemerkt werden, dass GSK-3 bekannterweise unter

DISKUSSION

dem regulierenden Einfluss der PKB liegt. PKB vermag durch Phosphorylierung die GSK-3 zu hemmen und führt wie unter 1.4. beschrieben zur einer intrazellulären Stabilisierung von Proteinen. Eine erhöhte Konzentration von GSK-3 unter aktivierter PKB wurde somit im Vorfeld der Experimente nicht erwartet. Wie oben erwähnt, zeigt sich in der PKB-Gruppe insbesondere ein Effekt auf die extrazelluläre Matrix. Nach sieben Tagen zeigt sich eine signifikante Zunahme an Gefäßendothel, interstitieller Kollagenfraktion und Gesamtkollagen. Im transgenen Mausmodell konnten Zhai et al. mittels aktivierter GSK-3 eine erhöhte Fibrosierung am Herz [73] und Hirotani et al. unter Verwendung einer dominant-negativen GSK-3 eine verminderte Fibrosierung und Apoptose nachweisen [72]. Insofern kann diese Arbeit als Bestätigung des zuvor beschriebenen GSK-3 vermittelten Effekts auf eine kardiale Fibrosierung verstanden werden.

Verschiedene Untersuchungen haben für GSK-3 einen Zellwachstum hemmenden und Apoptose steigernden Effekt nachgewiesen [73, 128, 129]. Der erhöhte Anteil von GSK-3 unter aktivierter PKB könnte somit möglicherweise im Sinne eines gegenregulierenden Effekts für die ausbleibende Zellzyklusaktivität und Zellhypertrophie in der PKB Gruppe ursächlich sein.

β -catenin ist wie unter 1.6. beschrieben ein Co-Protein von Lef-1 und löst im β -catenin/Lef-1-Komplex Transkriptionsvorgänge aus. PKB übt in vielen Zellarten über den Axin/APC/GSK-3-Komplex Einfluss auf den Wnt-Signalweg aus und inhibiert die Glykogen-Synthase-Kinase (GSK), so dass es zu einer Konzentrationserhöhung (Stabilisierung) von β -Catenin kommt [37, 129]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ebenfalls untersucht, inwiefern sich diese Vorgänge in den Herzmuskelzellen neonataler Mäuse beobachten lassen. Tatsächlich findet sich in den eigenen Ergebnissen kein Effekt von aktivierter PKB auf die β -Catenin-Konzentration. Das überrascht insofern, da die regulierende Wirkung von GSK-3 im Wnt-Signalweg als gut untersucht gilt und PKB hierbei einen hemmenden Einfluss mittels Phosphorylierung ausübt. Weitere transgene in vivo Versuche bei murinen Kardiomyozyten wurden nach Kenntnis des Autors in vergleichbarer Weise nicht durchgeführt. Allerdings können Yuan et al. in vitro einen ähnlichen Effekt beobachten: eine konstitutiv aktive Form von PKB führte trotz einer sicheren Inhibierung der GSK zu keinem zytosolischen Anstieg von β -catenin und eine Lef-1- vermittelte Transkriptionsteigerung in Zellkulturen muriner Embryofibroblasten. Postuliert wird die Annahme, dass unter der isolierten Expression PKB die gemeinsame Interaktion zwischen der GSK und Axin abnimmt und

DISKUSSION

es dadurch zu einer ausbleibenden Stabilisierung von β -Catenin kommt. Die genannten Autoren schlussfolgerten, dass die alleinige Expression von PKB nicht geeignet ist, Lef-1 zu aktivieren, wiesen jedoch auch darauf hin, dass in der Studie eine Co-Expression von Wnt-1 in vitro erfolgte, welches für die gezeigten Effekte mitverantwortlich sein kann [130].

5.3 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1) und Protein-Kinase B (PKB) in perinatalen Kardiomyozyten im Mausmodell in vivo. Mittels virusvermitteltem Gentransfer gelingt die konstitutive Expression von Lef-1 und PKB in Kardiomyozyten, was anschließend die Untersuchung auf Gewicht, Zellzyklusaktivität, Apoptose, Hypertrophie, Kollagenfraktion und ausgewählte Proteine an drei und sieben Tage alten Mäusen ermöglicht.

