

# Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Entstehung von Herzhypertrophie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften



von Christoph Küster  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2005

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler, Prof. Dr. Andreas E. Busch

Datum der Disputation: \_\_\_\_\_

„Hypothesen sind Netze; nur der wird fangen, der auswirft.“

*Novalis*

meinen lieben Eltern gewidmet

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	7
1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese	7
1.1.2. Allgemeine und zelluläre Mechanismen	8
1.1.3. Molekulare Mechanismen der Myokardhypertrophie	9
1.1.3.1. Der Calcineurin-NFAT-Signalübertragungsweg	9
1.1.3.2. Der PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signalübertragungsweg	10
1.1.3.3. Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	12
1.1.3.4. „Kleine“ GTP-bindende-Proteine	14
1.1.3.5. Der MAP-Kinasen-Signalübertragungsweg	15
1.1.3.6. Signalübertragung durch PKC	16
1.1.3.7. Der Gp130/STAT-Signalübertragungsweg	17
1.2. Zielsetzung dieser Arbeit	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1. Versuchstiere	19
2.2. Isolierung neonataler Kardiomyozyten	19
2.3. Inkorporationsassay mit <sup>14</sup> C-markiertem Leucin oder Uridin	20
2.4. Transiente Transfektion neonataler Kardiomyozyten	20
2.5. Transiente Transfektion von HEK 293- und HepG2-Zellen	20
2.6. Luciferase-Reporter-Assay	21
2.7. Quantitative Real-Time PCR	21
2.8. Genexpressionsanalyse durch cDNA-Microarrays	22
2.8.1. DNA-Microchiparrays	22
2.8.2. Erst-Strang-cDNA-Synthese	24
2.8.3. Zweit-Strang-Synthese	24
2.8.4. Reinigung der erhaltenen Doppelstrang-DNA	25
2.8.5. <i>In-vitro</i> -Transkription (IVT)	25
2.8.6. Reinigung der IVT-Produkte	26
2.8.7. Fragmentierung der cRNA	26
2.8.8. Qualitätskontrolle der präparierten Nukleinsäuren	26
2.8.9. DNA-Microarray-Hybridisierung und Datenanalyse	27
2.9. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	27
2.10. Isolierung von Total-RNA aus Monolayer-Zellkultur	27
2.11. Aufreinigung der präparierten RNA für die Chiphybridisierung	28
2.12. Proteintrennung durch SDS-Gelelektrophorese/WESTERN-Blot	28
2.13. Immunfluoreszenzfärbung von Monolayer-Zellen	28
2.14. Konfokales Laserscanmikroskop	29
2.15. Liste der verwendeten Oligonukleotide	29

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1. Differentielle Genexpression im Herzgewebe PKBy1-überexprimierender Mäuse	30
3.1.1. Das Modell der PKBy1-überexprimierenden Mäuse	30
3.1.2. Absicherung des Hypertrophiemodells, Relevanz des klonierten Konstruktes	31
3.1.3. Charakterisierung der transgenen Tiere	33
3.1.4. Vergleichende Genexpressionsanalyse im Herzgewebe transgener Mäuse	37
3.1.4.1. Analyse der cDNA-Array-Daten	37
3.1.4.2. Identifikation differentiell exprimierter Transkripte	38
3.1.4.3. Qualitätskontrolle der erhaltenen Hybridisierungsdaten	38
3.1.4.4. Identifikation der regulierten Gene	40
3.1.4.5. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen	46
3.1.4.6. Validierung der Genexpressionsdaten	48
3.1.4.7. Untersuchung der differentiell exprimierten Gene durch eine „ <i>in silico</i> “-Promotoranalyse	50
3.1.5. Etablierung eines Zellmodells zur weiteren Untersuchung der hypertrophieauslösenden Wirkung von PKB	51
3.1.5.1. Reporterassays zur näheren Untersuchung der PKB-Signaltransduktion	52
3.1.5.1.1. BNP-Luciferase-Reportersystem	52
3.1.5.1.2. NFκB-Luciferase-Reportersystem	52
3.1.5.1.3. FKHR-L-Luciferase-Reportersystem	54
3.1.5.2. Abschließende Untersuchungen zum Zellmodell	55
3.2. Differentielle Genexpression in α <sub>1</sub> -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten	58
3.2.1. Das Modell der α <sub>1</sub> -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten	58
3.2.1.1. Etablierung des Zellmodells	59
3.2.2. Vergleichende Genexpressionsanalyse in α <sub>1</sub> -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten	61
3.2.2.1. Qualitätskontrolle der erhaltenen Hybridisierungsdaten	61
3.2.2.2. Identifikation der regulierten Gene	63
3.2.2.3. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen	66
3.2.2.4. Validierung der Genexpressionsdaten	54
3.2.2.5. Untersuchung der differentiell exprimierten Gene durch eine „ <i>in silico</i> “-Promotoranalyse	67
3.2.3. Weitere Untersuchungen zur Signaltransduktion α <sub>1</sub> -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten	68
3.2.3.1. Untersuchung des Calcineurin-NFAT-Signalübertragungsweges	68
3.2.3.2. Untersuchung des PI3K/PKB/GSK-3β-Signalübertragungsweges	69
3.2.3.3. Untersuchung der Signalübertragung durch „kleine“ GTP-bindende Proteine	70
3.2.3.4. Untersuchungen zum MAP-Kinasen-Signalübertragungsweg	71
3.2.3.5. Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C	72
3.2.3.6. Untersuchungen zur Rolle von NFκB	73

<b>4 Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1. Datenerfassung und Datenverarbeitung in der globalen Genexpressionsanalyse	77
4.2. Differentiell exprimierte Transkripte im Modell der PKBy1-überexprimierenden Mäuse	80
4.2.1. Hypertrophiemarker	80
4.2.2. Extrazellulär sezernierte Proteine	81
4.2.3. Rezeptoren	82
4.2.4. Ionenkanäle und Transportproteine	83
4.2.5. Enzyme	84
4.2.6. Weitere differentiell exprimierte Transkripte	84
4.2.7. Promotoranalyse	85
4.3. Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Herzhypertrophie	85
4.4. Differentiell exprimierte Transkripte im Modell der $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten	87
4.4.1. Hypertrophiemarker	87
4.4.2. Extrazellulär sezernierte Proteine	88
4.4.3. Rezeptoren	89
4.4.4. Weitere differentiell exprimierte Transkripte	90
4.4.5. Promotoranalyse	92
4.5. Reporterassays zur pharmakologischen Untersuchung der $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Hypertrophie	92
4.6. Abschließende Betrachtungen	93
4.7. Ausblick	95
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>Anhang</b>	<b>117</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

## **1. Einleitung**

### **1.1. Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz**

#### **1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese**

Herzerkrankungen sind die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen. Ca. 1,5-2% der Gesamtbevölkerung und 6-10% der über 65-jährigen Menschen in den USA leiden an Symptomen der Herzinsuffizienz. Die jährliche Letalität von herzinsuffizienten Patienten beträgt trotz der Weiterentwicklungen in der Therapie ca. 5-10% bei Patienten mit leichter Symptomatik und sogar 30-40% bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz (Packer *et al.*, 1999).

Chronische Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das die Folge einer primären Myokarderkrankung selbst oder die Konsequenz einer Beeinträchtigung der Myokardfunktion durch das Vorliegen einer anderen Erkrankung, wie z.B. eines Bluthochdrucks, ist. Dabei kommt es zu einer Unfähigkeit des Herzens, die geförderte Menge Blut dem erhöhten Bedarf des Organismus anzupassen.

Ein starker Prädiktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die linksventrikuläre Hypertrophie (Levy *et al.*, 1990). Hierbei handelt es sich zunächst um einen Kompensationsmechanismus, der bei beginnender Dilatation des Ventrikels die Wandspannung herabsetzt und die Hämodynamik verbessert. Langfristig ist das Vorliegen der Myokardhypertrophie allerdings mit einer hohen Wahrscheinlichkeit verknüpft, eine linksventrikuläre Dysfunktion mit nachfolgender Herzinsuffizienz zu entwickeln. Ein wichtiger ätiologischer Faktor bei der Entstehung von Myokardhypertrophie ist die Druckbelastung, z.B. bei arterieller Hypertonie oder Aortenklappenstenose, die typischerweise zu einer konzentrischen Hypertrophie führt. Dagegen führt eine Volumenbelastung, z.B. bei Aortenklappen-Insuffizienz, eher zu einer exzentrischen Hypertrophie.

Darüber hinaus können Defekte in Genen, die für den kontraktilel Apparatur kodieren (z.B.  $\beta$ -MHC, kardiales Troponin T, etc.), die familiäre, hypertrophe Kardiomyopathie auslösen (Bonne *et al.*, 1998). Die koronare Herzerkrankung, insbesondere der Herzinfarkt, können durch Ausfall infarzierter Myokardareale eine hypertrophe Reaktion mit anschließender Ventrikeldilatation im Sinne des „ventricular remodeling“ auslösen. Eine zunehmende Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Myokardhypertrophie und der Progression zur manifesten Herzinsuffizienz wird der Aktivierung neurohumoraler Systeme zugeschrieben. Hierzu gehören das sym-

pathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-System sowie das Endothelin-System (Packer *et al.*, 1999). Neuere Befunde deuten auch auf eine Involvierung des Urotensin-Systems hin. Urotensin II soll an Fibroblasten des Herzens zu einer verstärkten Kollageneinlagerung führen (Tzanidis *et al.*, 2003).

### **1.1.2. Allgemeine zelluläre Mechanismen**

Myokardhypertrophie ist keine uniforme Reaktion des Herzgewebes auf mechanische Belastung und neurohumorale Stimuli. Es besteht vielmehr eine ausgeprägte Heterogenität der molekularen Veränderungen durch unterschiedliche Auslöser. Einige gemeinsame Merkmale der Hypertrophieantwort von Kardiomyozyten auf unterschiedliche Stimuli sollen hier kurz dargestellt werden. Herzmuskelzellen gelten als terminal differenzierte Zellen, die ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Es gibt zwar einige punktuelle Hinweise, dass Kardiomyozyten unter bestimmten Umständen wieder in den Zellzyklus eintreten können (Anversa und Kajstura, 1998), die kompensatorische Zunahme der Myokardmasse bei erhöhter Belastung des Ventrikels ist aber unbestritten auf eine Hypertrophie, nicht auf eine Hyperplasie zurückzuführen. Die Vergrößerung der Einzelzelle geht mit einem erhöhten zellulären Protein-, mRNA- und rRNA-Gehalt einher (Sudgen und Clerk, 1998; Yamazaki *et al.*, 1998). Es findet auch eine erhöhte Proteindegradation statt, wobei die Bilanz der Zelle durch erhöhte Proteinsynthese positiv bleibt. Neben der quantitativen Zunahme an RNA- und Proteinmenge kommt es bei der Hypertrophie von Kardiomyozyten auch zu qualitativen Veränderungen in der Genexpression. Etwa eine Stunde nach Applikation eines hypertrophen Stimulus werden „immediate early genes (IEG)“ oder „early growth response genes“, die Transkriptionsfaktoren der Klasse IV, wie z.B. c-Fos, c-Myc, c-Jun und EGR-1 kodieren, vermehrt exprimiert.

Nach 6-20 h beobachtet man eine verstärkte Expression von Genen, die während der Embryonalentwicklung aktiviert werden, wie z.B. die schwere  $\beta$ -Myosin-Kette ( $\beta$ -MHC),  $\alpha$ -Skelettmuskel- und  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin sowie des atrialen natriuretischen Faktors (ANF), der normalerweise nur im Vorhof, nicht aber im Ventrikel des postnatalen Herzens exprimiert wird (Glennon *et al.*, 1995). Nach 12-24 h kommt es zu einer Hochregulation konstitutiv exprimierter kontraktiler Proteine wie der leichten Myosinkette 2 (MLC-2) und  $\alpha$ -kardialem Aktin (Glennon *et al.*, 1995).



### 1.1.3. Molekulare Mechanismen der Myokardhypertrophie

#### 1.1.3.1. Der Calcineurin-NFAT-Signalübertragungsweg

Die Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Ursprünglich wurde ihre physiologische Rolle in T-Zellen aufgeklärt, wo eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels zur Bindung an Calmodulin und zur Aktivierung des Enzyms führt. Calcineurin dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren vom Typ NFAT (Nuclear Factor of Activated T-Cells), was zu deren Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung bestimmter Gene der Immunantwort (z.B. Interleukin-2) führt (Crabtree und Olson, 2002).

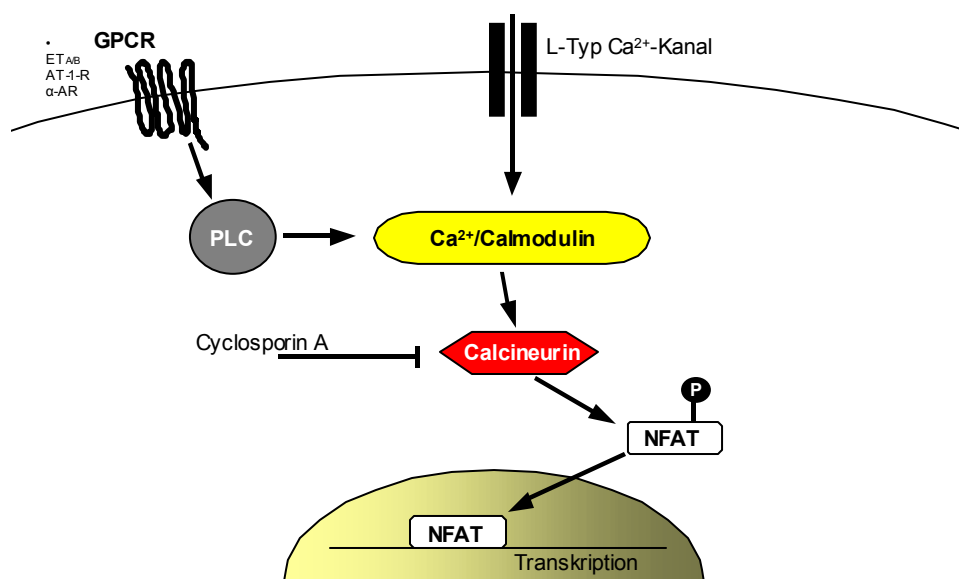


Abb. 1. Die Signaltransduktion durch Calcineurin/NFAT

Der gleiche Signaltransduktionsweg wurde auch für Kardiomyozyten gezeigt. Konstitutive Aktivierung von Calcineurin in den Herzen transgener Mäuse führte zu massiver Myokardhypertrophie und späterer Herzinsuffizienz (Molkentin *et al.*, 1998). Ein ähnliches, allerdings weniger stark ausgeprägtes Ergebnis erhält man durch kardioselektive Überexpression einer konstitutiv-aktiven NFAT-Mutante (Molkentin *et al.*, 1998), was dafür spricht, dass diese Transkriptionsfaktoren auch in Kardiomyozyten eine wichtige Rolle bei der Calcineurin-Signalübertragung spielen. Ob Calcineurin dabei die alleinige Verantwortung trägt, bleibt jedoch nach wie vor unklar. Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A ist in der Lage, in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Phenylephrin- oder Angiotensin-II-induzierte Hypertrophieantwort abzuschwächen (Olson und Williams, 2000). *In vivo* jedoch bleiben die Daten sehr widersprüchlich. Es gelang, diesen Effekt in einigen Kleintiermodellen zu zeigen;

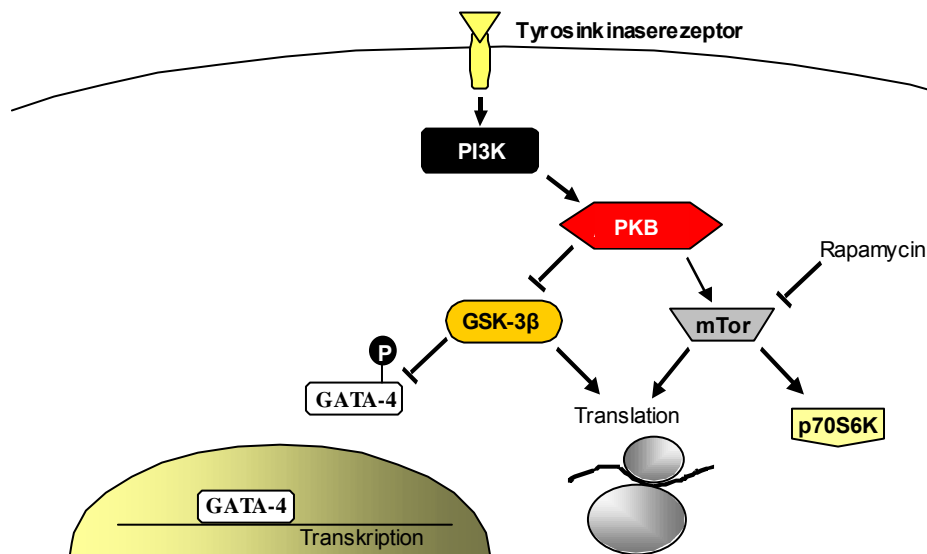
andererseits existieren aber auch sehr gut kontrollierte Studien, die zum gegenteiligen Schluss gelangen. Die möglichen Gründe hierfür sind vielfältig. Calcineurin wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Die Inhibition dieses Proteins durch Cyclosporin A kann also auch durch systemische Wirkungen (wie z.B. durch Nephrotoxizität ausgelöster Anstieg des Blutdrucks) die Entwicklung einer Myokardhypertrophie beeinflussen. Dazu kommt, dass die am Herzen zur Inhibition von Calcineurin notwendigen Dosen 10-fach über den für die Immunsuppression verwendeten liegen und zu stark toxischen Wirkungen am Versuchstier führen (Mahalati *et al.*, 2000).

Für eine zentrale Rolle bei der Hypertrophie-Entwicklung scheinen die Ergebnisse der Untersuchung einer Calcineurin A defizitären Maus zu sprechen. Die Herzen dieser ansonsten unauffälligen Tiere waren im Schnitt 12% kleiner als die ihrer Artgenossen. Darüber hinaus erwiesen sich die Tiere als überraschend unempfindlich gegenüber Hypertrophieauslösern wie erhöhtem Blutdruck, Isoprenalin oder Angiotensin II (Bueno *et al.*, 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Calcineurin sicherlich eine Rolle bei der Hypertrophieentwicklung spielt. Über das genaue Ausmaß werden zukünftige Arbeiten Aufschluss geben müssen, zumal sich gezeigt hat, dass dieser Signaltransduktionsweg eng mit weiteren wichtigen prohypertrophen Signalübertragungen (GSK-3 $\beta$ , MAPK) vernetzt ist.

#### **1.1.3.2. Der PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signalübertragungsweg**

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K's) sind eine Enzymfamilie, die sowohl Protein- als auch Lipidkinaseaktivitäten zeigen und eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen, insbesondere bei Zellwachstum und -differenzierung spielen. PI3K wird durch verschiedene Tyrosinkinase, wie den IGF-1 Rezeptor, aber auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's) wie  $\alpha$ - oder  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren aktiviert (Xiao, 2001). In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass PI3K essentiell für die Entwicklung der korrekten Organgröße ist. Diese Erkenntnisse konnten kürzlich auf ein Säugetiermodell übertragen werden, indem man eine konstitutiv aktive Mutante der Kinase kardioselektiv in transgenen Mäusen exprimierte, die nach der Geburt schnell eine Herzhypertrophie entwickelten (Shioi *et al.*, 2000). Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Enzyms führte hier zu einem Phänotyp mit signifikant kleineren Herzen und ebenso kleineren Kardiomyozyten. Die Tatsache, dass die Tiere sonst völlig gesund waren und keinerlei

Einschränkungen in Herz-/Kreislauffunktionen zeigten, spricht sehr dafür, dass PI3K an der Regulation der Zellgröße und der Ausbildung einer Hypertrophie beteiligt ist.



**Abb. 2. Die PI3K/PKB/GSK-3β-vermittelte Signalübertragung**

PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in der Zellmembran an der 3'-Stelle des Inositolrestes. Das entstehende Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat wird von der Pleckstrin-Homology-(PH)-Domäne der Serin-/Threonin-Kinase PKB gebunden. Dadurch wandert diese Kinase zur Membran, wo sie durch „Phosphatidylinositolabhängige Kinase 1“ (PDK-1) phosphoryliert und teilweise aktiviert wird. Eine weitere, noch unbekannte Kinase phosphoryliert PKB an zweiter Stelle und führt zur vollständigen Aktivierung. Wie bei PI3K konnte für PKB in *Drosophila melanogaster* ein Einfluss auf Zell- und Organgröße gezeigt werden. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante in transgenen Mäusen zeigte vergrößerte Organe; die kardiospezifische Überexpression führte zu Herzhypertrophie mit Kontraktilitätszunahme (Shioi *et al.*, 2002, Matsui *et al.*, 2002). PKB nachgeschaltet sind zwei Proteine, die als Mediatoren dieser Hypertrophie in Frage kommen. Einer dieser Mediatoren ist „mammalian target of rapamycin“ (mTor). Rapamycin, ein Immunsuppressivum, inhibiert die stimulierende Wirkung von mTOR auf die Proteintranslation, was zu verminderter Proteinsynthese und signifikant kleineren Zellen führt (Fingar *et al.*, 2002). Rapamycin blockiert interessanterweise ebenfalls die Hypertrophieantwort auf oxidativen Stress (Tu *et al.*, 2002), Phenylephrin (Boluyt *et al.*, 1997) und Angiotensin II (Sadoshima *et al.*, 1995).

PKB phosphoryliert weiterhin die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), eine weithin exprimierte Kinase, die GATA-4-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und sie damit inaktiviert. Allerdings scheint die Phosphorylierung und dadurch bewirkte Inaktivierung der Kinase durch PKB nicht ausschließlich für Hypertrophieeffekte verantwortlich zu sein, da die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante den Phosphorylierungszustand von GSK-3 $\beta$  nicht verändert (Shioi *et al.*, 2002, Matsui *et al.*, 2002), was die Existenz weiterer Regulationsmechanismen nahe legt. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass über GSK-3 $\beta$  auch so genannte Translation-Initiationsfaktoren beeinflusst werden und darüber direkt die Proteinsynthese gesteuert wird (Hardt *et al.*, 2004). Sowohl der  $\beta$ -Agonist Isoprenalin als auch Endothelin I und Phenylephrin (Morisco *et al.*, 2000, Haq *et al.*, 2000) sind in der Lage, GSK-3 $\beta$  über PI3K zu phosphorylieren, was auf eine mögliche wichtige Rolle in der Hypertrophieentwicklung hindeutet. Weitere Hinweise lieferte auch die kardioselektive Überexpression einer gegen Phosphorylierung unempfindlichen GSK-Mutante in Mäusen, die sich daraufhin bemerkenswert resistent gegen verschiedene hypertrophe Stimuli zeigten (Haq *et al.*, 2000). Weiterhin unklar ist allerdings, ob neben NFAT noch weitere Mediatoren unterhalb von GSK-3 $\beta$  bei der Hypertrophieentwicklung eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass z.B. c-Jun (Boyle *et al.*, 1991), c-Myc (Sears *et al.*, 2000), STAT (Ginger *et al.*, 2000) und NF $\kappa$ B (Hoefflich *et al.*, 2000), Transkriptionsfaktoren, die alle bei der Hypertrophieentwicklung eine Rolle spielen, von GSK-3 $\beta$  phosphoryliert werden können. Ein weiteres, in diesem Zusammenhang sehr interessantes Phänomen ist die Tatsache, dass transgene Mäuse, die sowohl Calcineurin als auch GSK-3 $\beta$  überexprimieren, keine Hypertrophie entwickeln, die Expression der Markergene ANF und BNP aber im Vergleich zu den nur Calcineurin exprimierenden Tieren deutlich erhöht ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hypertrophieentwicklung zumindest teilweise von der Aktivierung des fötalen Genprogrammes getrennt werden kann. Zusammenfassend kann dem PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signaltransduktionsweg sicherlich eine wichtige Rolle bei der Hypertrophieentwicklung zugeordnet werden. Allerdings sollte dabei berücksichtigt werden, dass es zwischen diesem und anderen hypertrophierelevanten Wegen viele Interaktionen gibt, die zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr unzureichend aufgeklärt sind.

### 1.1.3.3. Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation und Anpassung wichtiger Herzfunktionen. Die wichtigsten kardialen GPCR's lassen sich in zwei Untergruppen, die adrenergen und die muscarinergen Rezeptoren unterteilen. Diese transmembrangängigen Rezeptoren sind an drei Klassen von GTP-bindenden Proteinen ( $G_s$ ,  $G_q/G_{11}$ ,  $G_i$ ) gebunden, welche die vom Rezeptor vermittelten Signale an Effektoren wie Enzyme und Ionenkanäle weiterleiten.

Angiotensin II-, Endothelin I- und adrenerge Rezeptoren sind an  $G_q/G_{11}$  gekoppelt. Stimulation durch Agonisten aktiviert die Phospholipase C und kann zur Hypertrophieentwicklung führen (Nicol *et al.*, 2000). Transgene Überexpression sowohl der Rezeptoren (Koch *et al.*, 2000, Paradis *et al.*, 2000) als auch des daran gekoppelten G-Proteins resultieren in Herzhypertrophie und Kardiomyopathie mit verminderter Kontraktionsfähigkeit (D'Angelo *et al.*, 1997; Sakata *et al.*, 1998). Umgekehrt führt das Ausschalten der Gene für  $G_q/G_{11}$  zu transgenen Tieren, die bereits als Embryo an Störungen des Herzwachstums versterben (Offermanns *et al.*, 1998). Ein weiterer indirekter Hinweis auf die Rolle von  $G_q$  in der Hypertrophieentwicklung stammt aus klinischen Studien mit Kardiomyopathie-Patienten, bei denen ACE-Hemmer und  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten (HOPE-Studie) eine signifikante Wirkung gegen die mit der Hypertrophieentwicklung verknüpften strukturellen Veränderungen zeigten, die sich mit der blutdrucksenkenden Wirkung alleine nicht erklären lässt.

Der am weitesten im Herzgewebe verbreitete Rezeptor ist der an  $G_s$ -gekoppelte  $\beta_1$ -Rezeptor, der über Adenylatzyklase-(AC)-Aktivierung positiv chronotrope, positiv inotrope und positiv lusitrope Effekte vermittelt. Der weniger hoch exprimierte  $\beta_2$ -Rezeptor kann sowohl an  $G_s$  als auch an  $G_i$  koppeln, was für vielfältige Möglichkeiten in der Signalübertragung sorgt (Daaka *et al.*, 1997). Überexpression des  $\beta_1$ -Rezeptors in den Herzen transgener Mäusen führt zunächst zu einer verstärkten Kontraktilität, die aber langsam in eine Herzhypertrophie mit massiver Fibrose übergeht (Engelhardt *et al.*, 2002, Bisognano *et al.*, 2000). Überexpression von  $G_s$  (Gaudin *et al.*, 1995), wie auch von Proteinkinase A (PKA), dem Schlüsselregulator nach AC, führt zu ähnlichen Ergebnissen (Antos *et al.*, 2001), was den Schluss nahe legt, dass die schädlichen Effekte chronisch erhöhter  $\beta$ -Stimulation durch PKA vermittelt sind. Auch für die Rolle der  $\beta$ -Rezeptoren in der Hypertrophieentwicklung

existieren klinische Daten. Die Therapie von herzinsuffizienten Patienten mit  $\beta$ -Blockern führt nicht nur zu signifikant erhöhten Überlebensraten (Teerlink und Massie, 1991), sondern zeigt auch auf molekularer Ebene positive Veränderungen wie die Unterdrückung von Genen, die für Hypertrophie verantwortlich gemacht werden, als auch die Induktion vorher unterdrückter Gene wie SERCA2a und  $\alpha$ -MHC (Lowe *et al.*, 1999).

Sowohl muscarinische als auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren sind  $G_i$ -gekoppelt, inhibieren die Adenylatzyklase und haben damit gegenteilige Wirkung zur  $G_s$ -Signaltransduktion. Von Bedeutung erscheint, dass bei herzinsuffizienten Patienten die Expression von  $G_i$  erhöht und die basale Aktivität der AC vermindert ist (Eschenhagen *et al.*, 1992). Auch die kardiale Überexpression eines  $G_i$ -gekoppelten Rezeptors im Tiermodell führte zu einer letalen Kardiomyopathie, was ebenfalls auf die mögliche Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges für die Entwicklung einer Hypertrophie hinweist (Redfern *et al.*, 2000).

#### 1.1.3.4. „Kleine“ GTP-bindende Proteine

GTP-bindende Proteine bilden die Brücke zwischen membranständigen Rezeptoren und vielen verschiedenen Signalübertragungswegen in der Zelle. In dieser Proteinfamilie finden sich einige Mitglieder, die für sehr unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Wachstum, Teilung und Organisation des Zytoskeletts unerlässlich sind und alle ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen (21 kD). Das erste „kleine“ G-Protein, das mit Hypertrophieentwicklung in Zusammenhang gebracht wurde, Ras, führte bei kardioselektiver Überexpression in transgenen Mäusen zu einem starken Anstieg des Herzgewichtes (Hunter *et al.*, 1995), während die Expression einer dominant-negativen Mutante zum Ausbleiben der hypertrophen Antwort nach Phenylephrin-Stimulation führte (Thorburn, 1994). Die Ras nachgeschaltete Signaltransduktion ist sehr vielfältig und läuft z.B. über Raf, PI3K, Ral-GDS/Rac und den MAPK-Weg, Effektoren, die alle auf die ein oder andere Weise in die Hypertrophieentwicklung eingebunden sind. Die Aktivierung von Ras, so konnte kürzlich gezeigt werden, führt zum Anstieg der Transkriptionsaktivität von NFAT3. Im Gegensatz dazu führt die Expression einer dominant-negativen Mutante dazu, dass eine NFAT-Aktivierung durch Phenylephrin verhindert wird (Ichida *et al.*, 2001).

Die Rho-Familie der „kleinen“ G-Proteine, bestehend aus Rho, Rac und Cdc42-Unterfamilien, reguliert die Organisation des Zytoskeletts in Kardiomyozyten

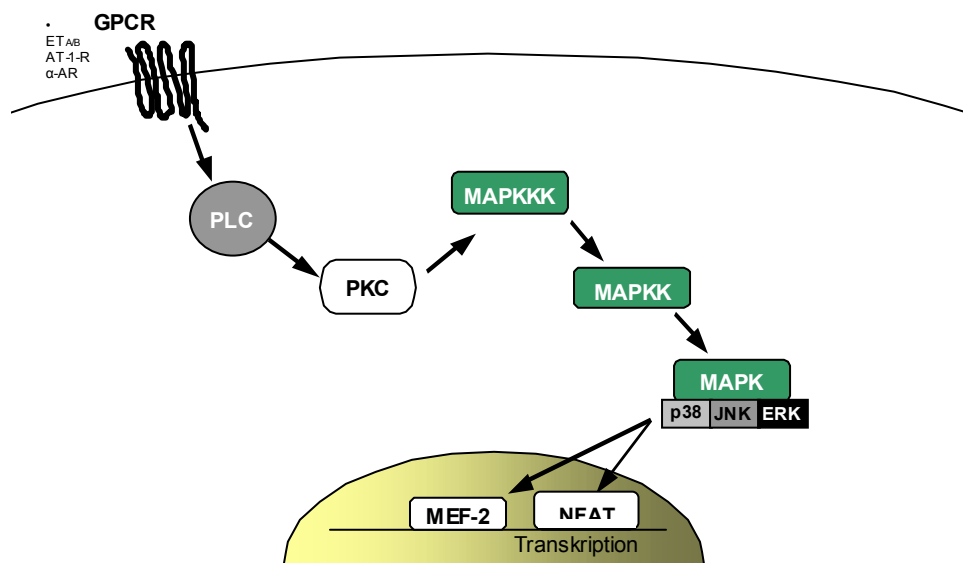
(Hoshijima 1998). Zusätzlich werden in die Hypertrophieentwicklung involvierte Signaltransduktionswege durch Rho beeinflusst. So aktiviert RhoA neben einer ganzen Reihe weiterer Kinasen auch die Rho-Kinase (ROCK), welche wiederum die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert. MLCK, welche auch von Calcium/Calmodulin aktiviert wird, steht im Verdacht, am Remodeling bei der Hypertrophiebildung beteiligt zu sein. So sind Rock-Inhibitoren genau wie dominant-negative Mutanten in der Lage, die durch Phenylephrin-Stimulation ausgelöste Hypertrophieantwort zu unterbinden (Hines *et al.*, 1998). Eine Überexpression in transgenen Mäuseherzen führte allerdings nicht zu der erwarteten Hypertrophie, sondern zu Brachykardie, einem dilatierten Phänotyp und später zu Insuffizienz (Sah *et al.*, 1999). Auch kardioselektiv überexprimierte konstitutiv-aktive Rac-Mutanten führen zu einer massiven Hypertrophie, wogegen eine in Mäusen exprimierte dominant-negative Mutante dazu führt, dass die nach Phenylephrin-Stimulation erwartete Hypertrophieantwort ausbleibt (Sussmann *et al.*, 2000).

#### **1.1.3.5. Der MAP-Kinasen-Signalübertragungsweg**

Auch der Signalübertragungsweg durch MAP-Kinasen stellt über die Phosphorylierung und Regulation vielfältiger Transkriptionsfaktoren eine wichtige Verbindung zwischen externen Stimuli und dem Zellkern dar. Die MAP-Kinasen (MAPK) können in drei Unterfamilien eingeteilt werden, die „extracellularly responsive kinases“ (ERKs), „c-Jun N-terminal kinases“ (JNKs) und p38 MAPK. Die MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1), die alle drei Signalübertragungswege gleichermaßen hemmt, kann interessanterweise sowohl Agonisten-induzierte als auch durch Stress oder hohen Blutdruck induzierte Hypertrophie positiv beeinflussen (Bueno *et al.*, 2001). Die Rolle von ERK1/2 in der Hypertrophieentwicklung ist etwas umstritten. Während einige Ergebnisse darauf hindeuten, dass pharmakologische Inhibition von MAPKK-1 oder das Ausschalten durch Antisense-Oligonukleotide von ERK1/2 die Agonist-induzierte Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten positiv beeinflussen können (Glennon *et al.*, 1996), kamen andere Gruppen zu gegenteiligen Ergebnissen (Post *et al.*, 1996). Allerdings gibt es inzwischen *in-vivo*-Daten, die für eine Rolle von ERK1/2 in der Hypertrophieentwicklung sprechen. Die transgene Überexpression von MAPKK-1, einer MAP-Kinase, die ERK1/2, nicht aber p38 oder JNK aktiviert, führte zur Ausbildung einer nennenswerten Hypertrophie (Bueno *et al.*, 2000), die mit stark

erhöhter systolischer Funktion und Aktivierung des fötalen Genprogrammes einhergehend.