Die eigenen Daten zeigen, dass die Expression und Aktivierung von Lef-1 zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten führt. Analog zu anderen Studien findet sich zusätzlich ein Anstieg der Expression von Cyclin D3. Dies lässt vermuten, dass Lef-CA die Transkription von Cyclin D3 steigert und somit eine vermehrte Proliferation verursacht. Eine relative Herzgewichtzunahme lässt sich in diesem Sinne als Ausdruck einer vermehrten Zellzyklusaktivität und Proliferation interpretieren.

Konstitutiv exprimierte PKB zeigt in dieser Arbeit einen wesentlichen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix. Es kann gezeigt werden, dass unter konstitutiv aktivierter PKB eine Zunahme an Gefäßendothel, interstitieller Kollagenfraktion und Gesamtkollagen zu verzeichnen ist. Es wird angenommen, dass intrazelluläre Signalkaskaden, in denen PKB eingebunden ist, in perinatalen Mausherzen Einfluss auf die Syntheseeffekte in Fibroblasten haben.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches and B. Deutschland. *Die 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases*. 2014.
2. Siegenthaler, W. and B.R. Amann-Vesti, *Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen*. 9., völlig neu bearb. Aufl. ed. 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XLI, 1178 S.
3. Donner-Banzhoff, N., Held, K., Laufs, U., Trappe, H.J., Werdan, K., Zerkowski, H.R., *Nationale Versorgungsleitlinie: Chronische KHK*, Bundesärztekammer, Editor. 2006. p. 22-25.
4. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
5. Camm, A.J. and European Society of Cardiology, *The ESC textbook of cardiovascular medicine*. 2.ed. ed. 2009, Oxford [u.a.]: Oxford Univ. Press. XXIV, 1398 S.
6. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
7. Sadoshima, J., et al., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 977-84.
8. Anversa, P., et al., *Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy*. *Am J Pathol*, 1985. **118**(3): p. 484-92.
9. Auer, J., R. Berent, and B. Eber, *[Pathophysiologie and therapeutic aspects of left ventricular "remodeling" in the post-infarct phase]*. *Acta Med Austriaca*, 2001. **28**(5): p. 117-22.
10. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(8): p. 589-600.
11. Dorn, G.W., 2nd and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 527-37.
12. Rassow, J., R. Deutzmann, and R.N.u. a, *Duale Reihe Biochemie*. 2. Aufl. ed. 2008, [s.l.]: Georg Thieme Verlag. 867 S.
13. Löffler, G., et al., *Biochemie und Pathobiochemie : mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. 8., völlig neu bearb. Aufl. ed. 2007, Heidelberg: Springer Medizin. XXI, 1263 S.

LITERATURVERZEICHNIS

14. Galderisi, U., F.P. Jori, and A. Giordano, *Cell cycle regulation and neural differentiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(33): p. 5208-19.
15. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 153-66.
16. Hochegger, H., S. Takeda, and T. Hunt, *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(11): p. 910-6.
17. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 3-15.
18. van Empel, V.P. and L.J. De Windt, *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. *Cardiovasc Res*, 2004. **63**(3): p. 487-99.
19. van Empel, V.P., et al., *Myocyte apoptosis in heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2005. **67**(1): p. 21-9.
20. Crompton, M., et al., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death*. *Biochimie*, 2002. **84**(2-3): p. 143-52.
21. Lee, P., et al., *Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(2): p. H456-63.
22. Yamaguchi, S., et al., *Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(10): p. 1500-3, A8.
23. He, X., *A Wnt-Wnt situation*. *Dev Cell*, 2003. **4**(6): p. 791-7.
24. Staal, F.J. and H. Clevers, *Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions*. *Hematol J*, 2000. **1**(1): p. 3-6.
25. Reya, T., et al., *Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism*. *Immunity*, 2000. **13**(1): p. 15-24.
26. Merrill, B.J., et al., *Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin*. *Genes & development*, 2001. **15**(13): p. 1688-705.
27. Roose, J., et al., *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. *Science*, 1999. **285**(5435): p. 1923-6.
28. Hovanes, K., et al., *Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer*. *Nature genetics*, 2001. **28**(1): p. 53-7.
29. Carlsson, P., M.L. Waterman, and K.A. Jones, *The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells*. *Genes & development*, 1993. **7**(12A): p. 2418-30.