Die MAP-Kinasen der JNK-Unterfamilie werden letztlich durch Phosphorylierung durch MAPKKK-1 aktiviert. Durch Stimulation mit verschiedenen hypertrophieauslösenden Pharmaka konnte hier eine schnelle Phosphorylierung von JNK gezeigt werden. Allerdings hat das Ausschalten von MAPKKK-1 in Tieren in verschiedenen transgenen Tiermodellen nicht den erhofften antihypertrophen Effekt erbracht (Sadoshima *et al.*, 2002).



**Abb. 3. Signalübertragung durch MAP-Kinasen**

Mit den p38-MAP-Kinasen wird die Induktion von ANF *in vitro* in Verbindung gebracht (Wang *et al.*, 1998). TAK1, eine in der Signalübertragung oberhalb von p38 sitzende Kinase, zeigte bei transgener Überexpression einer konstitutiv-aktiven Mutante neben Aktivierung von p38 signifikante Hypertrophie und spätere Herzinsuffizienz (Zhang *et al.*, 2000). Weiterhin phosphoryliert p38 Transkriptionsfaktoren wie MEF2 und NFAT3, die in die Hypertrophieentwicklung involviert scheinen (Zhao *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 2002), was diese Unterfamilie zu ebenfalls interessanten Forschungszielen in Zusammenhang mit Herzhypertrophie macht.

### 1.1.3.6. Signalübertragung durch PKC

Die Proteinkinase C (PKC) ist ubiquitär exprimiert und wird vorwiegend durch  $G_q/G_{11}$ -gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Sehr viele Studien deuten auf eine Rolle von PKC in der Entwicklung von Herzhypertrophie hin. Phorbolster wie PMA aktivieren die PKC



und simulieren die Aktivierung durch Phenylephrin in kultivierten Kardiomyozyten (Henrich *et al.*, 1988). Transgene Überexpression von PKC- $\beta$  in Mäuseherzen führt zu Herzhypertrophie und plötzlichem Herztod (Bowman *et al.*, 1997). Allerdings entwickeln PKC- $\beta$  defizitäre Tiere nach Phenylephrin-Infusion oder bei hohem Blutdruck weiterhin eine Hypertrophie (Roman *et al.*, 2001). Lediglich für PKC- $\alpha$  konnte kürzlich eine zweifelsfreie Rolle in der Hypertrophieentwicklung gezeigt werden (Braz *et al.*, 2002). Die mögliche Rolle verschiedener PKC-Isoformen lässt die Datenlage auch hier nach wie vor unklar erscheinen.

### **1.1.3.7. Der Gp130/STAT-Signalübertragungsweg**

Gp130 ist ein promiskuitiver Rezeptor für verschiedene Zytokine (u. a. IL-6, CT-1, LIF). Die Induktion dieser Signalkaskade führt zur gleichzeitigen Aktivierung von MAPK- und JAK/STAT-Signaltransduktion (Hoshijima *et al.*, 2002). Besonders STAT-3 wird in den Kern transloziert und führt dort zur Induktion verschiedener mit Hypertrophie in Verbindung gebrachter Gene (Yamauchi-Takahara *et al.*, 2000). Transgene Überexpression von STAT3 in Mäuseherzen löste eine Hypertrophie aus (Kunisada *et al.*, 2000). Die Expression einer dominant-negativen Mutante für Gp130 schwächte die Hypertrophieantwort nach Aortenligatur signifikant ab (Uozumi *et al.*, 2001). Eine Deletion von Gp130 zeigte zunächst keinen auffälligen Phänotyp nach Blutdruckerhöhung durch Aortenligatur entwickelten diese Tiere allerdings schnell eine dilatierte Kardiomyopathie, die mit massiver Kardiomyozyten-Apoptose einherging (Hirota *et al.*, 1999), was den Schluss nahe legt, dass diese Signalkaskade für die Adaption des Herzens an Stresssituationen besonders wichtig ist.

## **1.2. Zielsetzung dieser Arbeit**

Aufgrund ihrer Bedeutung als Vorstufe zur Herzinsuffizienz ist die Herzhypertrophie seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die vielfältigen Anstrengungen, die unternommen wurden, um die Entstehung der Herzhypertrophie mechanistisch zu verstehen, waren insofern von Erfolg gekrönt, als sehr viele verschiedene Signaltransduktionswege identifiziert wurden, über die sich in experimentellen Modellen Hypertrophie auslösen lässt. Leider ist die Datenlage hier nach wie vor sehr unübersichtlich, da es nicht gelungen ist, einen Schlüsselmechanismus zu finden, der für die Auslösung oder die Fortentwicklung dieser pathologischen Geschehnisse verantwortlich sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe zweier verschiedener Hypertrophie Modelle gemeinsame Mechanismen identifiziert werden, die für die Hypertrophieentwicklung verantwortlich sind. Dazu sollten Unterschiede in der Genexpression untersucht und mögliche neue Marker identifiziert werden. Aus dem Vergleich der Genexpressionsmuster von gesunden und hypertrophen Kardiomyozyten, bzw. dem Herzgewebe transgener, hypertropher und gesunder Tiere sollten Rückschlüsse auf die Rolle verschiedener Signaltransduktionswege gezogen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Zur Gewinnung der neonatalen Kardiomyozyten wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten, die maximal 24 h alt waren, verwendet. Die Tiere wurden vom Zuchtbetrieb Harlan-Winkelmann (Paderborn) bezogen.

### **2.2 Isolierung neonataler Kardiomyozyten**

Zur Isolation der neonatalen Kardiomyozyten wurde ein Kitsystem der Firma Worthington (NEONATALCIS, Worthington Biochemical Corporation, LK003303) verwendet. Maximal 15 Ratten pro Ansatz wurden in einem Becherglas mit Isofluran (Baxter, HDG9623) betäubt und dekapitiert. Durch einen parasternalen Schnitt wurde das Herz freigelegt und nach Entnahme sofort in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit eiskaltem HBSS-Puffer überführt. Anschließend wurden die Herzen im Puffergefäß zur Reinigung geschwenkt, der größte Teil der Flüssigkeit wurde entfernt und die Organe wurden auf eine eiskalte Petrischale überführt. Die Herzen wurden mit einem Skalpell in Stücke (<1 mm) zerschnitten und in Trypsinlösung (1 ml mitgeliefertes Trypsin, 9 ml HBSS-Puffer) für 16-20 h bei 4°C abgedeckt inkubiert. Die Trypsin-Endkonzentration betrug 50mg/ml. Anschließend wurde die Gewebesuspension erneut in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem mitgelieferten Trypsin-Inhibitor versetzt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach erfolgter Zugabe der Kollagenase-Lösung wurde die Suspension vorsichtig für 40-60 Minuten bei 37°C geschüttelt und dann mit einer sterilen 10 ml Pipette 10 mal auf- und abpipettiert, um Zellreste vom Gewebe zu lösen. Die Zellsuspension wurde durch ein steriles Zellsieb in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 5 ml Leibovitz' L15 Medium (10% Pferdeserum, PAA Laboratories GmbH, B15-021, 1% Penicillin/Streptomycin, SIGMA, P0781) nachgewaschen. Weitere 20 Minuten Inkubation bei RT sorgten für die Degradation eventueller Kollagenreste. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 100g zentrifugiert, in Leibovitz' L15 Medium aufgenommen, gezählt und in einer Dichte von 500.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Kollagenbeschichteten Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und das Medium erneuert.

### **2.3. Inkorporationsassay mit $^{14}\text{C}$ -markiertem Leucin oder Uridin**

Zunächst wurden isolierte neonatale Kardiomyozyten in einer Dichte von 50.000 Zellen pro Kavität in Cytostar-T–Scintillatorplatten (Fa. Amersham, RPNQ0162) ausgesät. Nach 24 h wurde mit DBPS gewaschen, und die Zellen wurden für 12 h in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurde das Medium erneut gewechselt. Zu serumfreiem Medium wurde 5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Leucin oder  $^{14}\text{C}$ -Uridin (Amersham UK, CFB67, CFB51) gegeben und dieses Medium für die nächsten 48 h als Kulturmedium verwendet. Zur Behandlung der Kardiomyozyten mit hypertrophierenden Stimuli wurden diese in der benötigten Konzentration ins Medium gegeben, gemischt und auf jeweils 6 Kavitäten verteilt. Die Scintillatorplatten wurden nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen, um evtl. Toxizitäten auszuschließen, im MICROBETA-1450-Flüssigscintillationszähler (Perkin-Elmer) vermessen.

### **2.4. Transiente Transfektion neonataler Kardiomyozyten**

Zur Transfektion der Kardiomyozyten wurde der Nucleofector<sup>®</sup> der Firma AMAXA (AAD1001) in Kombination mit dem entsprechenden Kitsystem (VPE1002) zur Elektroporation von neonatalen Rattenkardiomyozyten verwendet. Die Isolierung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Für jede Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet, die zuvor 10 Minuten bei 16 g abzentrifugiert wurden. Die Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  des mitgelieferten Elektroporationspuffers aufgenommen, mit der gewünschten DNA-Menge versetzt, vorsichtig resuspendiert und anschließend in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung des Programms G-09 des Nucleofectors<sup>®</sup>. Im Anschluss daran wurden die Zellen sofort mit einer Plastik-Einmalpipette in eine Kavität einer Kollagen-beschichteten 24-Kavitäten-Platte überführt, in dem sich 1 ml vorgewärmtes Kulturmedium befand.

### **2.5. Transiente Transfektion von HEK 293- und HepG-2 Zellen**

Für die Transfektion wurde das liposomale Transfektionssystem LIPOFECTAMIN 2000 (GIBCO BRL, 11668-027) in Kombination mit dem Transfektionsmedium OPTIMEM (GIBCO BRL, 11985-047) verwendet. Für HEK293-Zellen wurde ein DNA/Lipofectamin-Verhältnis von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gewählt, für HepG2-Zellen ein Verhältnis von 1  $\mu\text{g}/2,5 \mu\text{l}$  gewählt. Es wurden pro Kavität einer 24-Kavitäten-Platte  $6 \times 10^5$  Zellen ausgesät und nach 18-24 h transfiziert. Auch bei Kotransfektionen wurde das Verhältnis eingehalten und ggf. Die Kavität mit pcDNA3-Leervektor (Invitrogen V790-

20) auf 1 µg aufgefüllt. Pro Kavität einer 24-Kavitäten-Platte wurden DNA und LIPOFECTAMIN zunächst in jeweils 50 µl OPTIMEM gegeben. Nach 15 Minuten wurden beide Ansätze vorsichtig gemischt und erneut 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die 100 µl Transfektionsansatz direkt auf die im well in 500 µl Normalmedium wachsenden Zellen gegeben, 4 h inkubiert und das Medium zu serumfreiem Kulturmedium gewechselt.

## 2.6. Luciferase-Reporter-Assay

Zur Auswertung von Luciferase-Reporter-Assays wurde das BRIGHT-GLO-Luciferase-System verwendet (PROMEGA. E26509). Pro Kavität einer 24-Kavitäten-Platte wurden 100 µl GLO LYSIS BUFFER (PROMEGA. E266A) mit 100 µl des Substrates gemischt und direkt auf die vorher mit DBPS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 30 sek. wurde die Platte in einem LUMISTAR-Mikrotiterplattenleser (BMG) bei höchster Empfindlichkeit gemessen

**Tab. 1. Verwendete Reporterkonstrukte**

Reporter	Vektor	eingesetzte Menge pro well einer 24-Kavitäten-Platte	Quelle
NFκB	pNF-κB-Luc Vector	100 ng	BD Biosciences # 6053-1
BNP	1818hBNPLuc	700 ng	LaPointe <i>et al.</i> , (1996)
FKHR-L1	pT-Rex-DEST	100 ng	Aventis Functional Genomics, Frankreich
hp 365	pGL3-FKHR-DBE	500 ng	Aventis Functional Genomics, Frankreich

## 2.7. Quantitative Real-Time-PCR

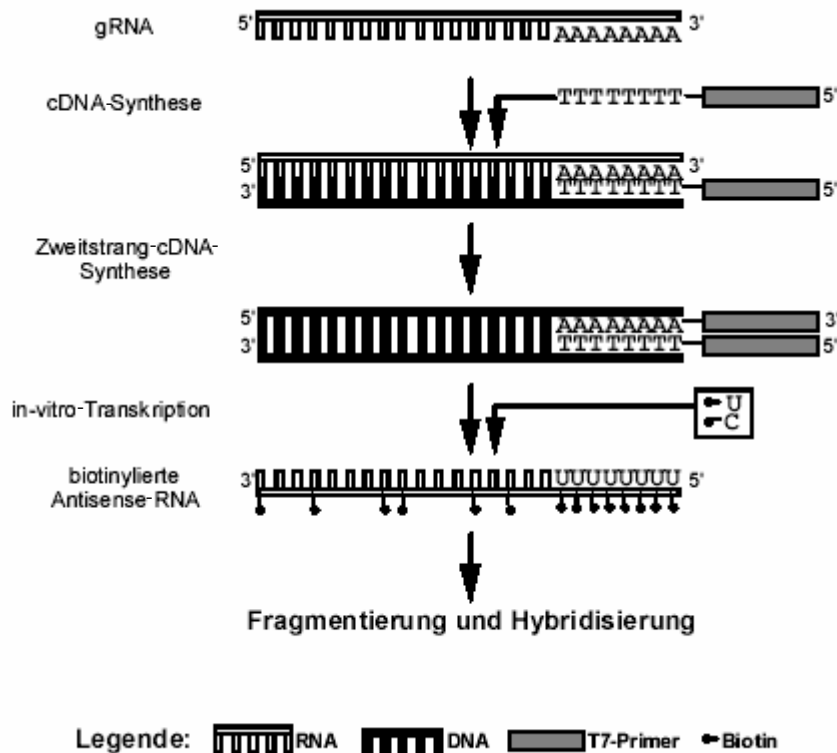
Zunächst wurden 2 µg RNA mit Hilfe des SuperScript™ Erst-Strang-Synthese-Kits (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde Protokoll 3.3.1. des Herstellers verwendet.  $\frac{1}{5}$  dieses Ansatzes wurde für jeweils eine Dreifachbestimmung im 25-µl-Maßstab eingesetzt. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz mit Platinum Taq Polymerase™ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers, SybrGreen (Molecular Probes Verdünnung 1:10.000), Fluorescein (BioRad, 2 nM), RT-Primer (200 nM) und cDNA eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt und optimiert, dass ein einziges Heizprotokoll im Thermocycler (10 min 94°C, 40 Zyklen von 94°C 30 sec., 55°C 30 sec., 72°C 60 sec. und abschließend 3 min. 72°C) genügt, um verschiedene Trans-

kripte gleichzeitig zu detektieren. Die Amplifikation des PCR-Produktes wurde mit Hilfe des Icyclers (BioRad) in Echtzeit beobachtet. Mit Hilfe der Software Icyler IQ 3.0 wurde der Schwellenwertzyklus bestimmt. Für alle eingesetzten Primer wurde eine Leerkontrolle und eine „Nur-RNA“-Kontrolle mit eingesetzt. Die Amplifikate wurden durch Sequenzierung auf Ihre Identität überprüft. Die Linearität der Reaktion wurde durch 10-fach-Verdünnungsreihen mit verschiedenen Templates sichergestellt. Die relative Genexpression wurde nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (Heid *et al.*, 1996).

## **2.8. Genexpressionsanalyse durch cDNA-Microarrays**

### **2.8.1. DNA-Microchip-Arrays**

Mit der DNA-Microchip-Hybridisierung steht heutzutage eine innovative Technologie zur Verfügung, mit der das gesamte Transkriptom einer Zelllinie oder eines Gewebes in kürzester Zeit analysiert werden kann. Auf Mikrochips aufgespottete Oligonukleotide werden mit biotinylierten cRNAs hybridisiert und anschließend mit Streptavidin-markierten Fluoreszenz-Farbstoffen versetzt. Ein GeneArray-Scanner wertet die Signalstärken aus, die den Expressionsstärken der einzelnen Gene entsprechen. Diese Methode zeichnet sich durch die schnelle und reproduzierbare Quantifizierung von Genexpressionen aus, wobei viele tausend bis mehrere zehntausend Gene gleichzeitig analysiert und auch zum Vergleich zu anderen Zelllinien oder Geweben herangezogen werden können. Durch diese Entwicklung wurde ein neues Instrument geschaffen, das die Möglichkeiten bietet, unterschiedliche Expressionsmuster zu detektieren und Genfunktionen sowie Zielgene aufzudecken. Die DNA-Mikrochip-Analyse erfordert geringen Zeitaufwand und ist im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, wie z.B. der subtraktiven Klonierung, relativ zeit- und kostengünstig. Für die Hybridisierung wird hochqualitative und absolut DNA-freie RNA aus Zelllinien oder Geweben eingesetzt. Nach dem „*standard-one-round amplification protocol*“ (s. Abb. 2.9) wird diese in biotinylierte cRNA umgeschrieben und anschließend mit einem Testchip zur Qualitätsbestimmung hybridisiert. Im nächsten Schritt wird der Analysechip hybridisiert, dann Streptavidin-markiertes Phycoerythrin zugegeben und die Signalstärke detektiert. Auf diesem Chip befinden sich verschiedene „Proben-Sets“ sowie entsprechende Sets für interne Kontrollen.