LITERATURVERZEICHNIS

30. Giese, K. and R. Grosschedl, *LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites*. EMBO J, 1993. **12**(12): p. 4667-76.
31. Bruhn, L., A. Munneryn, and R. Grosschedl, *ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function*. Genes & development, 1997. **11**(5): p. 640-53.
32. Levanon, D., et al., *Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11590-5.
33. Waterman, M.L., *Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 41-52.
34. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
35. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 59-88.
36. Cavallo, R.A., et al., *Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 604-8.
37. Fukumoto, S., et al., *Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17479-83.
38. Katanaev, V.L., *The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway*. Biochemistry Biokhimiia, 2010. **75**(12): p. 1428-34.
39. Hsu, S.C., J. Galceran, and R. Grosschedl, *Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4807-18.
40. Batlle, E., et al., *Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB*. Cell, 2002. **111**(2): p. 251-63.
41. van de Wetering, M., et al., *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell, 2002. **111**(2): p. 241-50.
42. Arce, L., N.N. Yokoyama, and M.L. Waterman, *Diversity of LEF/TCF action in development and disease*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7492-504.
43. Erdfelder, F., et al., *High lymphoid enhancer-binding factor-1 expression is associated with disease progression and poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Reports 2010: 2:e3, 2010.
44. Travis, A., et al., *LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]*. Genes & development, 1991. **5**(5): p. 880-94.

LITERATURVERZEICHNIS

45. Shanmugam, P., et al., *Angiotensin-II type 1 receptor and NOX2 mediate TCF/LEF and CREB dependent WISP1 induction and cardiomyocyte hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 928-38.
46. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *PKB/AKT: functional insights from genetic models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 760-8.
47. Hanada, M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 3-16.
48. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer*. Cell Cycle, 2009. **8**(16): p. 2502-8.
49. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
50. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
51. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 381-95.
52. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
53. Duronio, V., *The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway*. Biochem J, 2008. **415**(3): p. 333-44.
54. Balendran, A., et al., *PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2*. Current biology : CB, 1999. **9**(8): p. 393-404.
55. Toker, A. and A.C. Newton, *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8271-4.
56. Hill, M.M., et al., *Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25643-6.
57. Delcommenne, M., et al., *Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11211-6.
58. Lynch, D.K., et al., *Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism*. Oncogene, 1999. **18**(56): p. 8024-32.

LITERATURVERZEICHNIS

59. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3028-33.
60. Blankesteyjn, W.M., et al., *Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction*. Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 877-83.
61. Easwaran, V., et al., *beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3145-53.
62. Wright, M., et al., *Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(2): p. 384-8.
63. Haq, S., et al., *Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4610-5.
64. Chen, X., et al., *The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4462-73.
65. Baurand, A., et al., *Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1353-62.
66. Roura, S., et al., *Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation*. Eur J Heart Fail, 2007. **9**(10): p. 995-1002.
67. Masckauchan, T.N., et al., *Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells*. Angiogenesis, 2005. **8**(1): p. 43-51.
68. Kim, K., et al., *Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(10): p. 3509-23.
69. Woulfe, K.C., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates post-myocardial infarction remodeling and stress-induced cardiomyocyte proliferation in vivo*. Circ Res, 2010. **106**(10): p. 1635-45.
70. Kerkela, R., K. Woulfe, and T. Force, *Glycogen synthase kinase-3beta -- actively inhibiting hypertrophy*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(3): p. 91-6.
71. Sugden, P.H., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S137-53.
72. Hirotani, S., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective*. Circ Res, 2007. **101**(11): p. 1164-74.