**Abb. 4. Synthese biotinylierter antisense-RNA („standard-one-round amplification protocol“)**  
gRNA: gesamt-RNA

Jedes Gen wird durch ein Proben-Set, bestehend aus 20 verschiedenen Proben-Paaren, repräsentiert. Ein einzelnes Proben-Paar besteht aus einem 25mer Oligonukleotid eines Gens (PM; Perfect Match) und dem gleichen Oligonukleotid, bei dem jedoch die Base an Position 13 mutiert wurde (MM; Mismatch). Das Signal des MM stellt ein Maß für die unspezifische Hybridisierung dar und wird von dem des PM subtrahiert. Die Differenz dieser beiden Signalstärken gibt Auskunft über die Anwesenheit (PM>MM) oder die Abwesenheit (PM<MM) des entsprechenden Transkriptes. Aus diesen 20 Proben-Paaren wird nun der Mittelwert gebildet, der dann in eine vergleichende und statistische Analyse eingeht und dort als „Signal log<sub>2</sub> ratio“ bezeichnet wird und für die Auswertung von großer Bedeutung ist.

Zur Fehlerminimierung und zur Qualitätsbestimmung sind auf jedem Chip Kontrollgene aufgebracht, die eine Überprüfung der erfolgreichen cRNA-Synthese und Hybridisierung möglich machen. Mit der sogenannten „polyA+-spike“-Kontrolle wird ermittelt, ob die cRNA-Synthese erfolgreich war. Hierzu werden mRNA-Transkripte der Gene *DapX*, *LysX*, *PheX*, *ThrX* und *TrpX* dem „standard-one-round amplification protocol“- Probenansatz zugegeben und müssen nach der Hybridisierung eine vorher definierte Signalstärke ergeben. Die vier cRNA-Transkripte der

aufgespotteten Gene *BioB*, *BioC*, *BioD* und *CreX* werden dem Hybridisierungsansatz beifügt. Anhand deren Signalstärken lässt sich eine Aussage über die Hybridisierungsqualität machen. Wie auf den Testchips befinden sich auch auf dem Analysechip Haushaltsgene (Oligonukleotide vom 3'- und 5'-Ende), die die eingesetzte RNA-Qualität definieren. Werden nun die Expressionsmuster und -stärken zweier DNA-Microchips miteinander verglichen, muss zunächst eine Normierung durchgeführt werden, bei der durch verschiedene Skalierungsverfahren die Signalintensität der DNA-Microchips rechnerisch angeglichen wird. Das Hintergrundrauschen wird durch Messung der 20 schwächsten Pixel aus 16 Chip-Feldern bestimmt.

### **2.8.2. Erst-Strang cDNA-Synthese**

Das Volumen der RNA wurde auf 15 µg/10 µl eingestellt. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl T7-(dT)24-Primer (100 pmol/µl, Sequenz 5'-GGCCAGTGA ATTGTAATACG-ACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24-3') zu 10 µl RNA-Lösung gegeben, der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend 5 sec zentrifugiert und für 2 min auf Eis gestellt. Für die Erst-Strang-Synthese, in der an die vorhandene RNA ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird, wurde das Superscript-II-System (Life Technologies) verwendet. Zu den 11 µl der mit dem Primer hybridisierten RNA wurden 4 µl 1<sup>st</sup>-Strand-Buffer (5x konzentriert), 2 µl 0,1 M DTT (Endkonzentration 0,01 M) und 1 µl 10 mM dNTP (Endkonzentration 0,5mM) gegeben und der Ansatz für 2 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2µl der reversen Transkriptase-Superscript-RT II wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert.

### **2.8.3. Zweit-Strang-Synthese**

In der Zweit-Strang-Synthese wird aus dem cDNA-Strang ein DNA-Doppelstrang gebildet, wobei der ursprüngliche RNA-Strang abgebaut wird. Der Syntheseansatz wurde wie folgt hergestellt: Zu 30 µl 2<sup>nd</sup>-Strand-Buffer (5x konzentriert) wurden 3 µl dNTP (10 mM, Endkonzentration 0,2 mM), 1µl *E. coli* DNA-Ligase (10 u/µl), 4 µl *E. coli* DNA Polymerase I (10 u/µl), 1 µl Rnase H (2 u/µl) und 91 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Zu diesen 130 µl kam der komplette Ansatz aus der Erst-Strang-Synthese. Der Ansatz wurde für 2 h bei 16°C inkubiert, anschließend 2 µL T4 DANN-Polymerase zugegeben und weitere 5 min. bei 16°C inkubiert. Zum Schluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA abgestoppt.



#### **2.8.4. Reinigung der erhaltenen Doppelstrang- DNA (nach Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Module P/N 900371)**

Zu den im vorigen Schritt erhaltenen 162 µl doppelsträngiger DNA wurden 600 µl cDNA-Bindepuffer gegeben und gemischt. 500 µl dieser Lösung wurden auf eine cDNA-Reinigungssäule gegeben, welche in einem dem Kit beigelegten 2 ml-Röhrchen 1 min bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) wurde. Das Filtrat wurde verworfen und der Rest des Ansatzes erneut auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Filtrates und des Zentrifugenröhrchens wurde die Säule in ein neues 2ml-Röhrchen umgesetzt, mit 750 µl cDNA-Waschpuffer beladen und erneut wie oben zentrifugiert. Auch das hier angefallene Filtrat wurde verworfen, anschließend wurde mit geöffnetem Deckel 5 min wie oben zentrifugiert, um evtl. Flüssigkeitsreste zu entfernen. Filtrat und Zentrifugenröhrchen wurden verworfen, die Säule wurde auf ein beigelegtes 1,5 ml-Röhrchen umgesetzt, mit 23 µl cDNA-Elutionspuffer benetzt und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert und das Filtrat bis zur *in-vitro*-Transkription bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.8.5. *In-vitro*-Transkription**

Bei der nun folgenden *in-vitro*-Transkription (IVT) wird die doppelsträngige DNA wieder in RNA umgeschrieben. Dabei werden neben unmarkierten auch mit Biotin gekoppelte Nukleotide verwendet, die später zum Markieren der RNA-Moleküle dienen. Bei den vorangegangenen Syntheseschritten wurden die mRNA-Moleküle im Verhältnis 1:1 umgeschrieben. Die IVT-Reaktion stellt eine 30-100-fache, dabei lineare Amplifikation dar (Lipshutz *et al.*, 1999). Diese Linearität ist eine Voraussetzung für die genaue Bestimmung der relativen Expressionslevel der betrachteten Transkripte. Die gesamte Methode zur Amplifikation heterogener Populationen von Gegenstrang- bzw. komplementärer RNA (cRNA) unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase wurde erstmalig von van Gelder *et al.* (1990) beschrieben.

Für die *in-vitro*-Transkription wurde das Bio Array RNA Transcript Labelling Kit P/N 900182 (Enzo Diagnostics) und T7 Polymerase von Stratagene (600123) verwendet. Der zur Transkription erforderliche Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: jeweils 4 µl 10 x HY Reaction Buffer, 10 x Biotin Labelled rNTP's, 10 x RNase Inhibitor Mix, 10 x DTT, sowie 3 µl T7 Polymerase (50U/µL). Zum Ansatz wurden 21µl der gereinigten Doppelstrang-DNA gegeben und für 6 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### **2.8.6. Reinigung der IVT-Produkte**

Für die Reinigung der IVT-Produkte wurde das Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Module P/N 900371 verwendet. Dazu wurde der IVT-Ansatz zunächst durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem Wasser und Mischen verdünnt. 350 µl IVT cRNA-Bindepuffer wurden zugegeben und erneut gemischt. Durch Zugabe von 250 µl 100%igem Ethanol und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Nukleinsäuren gefällt. Der Ansatz wurde komplett auf eine dem Kit beigelegte Affinitätssäule in einem 2 ml-Röhrchen gegeben und 15 sec bei 13.000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat und das Zentrifugenröhrchen wurden verworfen. In einem neuen Röhrchen wurden 500 µl cRNA Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut wie oben zentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 500 µl 80%igem Ethanol, Zentrifugation wie oben, das Filtrat wurde jeweils verworfen. Zum Schluss wurde mit geöffnetem Deckel 5 min wie oben zentrifugiert, um evtl. Flüssigkeitsreste zu entfernen. Filtrat und Zentrifugenröhrchen wurden verworfen, die Säule wurde auf ein beigelegtes 1,5 ml-Röhrchen umgesetzt, mit 11 µl RNase-freiem Wasser benetzt und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert und dieser Schritt mit weiteren 10 µl RNase-freiem Wasser wiederholt.

### **2.8.7. Fragmentierung der cRNA**

Bevor die markierte RNA auf die Microarrays hybridisiert werden kann, muss sie fragmentiert werden. Dabei entstehen RNA-Fragmente mit einer Größe von 35 bis 200 Basenpaaren. Diese kleinen Fragmente ermöglichen eine bessere Hybridisierung auf den Genchips.

Für die Fragmentierung wurden 16 µg der cRNA in einem Volumen von 16 µl eingesetzt (nach Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Module P/N 900371), mit 8 µl des beigelegten Fragmentierungspuffers und weiteren 16µl DEPC-Wasser versetzt und der Ansatz für 35 min bei 95°C inkubiert.

### **2.8.8. Qualitätskontrolle der präparierten Nukleinsäuren**

Für die Qualitätskontrolle jeglicher präparierter oder isolierter Nukleinsäuren wurde der Bioanalyser (Agilent Technologies) nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

### **2.8.9. DNA-Microarray-Hybridisierung und Datenanalyse**

Die Probenhybridisierung auf MG\_U74Av2 und RG\_U34A (Fa. Affymetrix), Waschschritte, Färben und Scannen mit dem GeneArray Scanner (Fa. Agilent) wurden nach dem Standard-Protokoll der Firma Affymetrix (Gene Expression Technical Manual) durchgeführt. Zur Rohdatenanalyse und zur Erstellung der Vergleichsdaten wurde die RESOLVER 4.0 Software (Rosetta Inpharmatics LLC, USA) verwendet.

### **2.9. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials**

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Für die Analyse wurde ausschließlich Gesamt-RNA ohne Aufreinigung von poly(A) + RNA präpariert. Die Selektion der mRNA zur Analyse erfolgte unter Verwendung eines T7-(dT)24-Primers in der Erst-Strang-Synthese.

Ca.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), einem gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisch, lysiert und kurz geschwenkt. 50-100 mg Herzgewebe wurden mit dem Skalpell grob zerkleinert und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zusammen mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> in die Mahlkartuschen einer Gefriermühle (SPEX CertiPrep 6850 FREEZER/MILL) gefüllt. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem TRIzol wurde die Probe für 15 sek. kräftig geschüttelt und bei RT für 3 min inkubiert, anschließend bei 20.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere klare wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,5 ml Isopropanol pro ml eingesetztem TRIzol zur wässrigen Phase hinzugegeben, leicht gemischt und bei RT für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 4°C und 20.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl kaltem 75-80% Ethanol pro ml eingesetztem TRIzol gewaschen und anschließend bei 13.000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen.

### **2.10. Isolierung von Total-RNA aus Monolayer-Zellkultur**

Zur Isolierung von Total-RNA aus Monolayer-Zellen wurde ebenfalls „TRIzol<sup>®</sup>“ verwendet. Dabei wurde nach Protokoll „B“ des Herstellers vorgegangen.

### **2.11. Reinigung der präparierten RNA für die Chiphybridisierung**

Zur Reinigung der mit TRIzol präparierten Gesamt-RNA wurde das Rneasy-Mini-Kit verwendet. Das Volumen der Probe wurde mit Rnase-freiem Wasser auf 100 µl eingestellt und die Probe nach Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. Auf den Zusatz von β-Mercaptoethanol wurde verzichtet, da die mit TRIzol gereinigte RNA bereits kaum noch Protein enthält. In Abweichung vom Herstellerprotokoll wurde die RNA in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 25 µl DEPC-Wasser eluiert. Das Endvolumen der aufgereinigten RNA in wässriger Lösung betrug somit 50 µl. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen.

### **2.12. Proteintrennung durch SDS-Gelelektrophorese/Western-Blot**

Hier wurde das NuPAGE<sup>®</sup> Electrophoresis-System (Invitrogen) mit 12 %igen Bis-Tris-Gelen und BIO-TRACE-NT-Nitrocellulosemembranen (PALL Life Sciences, 66489) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Detektion wurde das Super-Signal-West-Femto-Substrat (PIERCE, 34095) verwendet. Die Lumineszenzsignale wurden mit dem Fluor-S-Multimager (BioRad) gemessen und ggf. quantifiziert.

### **2.13. Immunfluoreszenzfärbung von Monolayer-Zellen**

Zellen zur Immunfluoreszenzfärbung wurden entweder in 24-Kavitäten-Platten oder *Chamberslides* (Lab-Tec<sup>®</sup> Chambered Coverglass System, Fa. Nalge Nunc International) ausgesät, ggf. transfiziert und/oder mit Substanzen behandelt. Die Zellen wurden zunächst 3 x bei Raumtemperatur gewaschen und zur Fixierung 7 min bei 4°C in 37 %iger Formaldehydlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben erneut gewaschen und zur Permeabilisierung 20 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X 100 in DBPS inkubiert. Nach erneutem Waschen wie oben wurden evtl. vorhandene unspezifische Proteinbindungsstellen mit SUPERBLOCK (Pierce, 37515) 30 min bei Raumtemperatur gesättigt. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in SUPERBLOCK dazugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit SUPERBLOCK wurde auch der Zweitantikörper 1:100 verdünnt dazugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen mit DBPS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## 2.14. Konfokales Laserscanmikroskop

Die Verwendung des konfokalen Laserscanmikroskops (CLSM, Fa. Leica Lasertechnik) bietet die Möglichkeit, 3-dimensionale Bilder aufzunehmen, die eine Aussage über intrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteine erlauben. Die gespeicherten Informationen wurden mit Hilfe der Imaris- und Selima-Software als 3D-Bild dargestellt. Die Kombination aus Argon-Krypton-Laser und den vorhandenen Filtern ermöglichte die Anregung bei drei diskreten Wellenlängen ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ,  $568 \text{ nm}$  und  $647 \text{ nm}$ ).

## 2.15. Liste der verwendeten Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide dienen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit 80-250 bp Länge durch qRT-PCR. Die Schreibweise ist 5'→3' von links nach rechts.