LITERATURVERZEICHNIS

73. Zhai, P., et al., *Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33181-91.
74. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
75. MacLellan, W.R. and M.D. Schneider, *Genetic dissection of cardiac growth control pathways*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 289-319.
76. Pasumarthi, K.B., et al., *Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 110-8.
77. Tamamori-Adachi, M., et al., *Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(2): p. 181-90.
78. Soonpaa, M.H., et al., *Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2644-54.
79. Di Stefano, V., et al., *Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8644-54.
80. Ebelt, H., et al., *Directed expression of dominant-negative p73 enables proliferation of cardiomyocytes in mice*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(3): p. 411-9.
81. Nagy, A., et al., *In vitro screen to obtain widespread, transgenic expression in the mouse*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(8): p. pdb prot4408.
82. Sanchez-Ramos, J., et al., *The X-gal caution in neural transplantation studies*. Cell Transplant, 2000. **9**(5): p. 657-67.
83. Raven, P.H., R.F. Evert, and S.E. Eichhorn, *Biologie der Pflanzen*. 4. Aufl. ed. 2006, Berlin [u.a.]: de Gruyter. 210 ff.
84. Ebelt, H., et al., *E2F2 expression induces proliferation of terminally differentiated cardiomyocytes in vivo*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(2): p. 219-26.
85. Ebelt, H. and T. Braun, *Optimized, highly efficient transfer of foreign genes into newborn mouse hearts in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(4): p. 1111-6.
86. Hunter, J.J., et al., *Targeting gene expression to specific cardiovascular cell types in transgenic mice*. Hypertension, 1993. **22**(4): p. 608-17.
87. Chalfie, M., *Green fluorescent protein : properties, applications, and protocols*. 2. ed. 2006, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience. XV, 443, [24] S.

LITERATURVERZEICHNIS

88. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
89. He, T.C., et al., *A simplified system for generating recombinant adenoviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2509-14.
90. Ducluzeau, P.H., et al., *Functional consequence of targeting protein kinase B/Akt to GLUT4 vesicles*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2857-66.
91. Yang, Z.Z., et al., *Physiological functions of protein kinase B/Akt*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 2): p. 350-4.
92. Gilligan, D., et al., *Application of a bromodeoxyuridine-Hoechst/ethidium bromide technique for the analysis of radiation-induced cell cycle delays in asynchronous cell populations*. International journal of radiation biology, 1996. **69**(2): p. 251-7.
93. Kanno, M., Y. Takeda, and S. Nakamura, *[Application of bromodeoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the analysis of tumor cell kinetics by flow cytometry]*. Nippon rinsho Japanese journal of clinical medicine, 1992. **50**(10): p. 2333-7.
94. Sekine, J., et al., *Application of bromodeoxyuridine immunohistochemistry to the rat temporomandibular joint*. Okajimas folia anatomica Japonica, 1991. **68**(4): p. 219-23.
95. Labat-Moleur, F., et al., *TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(3): p. 327-34.
96. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
97. Ebelt, H., et al., *Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 236-44.
98. Nadal-Ginard, B., et al., *Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure*. Circ Res, 2003. **92**(2): p. 139-50.
99. Campbell, S.E., B. Korecky, and K. Rakusan, *Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts*. Circ Res, 1991. **68**(4): p. 984-96.
100. Morita, H., et al., *Selective matrix metalloproteinase inhibition attenuates progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with chronic heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2522-7.