**Tab. 2. Primer für die qRT-PCR mit muriner RNA als Template**

acc. nr.	Gen	Sinn-Primer	Gegensinn-Primer
D16497	Brain Natriuretic Peptide	GGAGGCGAGACAAGGGAGAAC	TCCCAGCGGTGACAGATAAAGG
AW061307	TNF intracellular domain-interacting protein	AGGTCAGTGTGCCACTCCATAG	GAGGTGTGCCATCAGAGATAAGAAC
U03419	Procollagen type I alpha 1	GGCTCCTGCTCCTCTTAG	ACAGTCCAAGTTCTTCATTGC
AW046627	Pim-3-Kinase	GCTCTTTTCCGGAGGAG	GGAACGCTCCCCTCTGTGTC
AF091351	NKX 2.5	CGCTGAACCTCCTTCTACAC	CTCCAGGTCACAGGCATAG
L04503	Uteroglobin	ACACAGACACAGACACACATAGAC	GGGATGCCACATAACCAGACTC
U77630	Adrenomedullin	GCTTCTCATCGCAGTCAATCTTG	CGCCCACTTATCCACTTCTTTC
U84005	Myostatin	GCCATGATCTTGTGTAACCTTCC	TGCGAGTCAAGCCCAAAGTCTC
L12447	Insulin-like growth factor binding Protein 5	CCGCCGACGCTCTTAC	AGAACCACAGAATTGCTCACTC
K02781	Atrial Natriuretic Peptide	GAGCAGTGACGGACAAAAG	GCATGTACACAGGATTTGG
D86037	Sulfonylurea Receptor 2	TGGCAGCAGGCACATAGACAG	CAAGGGACTCACACACCAACAAG
AF033017	Potassium Channel Subfamily K member 1	CCAGCCGCCGTGTTCTC	GAGTCCGAGGAGCAGGTAAC
U58513	Rho-associated Kinase 2	GCCTTTGCCAACAGTCCCTGGGTAG	CGAGGTCTCCGCTGGCATGTAC
X63615	Calcium/Calmodulin-dependent Kinase 2	TAGTTGTGCCTGAGAGTTG	AGATCCGTACCTCCATACC
AJ250489	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	GCTGCTGCTGGCTCACC	AGTCACACCATAGCGTCTTCC
U93291	Calsequestrin skeletal muscle isoform	GCACCTCTCCCTATTTAG	TTCTTGATGTTCTTGGCATTC
AV241808	SERCA	TGTCCCTCCACTTCTCATC	GGTACTTCTTCTTCTCGTCTTC
NM_008084	GAPDH	TGCACCACCACTGCTTA	GGATGCAGGGATGATGTTTC
U23778	Hematopoietic-specific early-response A1-b protein (A1b) gene	GGCATCATTAACTGGGGAAGGATTGTG	ACCTCCATTCTGCCGTATCCATTCTC
NM_008092	GATA-4	GCGGTGGCGTCGTAATGC	TTTATTAGGTTCTTGGGCTTCC
AJ223362	$\beta$ -MHC	AGACGGAGAATGGCAAGAC	GACGGTGACGCAGAAGAG
X65687	PKB $\alpha$	ACCAGATGCAACCTCACTAT	TTAAACCTTGCTCCTCTGTGTC
U22445	PKB $\beta$	AAACACAAGGAAAGGGAAC	CTTTGATGACAGACACCTCA
X13297	Vascular smooth muscle alpha-actin	ATCTGGCACCCTCTTTCTA	GTAGCCTCAGAGGCATAGAG
NM_011785	PKB $\gamma$	TGGCACACACTCTTACTGAAAGC	TATCTAGCATCAAATCTCCAACCTTG

**Tab. 3. Primer für die qRT-PCR mit humaner RNA als Template**

acc. nr.	Gen	Sinn-Primer	Gegensinn-Primer
NM_005163	PKB $\alpha$	ACCAGATGCAACCTCACTAT	TTAAACCTTGCTCCTCTGTGTC
NM_001626	PKB $\beta$	AAACACAAGGAAAGGGAAC	CTTTGATGACAGACACCTCA
NM_181690	PKB $\gamma$	GCAAGTGGACGAGAATAAGT	CAATTTTCATGCAAAAAACAAA
NM_014364	PKB $\gamma$ 1	TTGAACGACTACCCAGAAGT	GTAGCCTGGAGTTTGAATG
NM_014364	GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	AAGATGGTGATGGGATTTTC

**Tab. 4. Primer für die qRT-PCR mit Ratten-RNA als Template**

acc. nr.	Gen	Sinn-Primer	Gegensinn-Primer
U75397	Early Growth Response 1 (EGR-1)	AACTCCTCAGCACCTCAAC	ATTTCTCCCTCCTGTGCTCCT
U78102	Early Growth Response 2 (EGR-2)	CATCTCTGCGCCTAGAAACC	GAAGAGGCTGTGGTTGAAGC
M26745	Interleukin 6 (IL-6)	TTTCTCTCCGCAAGAGACTT	AATTAAGCCTCCGACTTGTG
X06769	c-fos	CAAGGAGCCCTCCTCTGACT	TGCCTTCTCTGACTGCTCACA
X17163	c-jun	ATGACTGCAAAGATGGAAC	GTGAGAAGTCCGAGTTCCT

### **3. Ergebnisse**

Das Ziel dieser Arbeit war, die der Ausbildung von Herzhypertrophie zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen näher zu charakterisieren und mögliche neue Marker für Herzhypertrophie zu finden. Dazu sollten ein existierendes transgenes Tiermodell und ein zu etablierendes Zellkulturmodell aus neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht werden.

#### **3.1. Differentielle Genexpression im Herzgewebe PKBy1-überexprimierender Mäuse**

##### **3.1.1. Das Modell der PKBy1-überexprimierenden Mäuse**

Die Serin-/Threoninkinase PKB wurde nach Ihrer Entdeckung wegen der Homologie zu einem murinen Onkogen (v-AKT) auch als AKT bezeichnet. Zwischenzeitlich entdeckte man die große Ähnlichkeit der Kinase-Domäne mit den Proteinkinasen A und C und der Name „Related to A and C-Protein Kinase“(RAC-PK oder RAC) tauchte in der Literatur auf. Obwohl nach wie vor alle historischen Bezeichnungen in der Literatur Verwendung finden, soll in dieser Arbeit, soweit möglich, die Bezeichnung Proteinkinase B (PKB) verwendet werden, die sich in den letzten Jahren zunehmend durchsetzte (Hanada *et al.*, 2004). Die Proteinkinase B ist ein wichtiger Vermittler in der Signaltransduktion verschiedener Zelltypen. Seit Shioi *et al.* (2000) zeigen konnten, dass die Expression verschiedener PI3K-Mutanten in den Herzen transgener Mäuse sowohl die Herzgröße als auch die Größe einzelner Kardiomyozyten beeinflusst, steht auch die Proteinkinase B im Verdacht, an der Ausbildung einer Herzhypertrophie beteiligt zu sein. PI3K ist maßgeblich für die Aktivierung der nachgelagerten Proteinkinase B verantwortlich. Wie bei PI3K konnte für PKB in *Drosophila melanogaster* ein Einfluss auf Zell- und Organgröße gezeigt werden. Darüber hinaus vermittelt dieser Signaltransduktionsweg den Einfluss von Wachstumsfaktoren und die anabole Wirkung von Insulin. Auch für die durch  $\beta$ -Rezeptoren vermittelte Signaltransduktion konnte gezeigt werden, dass sie unter bestimmten Umständen mit der PI3K/PKB-vermittelten Signaltransduktion wechselwirken kann. Über die Signalweiterleitung unterhalb der Proteinkinase B, von der drei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) bekannt sind, ist im Herzen noch nicht viel bekannt. Aus diesen Gründen lag es nahe, ein transgenes Tiermodell zu entwickeln, welches eine konstitutiv-aktive Mutante der Proteinkinase B kardioselektiv überexprimierte.

Dazu wurde ein 0,65 kB cDNA-Fragment, welches für PKBy kodiert, mit Hilfe von RT-PCR aus Rattenskelettmuskel-RNA amplifiziert. Mit der amplifizierten cDNA als Template wurden aus einer humanen Herz-Lamda-gt11-cDNA-Bibliothek Klone isoliert. Die abgeleitete Proteinsequenz des größten cDNA-Klons ergab ein 465 Aminosäuren großes Vorläuferprotein. Die daraus abgeleitete PKBy -Sequenz zeigte große Ähnlichkeit mit PKBy aus der Ratte sowie humanen PKB $\alpha$ - und PKB $\beta$ -Sequenzen. Alle sequenzierten Klone hatten einen ungewöhnlich langen C-Terminus. Die Datenbanksuche ergab, dass hier eine Spleißvariante von PKBy kloniert wurde, der die Phosphorylierungsstelle an Serin 472 fehlt und die identisch mit PKBy1 (GenBank Acc.: AAF91073) ist. Durch Einfügen einer Myristylierungssequenz am N-Terminus wurde eine konstitutiv-aktive Form des Proteins geschaffen. Durch Klonierung in einen Vektor mit  $\alpha$ -MHC-Promotor (Abbildung 5) wurde eine kardio-selektive Expression des Proteins erreicht. Die transgenen Tiere wurden von Günter Tremp und Natalie Touchet (Aventis S.A., Functional Genomics, Frankreich) entwickelt.

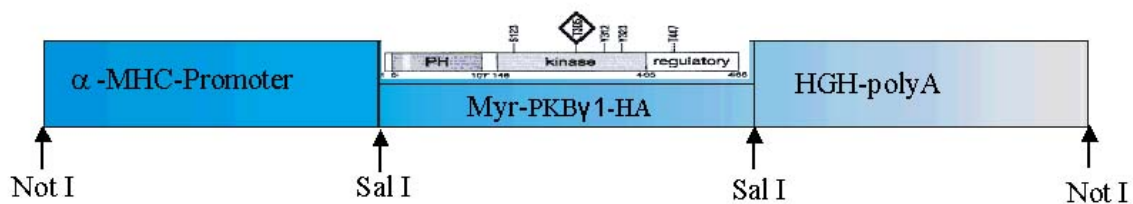
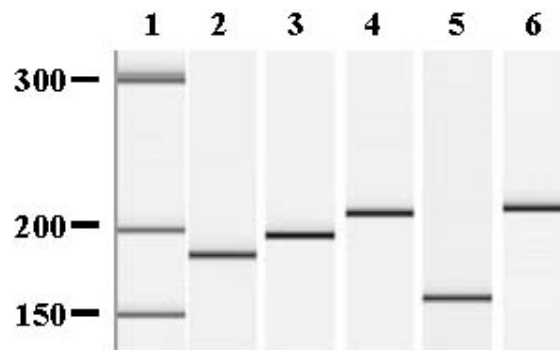


Abb. 5. Schematische Darstellung des zur Schaffung der transgenen Tiere klonierten Konstruktes

### 3.1.2. Absicherung des Hypertrophie-modells, Relevanz des klonierten Konstruktes

Da die aus der cDNA-Bibliothek klonierte Isoform PKBy1 in vorangegangenen Publikationen als nicht im Herzen exprimiert beschrieben wurde, stellte sich die Frage nach der Übertragbarkeit des Hypertrophie-modells auf humane pathophysiologische Vorgänge. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit spezifische qRT-PCR-Primer für die humanen PKB-Isoformen generiert und validiert.

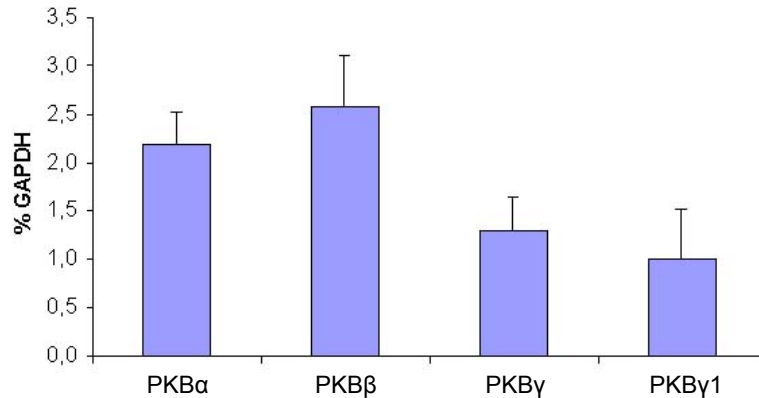


**Abb. 6. Validierung der qRT-PCR für PKB-Isoformen in humanem Herzgewebe**

Mittels Kapillargelelektrophorese wurden die qRT-PCR-Produkte analysiert. Alle Produkte zeigen die erwartete Größe. 1. DNA-Marker; 2. PKB $\alpha$  (185 bp); 3. PKB $\beta$  (194 bp); 4. PKB $\gamma$  (226 bp); 5. PKB $\gamma$ 1 (154 bp); 6. GAPDH (225 bp)

Die PCR-Produkte zeigten die erwartete Größe bei den gewählten Bedingungen, es gab keinerlei Nebenprodukte (Abbildung 6), und Verdünnungsreihen mit humaner RNA als Template belegten die Linearität der Methode für unterschiedliche Ausgangsmengen. Die Untersuchung der RNA von sechs bei Biopsien gewonnenen humanen Herzgewebeproben ergab ein Expressionsprofil der Isoformen, welches nicht nur gut mit vorliegenden Expressionsdaten aus anderen Untersuchungen übereinstimmte, sondern auch zeigte, dass PKB $\gamma$ 1 im humanen Herzen exprimiert wird.



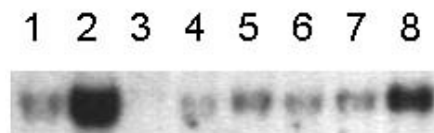


**Abb. 7. Relative Expression einzelner PKB-Isoformen in humanem Herzgewebe**  
Mittels qRT-PCR und der  $\Delta\Delta cT$ -Methode mit GAPDH als Normalisierungsparameter wurde die relative Expression der einzelnen Isoformen in Gewebe aus humanen Herzbiopsien bestimmt.

Im Verhältnis zu den anderen Isoformen war die Expression von PKB $\gamma$ 1 am geringsten (Abbildung 7).

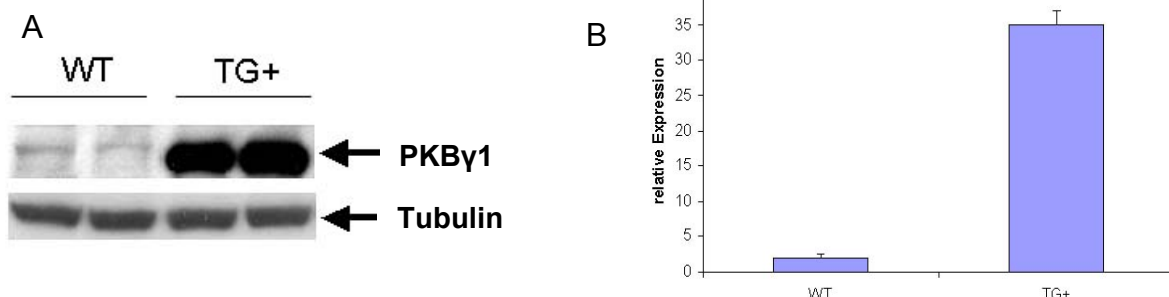
### 3.1.3. Charakterisierung der transgenen Tiere

Die Southern-Blot-Analyse einzelner transgener Linien zeigte einen unterschiedlich starken Einbau des Transgens (Abbildung 8).



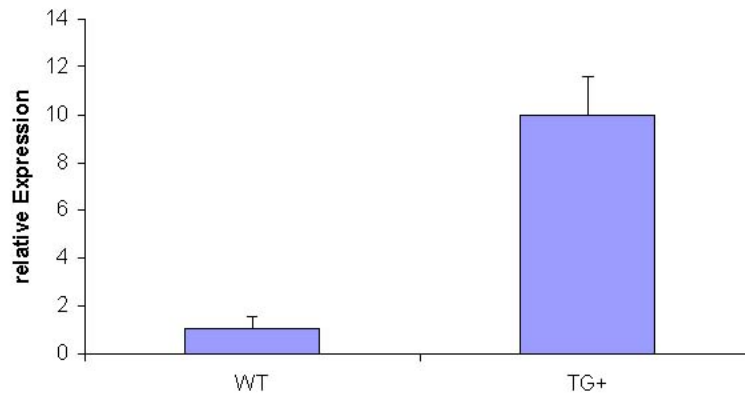
**Abb. 8. Southern-Blot-Analyse aus genomischer DNA (Natalie Touchet, Aventis Frankreich)**  
1. Kontrolle für 2 Kopien; 2. Kontrolle für 10 Kopien; 3. DNA Negativkontrolle; 4-8. DNA von PKB $\gamma$ 1-transgenen Tieren, Reihe 8 repräsentiert Tiere der Linie 38, die für die weiteren Experimente verwendet wurden.

Tiere der Linie 38 mit einer Kopienzahl >5 wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Eine Western-Blot-Analyse aus dem Herzgewebe dieser Tiere ergab eine deutlich stärkere Expression des Transgenes als in Wildtyp-Tieren. Die quantitative Auswertung des Western-Blot-Signales im Verhältnis zu Tubulin ergab eine 35-fache Überexpression von PKB $\gamma$ 1 (Abbildung 9).



**Abb. 9. A: Western Blot aus Herzgewebe von Wildtyp- und transgenen Tieren, B: Densitometrische Auswertung**

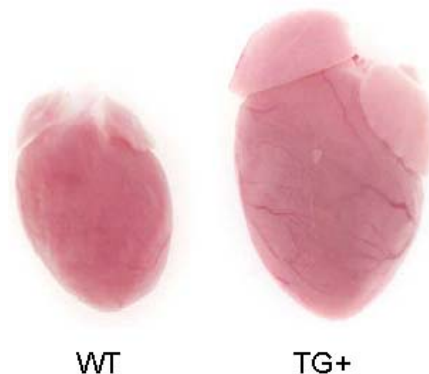
Um die erfolgreiche Überexpression von PKBy1 auch auf mRNA-Ebene zu zeigen, wurden spezifische qRT-PCR Primer generiert und validiert. Die Analyse von mRNA aus Wildtyp- und transgenen Herzen wurde nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit GAPDH als Normalisierungsparameter durchgeführt und zeigte eine zehnfache Überexpression des Transgens in den PKBy1-positiven Tieren (Abbildung 10).