LITERATURVERZEICHNIS

101. Liu, Y.H., et al., *Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure.* Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 375-81.
102. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.* Physiol Genomics, 2005. **21**(3): p. 389-95.
103. Achenbach, S., et al., *Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung.* Kardiologe, 2012. **6**: p. 283-301.
104. Van de Werf, F., et al., *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology.* Eur Heart J, 2008. **29**(23): p. 2909-45.
105. Barolo, S., *Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef?* Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7505-11.
106. Skokowa, J. and K. Welte, *LEF-1 is a decisive transcription factor in neutrophil granulopoiesis.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 143-51.
107. Dorfman, D.M., H.A. Greisman, and A. Shahsafaei, *Loss of expression of the WNT/beta-catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas.* Am J Pathol, 2003. **162**(5): p. 1539-44.
108. Belema Bedada, F., et al., *Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9509-19.
109. Sun, Q., et al., *A splice variant of cyclin D2 regulates cardiomyocyte cell cycle through a novel protein aggregation pathway.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1563-73.
110. Hahn, J.Y., et al., *Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts.* J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30979-89.
111. Anversa, P. and J. Kajstura, *Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart.* Circ Res, 1998. **83**(1): p. 1-14.
112. Romyantsev, P., *Reproduction of growth and hyperplasia of cardiac muscle cells.* Vol. 3. 1991, Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1-371.
113. Soonpaa, M.H. and L.J. Field, *Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis.* Circ Res, 1998. **83**(1): p. 15-26.

LITERATURVERZEICHNIS

114. Li, F., et al., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1737-46.
115. Fabrikant, J.I., *The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver*. J Cell Biol, 1968. **36**(3): p. 551-65.
116. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
117. Snow, M.H., *Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study*. Anat Rec, 1977. **188**(2): p. 201-17.
118. Anversa, P., et al., *Insulin-like growth factor-1 and myocyte growth: the danger of a dogma part II. Induced myocardial growth: pathologic hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(3): p. 484-95.
119. Anversa, P., et al., *Insulin-like growth factor-1 and myocyte growth: the danger of a dogma. part I. Postnatal myocardial development: normal growth*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(2): p. 219-25.
120. Soonpaa, M.H., et al., *Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9.
121. Pasumarthi, K.B. and L.J. Field, *Cardiomyocyte cell cycle regulation*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1044-54.
122. Cook, S.A., et al., *Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22528-33.
123. Altomare, D.A. and J.R. Testa, *Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7455-64.
124. Paramio, J.M., et al., *Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7449-59.
125. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes & development, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
126. Sabbah, H.N., V.G. Sharov, and S. Goldstein, *Programmed cell death in the progression of heart failure*. Ann Med, 1998. **30** Suppl 1: p. 33-8.
127. Li, X., et al., *Akt/PKB regulates laminin and collagen IV isotypes of the basement membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14416-21.
128. Hardt, S.E. and J. Sadoshima, *Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1055-63.

LITERATURVERZEICHNIS

129. Bergmann, M.W., et al., *Statins inhibit reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis: role for glycogen synthase kinase 3beta and transcription factor beta-catenin*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(3): p. 681-90.
130. Yuan, H., et al., *Suppression of glycogen synthase kinase activity is not sufficient for leukemia enhancer factor-1 activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30419-23.

7 Thesen

1. Die Injektion von rekombinanten Adenoviren gestattet die gezielte Beeinflussung der Genexpression in perinatalen Mausherzen.
2. Konstitutiv-aktiviertes Lef-1 führt zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten der Maus.
3. Konstitutiv-aktiviertes Lef-1 führt in Kardiomyozyten der Maus zu einer vermehrten Expression von Cyclin D3, nicht jedoch von Cyclin D1.
4. Konstitutiv-aktiviertes Lef-1 führt zur vermehrten Zellzyklusaktivität und einer Zunahme des relativen Herzgewichtes.
5. Konstitutiv dominant-negatives Lef-1 führt zu reduziertem Zelldurchmesser bei Kardiomyozyten der Maus.
6. Die Expression von aktivierter PKB hat in Kardiomyozyten keine wesentliche proliferative Wirkung.
7. PKB induziert in perinatalen Mausherzen die Kollagensynthese von Fibroblasten.
8. Am profibrotischen Effekt der PKB könnte GSK-3 beteiligt sein.

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle genannt. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beraterdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Durch den Antragsteller wurden keine früheren Promotionsversuche unternommen.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Jan Deichmann

Berlin, den 27.08.2019