**Abb. 10. Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR**

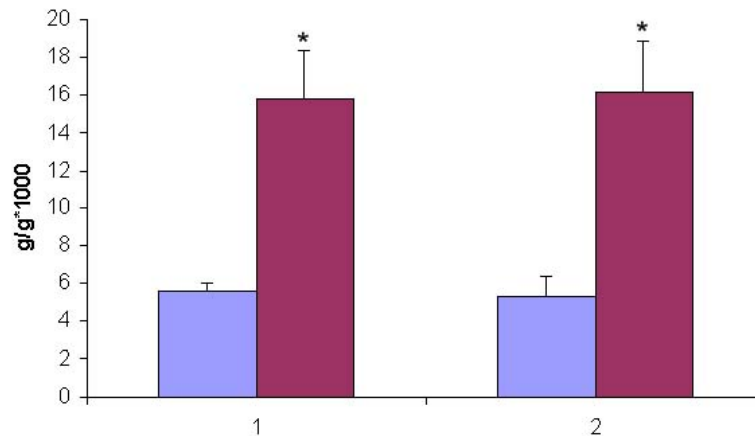
Mittels qRT-PCR und der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode mit GAPDH als Normalisierungsparameter wurde die mRNA-Menge von PKBy1 bestimmt und auf die Expression in den Kontrolltieren (=1) normiert.

Die signifikanteste Auffälligkeit im Phänotyp der transgenen Mäuse war die ausgeprägte Herzhypertrophie. Die Herzen der transgenen Tiere waren im Verhältnis zu denen der Kontrolltiere 2,5 bis dreifach größer (Abbildung 11). Im gleichen Maß unterscheiden sich die Verhältnisse von Herzgewicht/Körpergewicht, sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren (Abbildung 12). Mikroskopisch ließ sich eine Verdickung der Ventrikel- und Vorhofwände im Verhältnis zur Kammergröße feststellen.



**Abb. 11. Massive Herzhypertrophie in PKBy1-überexprimierenden Mäusen (Natalie Touchet, Aventis Frankreich).**

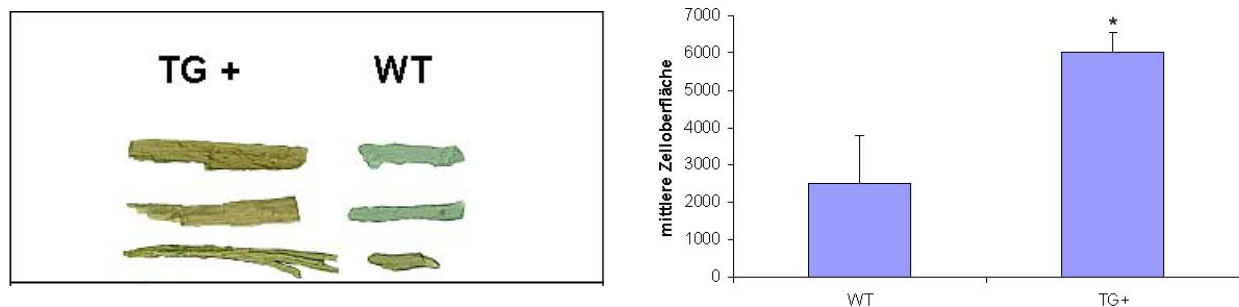
Herzen von Wildtyp-(WT) und transgenen (TG+) Mäusen



**Abb. 12. Verhältnis Herzgewicht / Körpergewicht**

Blauer Balken: Wildtyp-Tiere; roter Balken: transgene Tiere  
1. weibliche Tiere; 2. männliche Tiere

Nach mikroskopischer Untersuchung isolierter Kardiomyozyten zeigte sich eine starke Zellvergrößerung (Abbildung 13) mit teilweise abnormalen Zellkernen, die sich in Anzahl und Form von denen in Kontrolltieren unterschieden. Diese Beobachtungen konnten sowohl an isolierten Zellen als auch an Gewebeschnitten gemacht werden. Mitotische Kerne wurden nicht beobachtet, so dass eine Größenveränderung durch Hyperplasie ausgeschlossen werden konnte. Da dieser Phänotyp an verschiedenen unabhängig voneinander geschaffenen Tierlinien gezeigt wurde, ist eine Hypertrophieantwort auf Grund von Insertion in relevante Gene nahezu ausgeschlossen.



**Abb. 13. Größenverhältnisse isolierter Kardiomyozyten**

Linkes Bild: Isolierte Kardiomyozyten aus Wildtyp- und transgenen Mäusen

Rechtes Bild: Größenmessung isolierter Kardiomyozyten. Jeweils 150 isolierte Zellen wurden gemessen.

Die Zellen der transgenen Tiere sind signifikant größer ( $p < 0,05$ )

(Präparation der Zellen durch Dr. Kerstin Veit, Aventis Pharma Deutschland GmbH)

Mittels Druck-/Volumenkatheteruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp insbesondere der linksventrikuläre enddiastolische Druck und  $dp/dt_{max}$  als Maß für die Kontraktilität erhöht sowie end-

diastolisches als auch endsystolisches Volumen signifikant erniedrigt waren (Tabelle 5). Die Druck-/Volumenkurven zeigten eine für Hypertrophie charakteristische Linksverschiebung (Abbildung 14).

**Tab. 5. Druck-/Volumenkatheteruntersuchung der linksventrikulären Herzfunktion von Wildtyp- und transgenen Mäusen.**

Angabe der Daten in Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler. LVSP: *Left Ventricular End-Systolic Pressure*; LVEDP: *Left Ventricular End-Diastolic Pressure*; ESV : *End-Systolic Volume*; EDV: *End-Diastolic Volume* dp/dt<sub>max</sub>: stärkste Kontraktionsrate; dp/dt<sub>min</sub>: maximale Relaxation ; EF: *Ejection Fraction*; Ea: *arterial Elastance*; t: monoexponentielle Relaxationszeitkonstante. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett gedruckt.

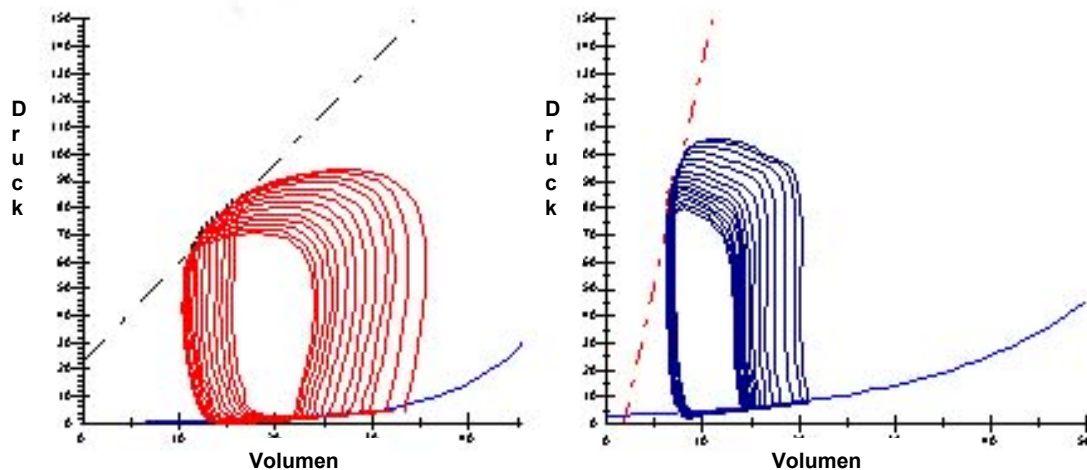
(Untersuchungen und Messergebnisse freundlicherweise von Dr. H. Rütten, Aventis Pharma Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt)

Parameter	Wildtyp (n=8)	TG+ (n=7)
<b>Hämodynamik</b>		
Herzfrequenz. (min <sup>-1</sup> )	426 $\pm$ 17	495 $\pm$ 11
LVSP (mm Hg)	89,2 $\pm$ 3	81,1 $\pm$ 4
LVEDP (mm Hg)	4,1 $\pm$ 0,4	<b>7,05 <math>\pm</math> 0,5</b>
ESV ( $\mu$ l)	15,1 $\pm$ 0,9	<b>9,6 <math>\pm</math> 2,7</b>
EDV ( $\mu$ l)	34,3 $\pm$ 2,4	<b>23,2 <math>\pm</math> 2,2</b>
Auswurfleistung ( $\mu$ l/min.)	9208 $\pm$ 742	8085 $\pm$ 703
<i>Systolische Funktion</i>		
Dp/dt <sub>max</sub> (mm Hg/s)	7132 $\pm$ 346	<b>9947 <math>\pm</math> 501</b>
EF (%)	63,11 $\pm$ 3	60,2 $\pm$ 5
Ea (mm Hg/ $\mu$ l)	4,3 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,5
<i>Diastolische Funktion</i>		
Dp/dt <sub>min</sub> (mm Hg/s)	7024 $\pm$ 251	6232 $\pm$ 503
T (Weiss) (ms)	6,74 $\pm$ 0,3	6,26 $\pm$ 0,36

**Abb. 14. Druck-/Volumenkurven der Untersuchung der linksventrikulären Herzfunktion von Wildtyp- (links) und transgenen Mäusen**

Das Volumen (Ordinate) ist hier gegen die Druckentwicklung (Abszisse) aufgetragen. In der rechten Kurve erkennt man die bei *Vena cava*-Okklusion für Herzhypertrophie typische Linksverschiebung der Kurve.

(Abbildungen freundlicherweise von Dr. H. Rütten, Aventis Pharma Deutschland GmbH, zur Verfügung gestellt)



### 3.1.4. Vergleichende Genexpressionsanalyse im Herzgewebe transgener Mäuse

Ein Ansatz zur Identifizierung von hypertrophen Mechanismen in den Herzen der transgenen Tiere ist der Vergleich der exprimierten Gene in Kontrollherzen mit den Herzen PKBy1-positiver Tiere. Die veränderte Expression einzelner Gene oder Gengruppen kann zur Aufklärung signalvermittelnder Mechanismen beitragen.

Durch den Einsatz von cDNA-Arrays ist es möglich, die Expression vieler hunderter oder tausender Gene gleichzeitig zu untersuchen. Durch eine vergleichende Genexpressionsanalyse von gleich alten transgenen- und Wildtyp-Tieren sollten so Gene identifiziert werden, welche die pro-hypertrophe Signaltransduktion vermitteln.

Dazu wurden die frisch entnommenen Herzen von 6 und 12 Monate alten transgenen und Kontrolltieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Gefriermühle pulverisiert. Aus dem pulverisierten Gewebe wurde die mRNA isoliert, nach dem „*standard-one-round amplification protocol*“ in biotinylierte *antisense*-RNA umgeschrieben und mit den murinen DNA-Microchips *MG\_U74Av2* (Fa. Affymetrix), die ca. 12.000 Gene enthalten, hybridisiert. Die nachfolgenden Daten beruhen auf den Ergebnissen des ersten Hybridisierungsschritts, d.h. nachdem die biotinylierte cRNA zum ersten Mal mit Streptavidin-markiertem Phycoerythrin versetzt und vermessen wurde.

#### 3.1.4.1. Analyse der cDNA-Array Daten

Für die Hybridisierung mit transgener und Wildtyp-cDNA wurde pro Tier je ein DNA-Microchip verwendet. Aufgrund der Methodik können ausschließlich Gene identifiziert werden, die ausreichend transkribiert werden und dadurch ein entsprechendes Fluoreszenz-Signal ausstrahlen. Die erhaltenen Datensätze von transgenen und Wildtyp-Zellen wurden anschließend miteinander verglichen und Differenzen aus den Signalintensitäten gebildet. Gene, die differentiell in transgenem Gewebe vorkommen (stärker oder ausschließlich in diesem Gewebe exprimiert werden), werden bezüglich der Wildtyp-Tiere als hochreguliert bezeichnet.

Es standen zur Untersuchung der Genexpressionsdaten 12 Proben von 6 Monate alten (7 PKBy1-positive, 5 Wildtyp) und 7 Proben von 12 Monate alten Mäusen (4 PKBy1-positive, 3 Wildtyp) zur Verfügung.

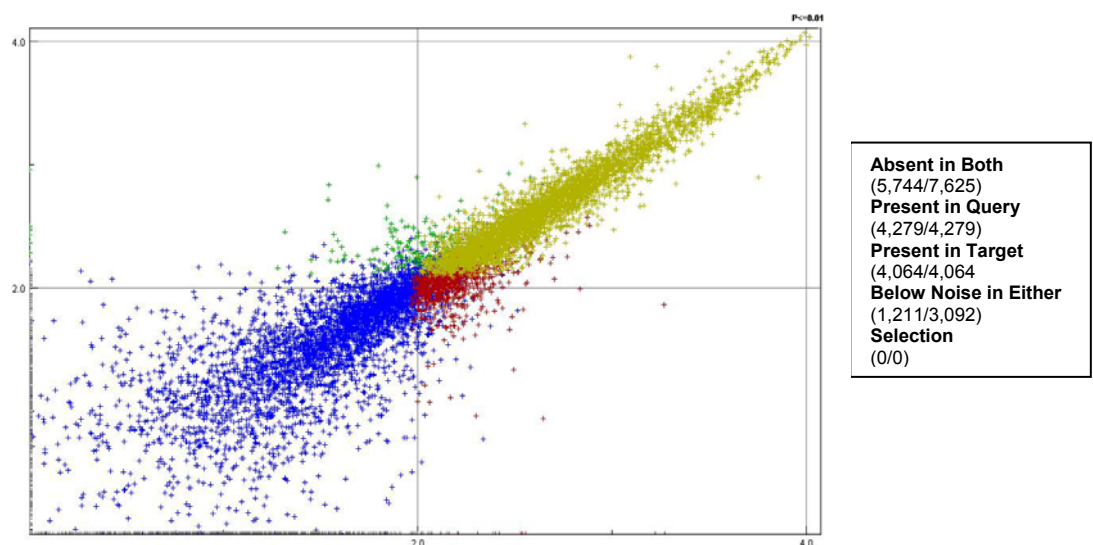
Die Analyse der cDNA-Array-Daten erfolgte mit Hilfe der *RESOLVER Gene Expression Data Analysis Software* (ROSETTA Biosoftware, USA).

### 3.1.4.2. Identifikation differentiell exprimierter Transkripte

Aus den erhobenen Messdaten sollten diejenigen Transkripte identifiziert werden, die einen eindeutigen Unterschied zwischen den positiv-transgenen und den Wildtyp-Kontrollen zeigen. Diese Identifikation differentiell exprimierter Gene zwischen zwei definierten Gruppen von Proben wird als „Gene Selection“ oder „Class Comparison“ bezeichnet (Simon *et al.* 2003). Für die Auswertung der Daten des PKBy1-Modells wurden FC-Werte  $\geq 2$  als Expressionsunterschied akzeptiert.

### 3.1.4.3. Qualitätskontrolle der erhaltenen Hybridisierungsdaten

Die erhaltenen Datensätze wurden zunächst auf ihre Qualität geprüft. Dazu wurden die Intensitätsdaten jedes Chips gegen die gleichen Daten eines anderen Chips derselben Gruppe aufgetragen. Bei gleicher Anzahl an detektierten Genen und gleicher Signalstärke sollte dabei im Idealfall der Scatter-Plot (Abbildung 15) eine Gerade mit der Steigung 1 ergeben. Blaue Datenpunkte repräsentieren dabei Gene, die wegen zu geringer Intensität nicht detektiert werden können, rote, bzw. grüne Datenpunkte repräsentieren die auf dem einen (Query) bzw. anderen (Target) Chip detektierten Gene. Gene, die gleichermaßen auf beiden Chips detektiert wurden, sind gelb dargestellt. Qualitätsmängel lassen sich hierbei üblicherweise an einer ungewöhnlich breiten Streuung der Datenpunkte oder einem Abweichen von der „Gerade“, insbesondere im hohen Intensitätsbereich, feststellen. Bei keinem der hybridisierten MicroArrays ließen sich auf diesem Wege Qualitätsmängel feststellen.

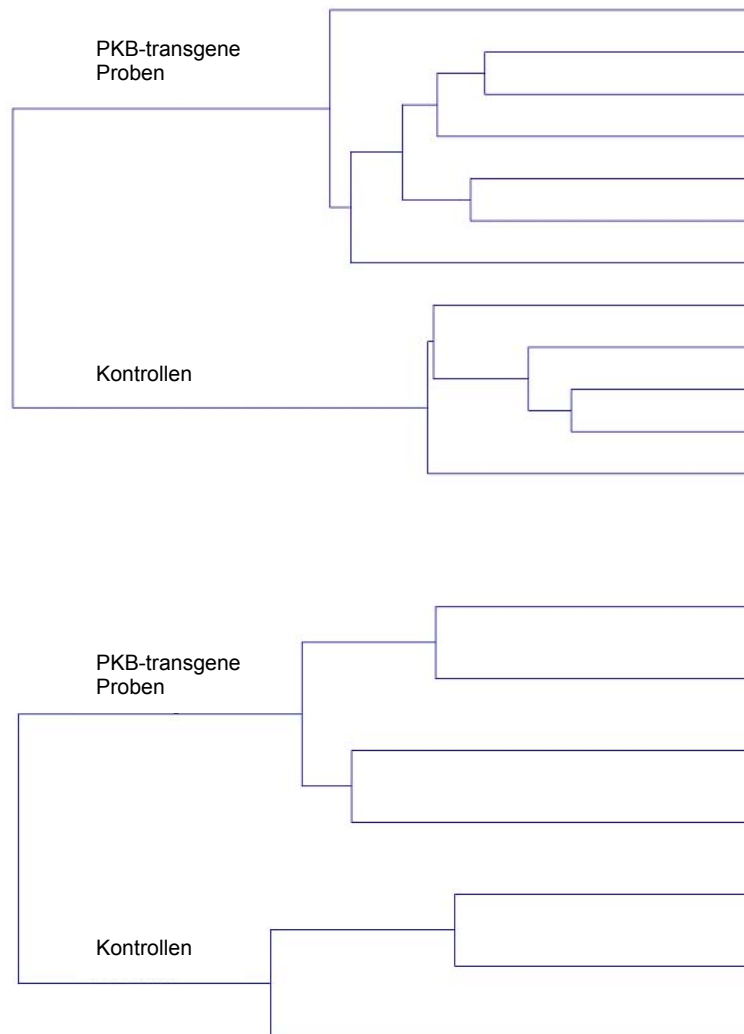


**Abb. 15. Scatter-Plot der Fluoreszenz-Intensitäten zweier cDNA-Arrays**

X-Achse Log 10 der Intensität in der Kontrollprobe

Y-Achse Log 10 der Intensität in der transgenen Probe

Eine weitere Methode der Qualitätskontrolle der MicroArray-Intensitätsdaten ist das Gruppieren („Clustern“) verschiedener Datensätze nach Ähnlichkeiten im Genexpressionsmuster. Das von der Software daraus generierte Dendrogramm sollte dann die verschiedenen in die Berechnung einbezogenen Datensätze in verschiedenen, klar voneinander getrennten Gruppen zeigen.



**Abb. 16. Dendrogramme der „geclusterten“ Chipintensitätsdaten.**

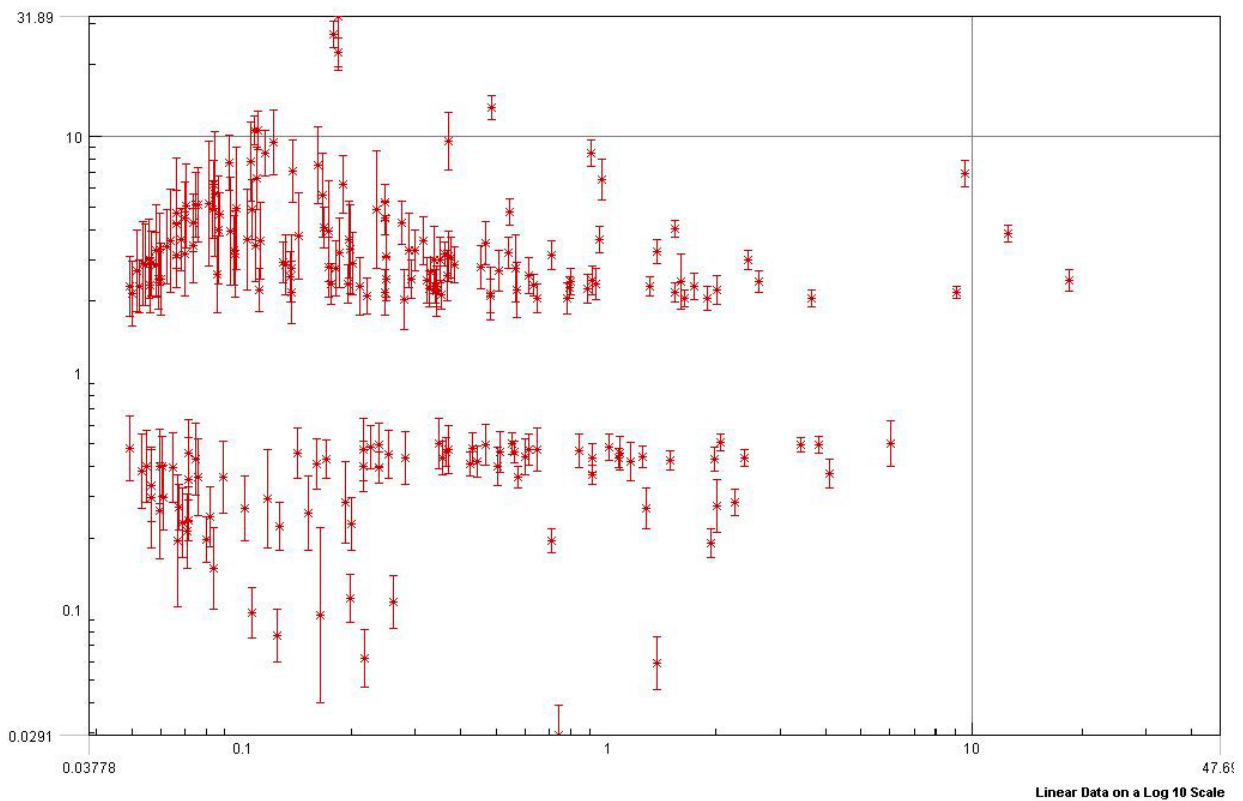
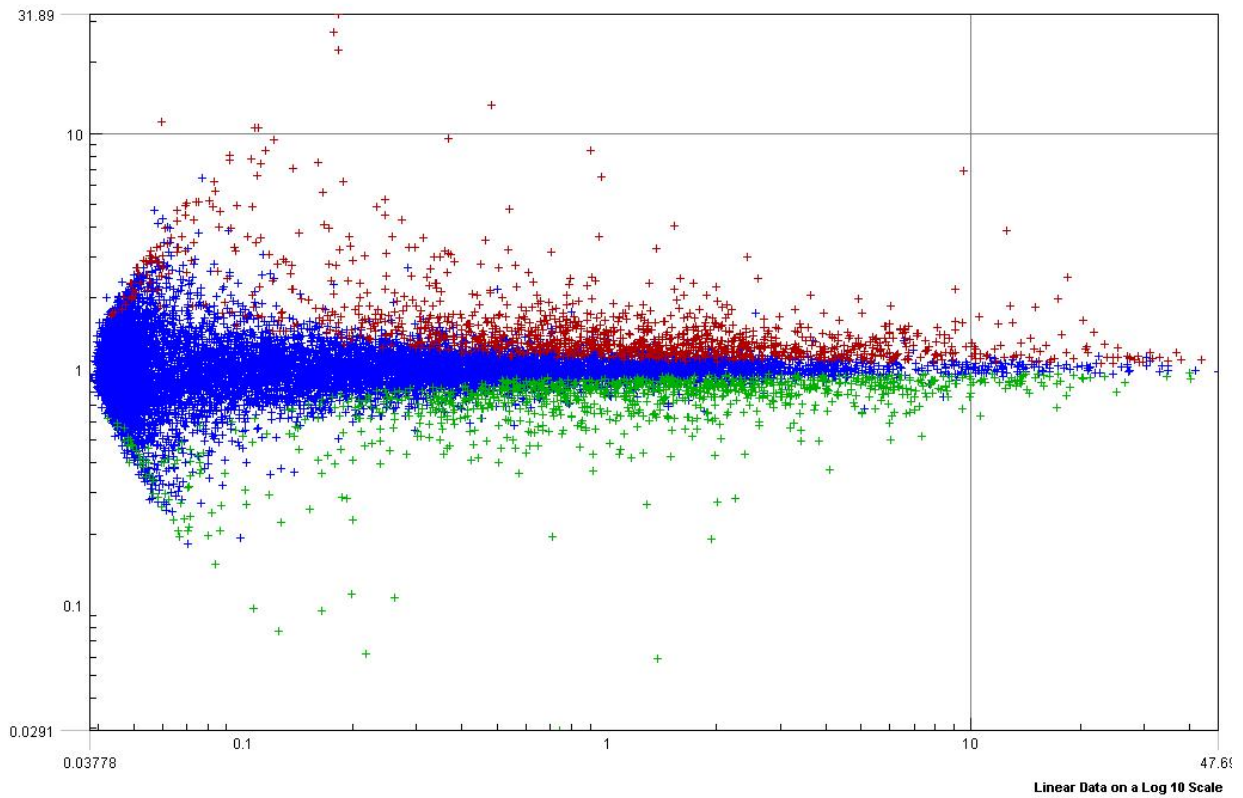
Sowohl für die Proben der 6 Monate alten Tiere (oben) als auch für die der 12 Monate alten Tiere (unten) werden die einzelnen Proben klar einer von beiden Gruppen zugeordnet.

Die Dendrogramme der hybridisierten MicroArray-Daten zeigten sowohl für die Proben der 6 Monate alten, wie auch für die Proben der 12 Monate alten Tiere zwei klar voneinander getrennte Gruppen, die sich den Proben von PKBy1-positiven bzw. Wildtyp-RNA zuordnen ließen (Abbildung 16).

#### **3.1.4.4. Identifikation der regulierten Gene**

Zur eigentlichen Genexpressionsanalyse wurden die Intensitätsdaten der PKBy1-positiven Proben mit denen der Wildtyp-Proben verglichen. In den Abbildungen 17 und 18 sind jeweils auf der oberen Hälfte die Datenpunkte für alle auf dem Chip befindlichen Gene dargestellt. Blau markiert sind die Gene, die von der Software als nicht reguliert („unchanged“) klassifiziert werden, rot steht für die induzierten („upregulated“), grün für die unterdrückten („downregulated“) Gene. Zu beachten ist hierbei, dass die Software alle diejenigen Signale als „reguliert“ bezeichnet, deren normalisierte Intensitätswerte sich von Wildtyp-Probe zu PKBy1-positiv-Probe unterscheiden. Dies kann auch ein verschwindend geringer Unterschied sein, der weder statistisch, noch biologisch ins Gewicht fallen muss. In den Abbildungen 17 und 18 auf der unteren Hälfte sind die nach dem Anlegen von Filterkriterien als reguliert identifizierten Gene gezeigt. Als statistisch und biologisch relevant wurden die Gene definiert, deren Expression sich  $\geq 2$ -fach nach oben oder unten veränderte und deren p-wert  $\leq 0,01$  war. Auf der X-Achse ist die logarithmierte Intensität der Datenpunkte dargestellt, auf der Y-Achse das Expressionsverhältnis von PKBy1-positiv-Proben im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Hochregulierte Gene sind demnach auf einem Y-Achsenabschnitt  $>2$  zu finden, unterdrückte Gene auf einem Y-Achsenabschnitt  $<0,5$ .

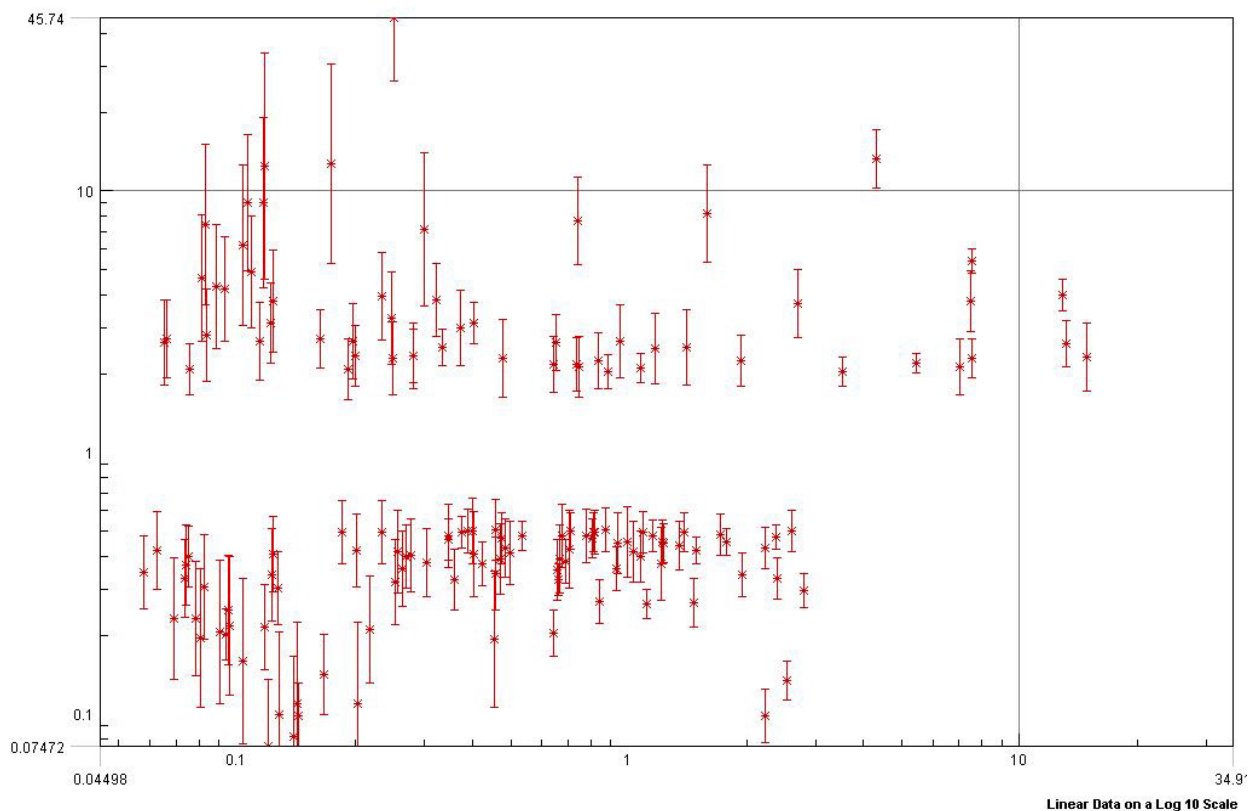
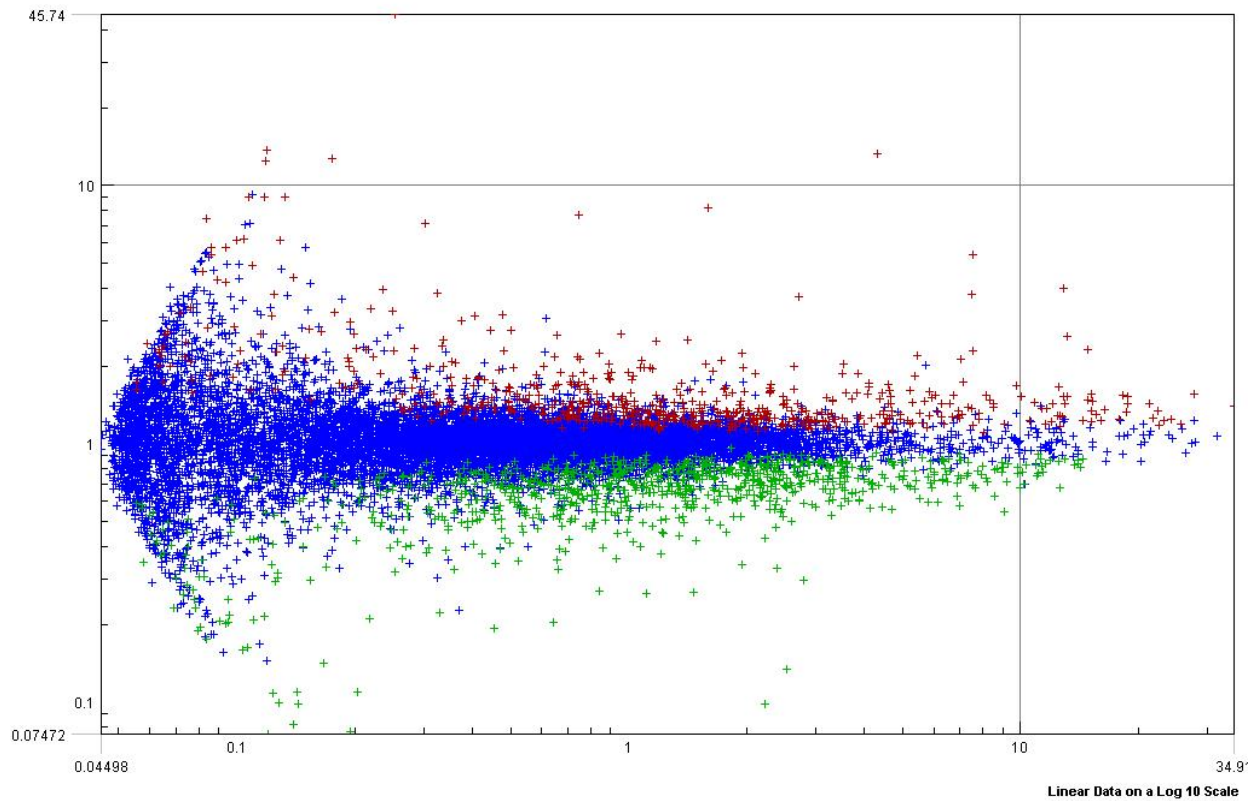




**Abb. 17. Darstellung aller von der Software als reguliert erkannte Gene**

oben: Daten von 6 Monate alten Tieren, statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) als induziert (rot) und unterdrückt (grün) erkannte Gene.

unten: Nach dem Anlegen von Filterkriterien als reguliert erkannte Gene ( $p < 0,01$ , größer oder kleiner 2-fach reguliert)



**Abb. 18. Darstellung aller von der Software als reguliert erkannten Gene**

oben: Daten von 12 Monate alten Tieren, statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) als induziert (rot) und unterdrückt (grün) erkannte Gene.

unten: Nach dem Anlegen von Filterkriterien als reguliert erkannte Gene ( $p < 0,01$ , größer oder kleiner 2-fach reguliert)

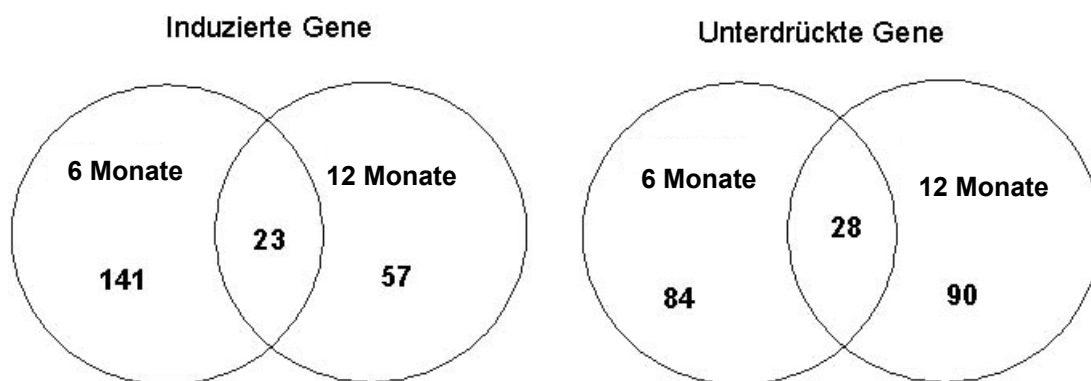
In Tabelle 6 sind die als differenziell reguliert identifizierte Gene zusammengefasst. In den Proben der 6 Monate alten Tiere wurden nach dem Filtern 141 Gene als induziert und 84 Gene als unterdrückt identifiziert. In den Proben der 12 Monate alten Tiere wurden nach dem Filtern 57 Gene als induziert und 90 Gene als unterdrückt identifiziert. Bei den induzierten Genen war die größte Anzahl 2-3-fach hochreguliert, der größte Teil der unterdrückten Gene war mehr als 5-fach herunterreguliert.

**Tab. 6. Zusammenfassung differenziell exprimierter Gene in den transgenen Tieren**

<b>PKB-TG Mäuse 6 Monate alt</b>		Anzahl
<b>Induzierte Gene <math>p \leq 0.01</math></b>		<b>141</b>
> 5-fach induziert		26
< 5-fach & >3-fach induziert		47
< 3-fach & >2-fach induziert		68
<b>Unterdrückte Gene <math>p \leq 0.01</math></b>		<b>84</b>
> 5-fach unterdrückt		13
< 5-fach & >3-fach unterdrückt		18
< 3-fach & >2-fach unterdrückt		53

<b>PKB-TG Mäuse 12 Monate alt</b>		Anzahl
<b>Induzierte Gene <math>p \leq 0.01</math></b>		<b>57</b>
> 5-fach induziert		12
< 5-fach & >3-fach induziert		13
< 3-fach & >2-fach induziert		32
<b>Unterdrückte Gene <math>p \leq 0.01</math></b>		<b>90</b>
> 5-fach unterdrückt		13
< 5-fach & >3-fach unterdrückt		19
< 3-fach & >2-fach unterdrückt		58



**Abb. 19. Zu verschiedenen Zeitpunkten differenziell exprimierte Gene und deren Gemeinsamkeiten**

Ein Vergleich der zu beiden Zeitpunkten differenziell exprimierten Gene ergab eine Schnittmenge von 23 induzierten und 28 unterdrückten Genen (Abbildung 19).

Eine vollständige Liste der zu den beiden Zeitpunkten regulierten Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Exemplarisch werden in Tabelle 7 die zu beiden Zeitpunkten gemeinsam regulierten Gene gezeigt.

Tab. 7. In den Herzen der 6 und 12 Monate alten transgenen Tiere differenziell regulierte Gene.

GB acc.	Induzierte Gene	6 Monate	p-Wert	12 Monate	p-Wert
L04503	Uteroglobin	<b>31,89</b>	3,92E-12	<b>45,74</b>	9,23E-13
U84005	Myostatin	<b>22,2</b>	0	<b>3,1</b>	1,5E-13
AA690483	Unknown EST	<b>13,03</b>	0	<b>3,91</b>	0,000165
AJ012754	Glycoprotein-associated amino acid transporter y+LAT1a	<b>9,4</b>	5,47E-19	<b>2,62</b>	1,66E-05
X12973	MLC1F/MLC3F gene for myosin alkali light chain (exon 1) (fast skeletal muscle isoform)	<b>6,89</b>	0	<b>13,18</b>	1,75E-29
AF100777	Connective tissue growth factor related protein WISP-1 (Wisp1)	<b>6,15</b>	8,04E-13	<b>2,31</b>	0,00129
AV334573	Unknown EST	<b>5,53</b>	5,14E-06	<b>2,27</b>	0,00565
L34216	GTP-binding protein alpha-o subunit	<b>4,91</b>	0,00543	<b>2,62</b>	0,00153
U77630	Adrenomedullin	<b>4,72</b>	0	<b>2,26</b>	0,01
J04170	CD72 antigen	<b>4,59</b>	4,85E-18	<b>2,69</b>	0,0015
X99572	C-fos induced growth factor	<b>4,08</b>	6,08E-16	<b>8,91</b>	0,000124
AJ250489	Receptor activity modifying protein 1 (Ramp1 gene)	<b>4,01</b>	0	<b>2,22</b>	0,000284
U23778	Hematopoietic-specific early-response A1-b protein (A1b)	<b>3,89</b>	0,0031	<b>4,19</b>	0,000872
L12447	Insulin-like growth factor binding protein 5	<b>3,83</b>	0	<b>5,32</b>	0
U88623	G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5)	<b>3,56</b>	3,43E-10	<b>2,32</b>	0,000456
X16834	Mac-2 antigen	<b>3,27</b>	5,7E-12	<b>2,96</b>	0,000388
AI842259	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3	<b>3,15</b>	6,49E-41	<b>3,76</b>	0,00168
L48687	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta	<b>3,02</b>	4,81E-11	<b>3,22</b>	0,00231
V00741	Epidermal growth factor	<b>2,82</b>	3,37E-13	<b>4,59</b>	0,00419
M19436	Myosin light chain, alkali, cardiac atria	<b>2,43</b>	1,55E-34	<b>2,29</b>	0,0021
M62470	Thrombospondin 1	<b>2,28</b>	6,12E-07	<b>2,69</b>	1,92E-05
AJ223208	Cathepsin S	<b>2,27</b>	1,74E-16	<b>2,15</b>	0,000191
AW048272	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein(SH3BGR gene).	<b>2,16</b>	0	<b>2,18</b>	8,54E-37
GB acc.	Unterdrückte Gene	6 Monate	p-Wert	12 Monate	p-Wert
AB006361	Prostaglandin D synthetase	<b>-34,36</b>	9,39E-41	<b>-7,51</b>	0
AF017639	Carboxypeptidase X2	<b>-16,41</b>	2,98E-29	<b>-2,22</b>	2,43E-06
AI314227	Acyase III	<b>-13,17</b>	2,81E-30	<b>-12,33</b>	0,000225
AF017639	Carboxypeptidase X2	<b>-9,48</b>	1,33E-23	<b>-5,26</b>	0,00355
AI839109	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8 (Tnfaip8)	<b>-5,23</b>	0	<b>-2,7</b>	4,24E-09
AI988033	Unknown EST	<b>-4,44</b>	1,06E-10	<b>-2,03</b>	2,69E-05
AW046627	Pim-3 serine-/threonine-kinase	<b>-3,8</b>	6,88E-16	<b>-2,05</b>	2,08E-06
AW123567	Cytochrome c oxidase subunit VIb, testes-specific (Coxvib2),	<b>-3,77</b>	3,76E-12	<b>-3,31</b>	0,00582
D86037	Sulfonylurea receptor 2	<b>-3,58</b>	4,65E-41	<b>-4,99</b>	2,71E-19
AC002397	Unknown EST	<b>-3,48</b>	0,0056	<b>-6,35</b>	0,00857
AB015728	Granzyme M	<b>-2,87</b>	0,00582	<b>-4,66</b>	0,00849
AI787137	Chemokine-like factor super family 8 (Cklsf8)	<b>-2,8</b>	8,41E-45	<b>-2,44</b>	0,000501
J04696	Glutathione S-transferase class mu (GST5-5)	<b>-2,73</b>	0	<b>-2,36</b>	0,00581
AJ001038	Myomesin	<b>-2,71</b>	6,16E-18	<b>-2,03</b>	4,74E-06
AI850090	Unknown EST	<b>-2,55</b>	2,83E-13	<b>-2,66</b>	0,000394
M26071	Coagulation factor III	<b>-2,46</b>	5,59E-25	<b>-2,18</b>	8,94E-07
AA681520	Geminin (Gmn)	<b>-2,41</b>	3,91E-13	<b>-4,8</b>	0,000422
AI841295	Kappa glutathione S-transferase	<b>-2,36</b>	7,76E-26	<b>-2,08</b>	3,66E-06
L16992	Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase E1 beta-subunit	<b>-2,34</b>	0	<b>-2,1</b>	3,69E-11
AB005450	Carbonic anhydrase XIV	<b>-2,34</b>	0	<b>-3,83</b>	5,47E-44
AI846319	RAN guanine nucleotide release factor	<b>-2,33</b>	1,71E-14	<b>-2,24</b>	3,64E-08
M32032	Selenium binding protein 1	<b>-2,3</b>	2,5E-28	<b>-3,76</b>	4,66E-16
AI850288	Rhopilin, Rho GTPase binding protein 2 (Rhpn2)	<b>-2,22</b>	0,00676	<b>-2,9</b>	0,000372
M88694	Thioether S-methyltransferase	<b>-2,2</b>	4,46E-06	<b>-2,59</b>	0,000403
AF035643	VAMP5	<b>-2,13</b>	2,03E-05	<b>-9,26</b>	0,00119
AF068199	D-dopachrome tautomerase	<b>-2,09</b>	1,71E-13	<b>-2,11</b>	0,000449
AW048512	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1	<b>-2,04</b>	5,64E-37	<b>-3,07</b>	7,74E-13
Y10495	CDV-1R	<b>-2,01</b>	8,55E-44	<b>-2,82</b>	4,56E-10

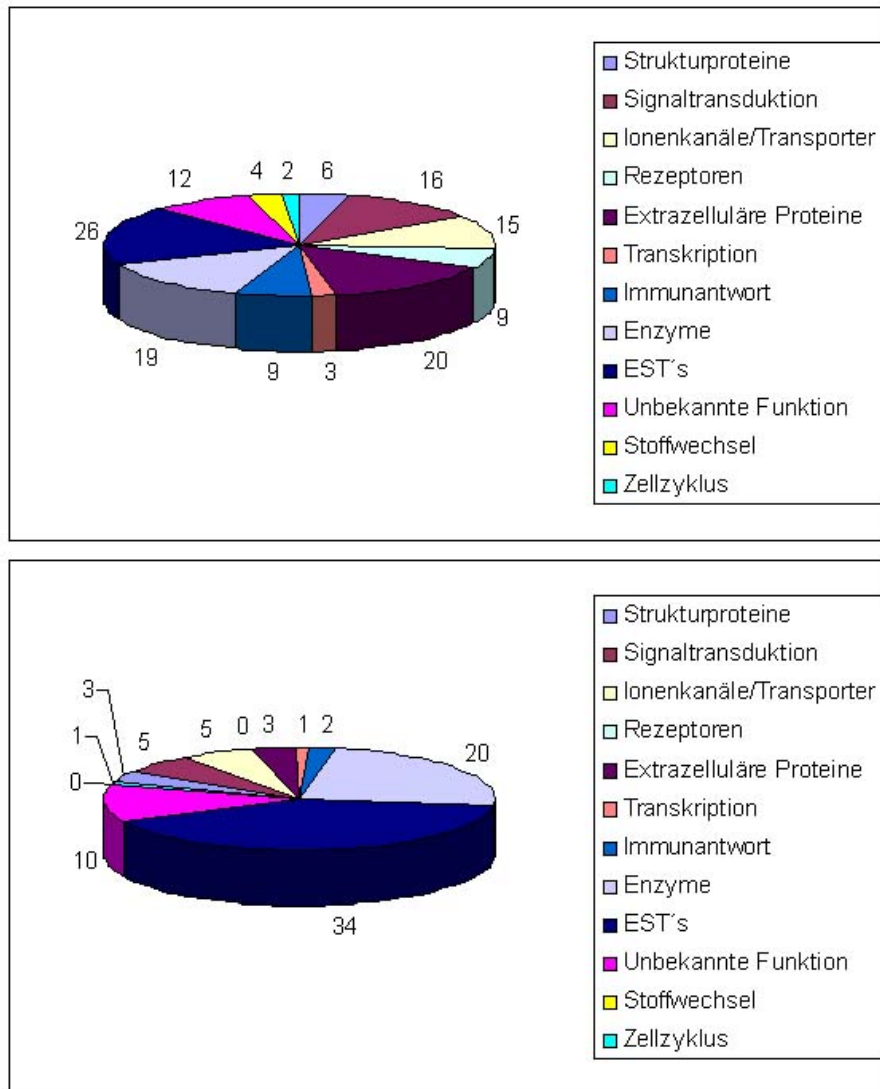
### 3.1.4.5. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen

Eine lange Liste der in den transgenen Tieren regulierter Gene ist sehr wenig aufschlussreich für das Verständnis der molekularen Entwicklungsmechanismen von Herzhypertrophie. Aus diesem Grund wurden die differentiell exprimierten Gene nach der Funktion der durch sie kodierten Proteine einzelnen Gruppen zugeordnet. Neben veröffentlichten Publikationen stammen die meisten Informationen von der NetAffx-Internetseite (<http://affymetrix.com>). Diese Seite des Microarray-Herstellers Affymetrix liefert alle öffentlich verfügbaren Informationen zu den abgefragten Sequenzen, Nukleotiden und Proteinen. Im Einzelnen lassen sich die differentiell exprimierten Gene sinnvoll in folgende Gruppen einteilen:

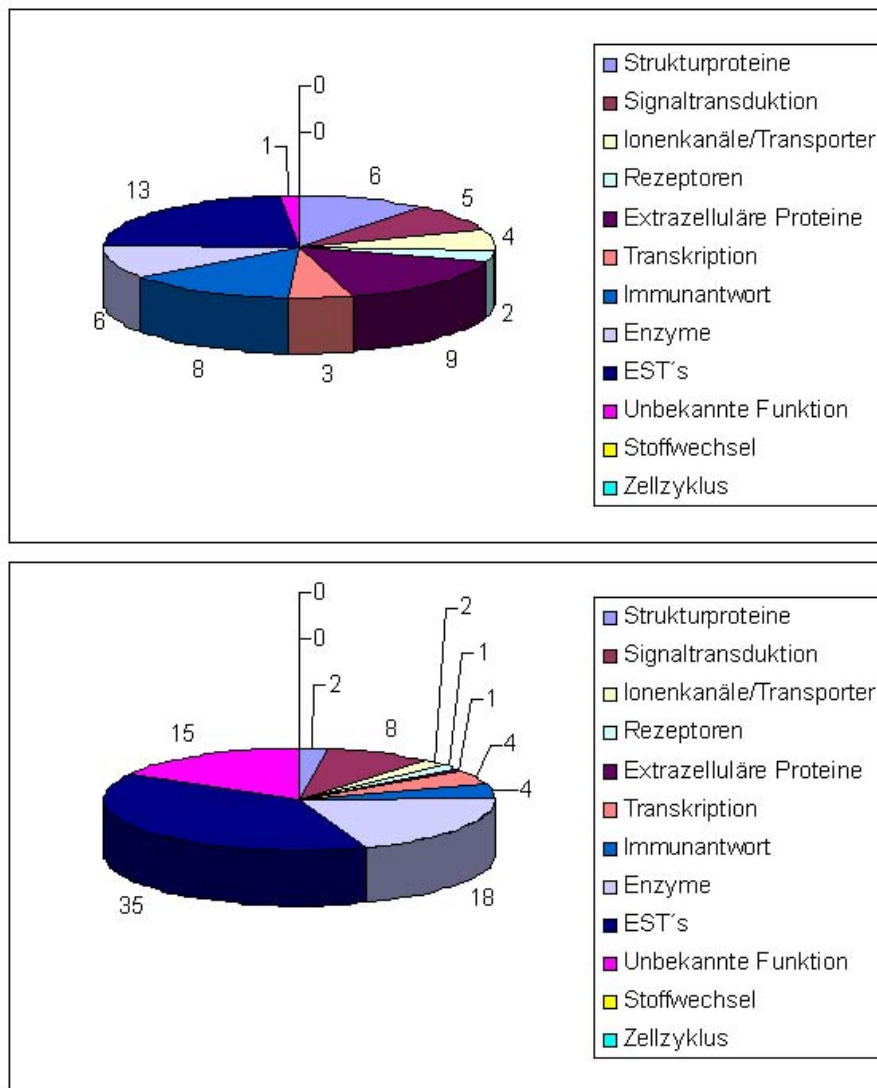
Klassifizierung	Erläuterung
Strukturproteine	Aufrechterhaltung der Zellstruktur, Stabilität, Zytoskelett, insbesondere auch kontraktile Proteine.
Signaltransduktion	Vorwiegend Signalübertragung zwischen Zelloberfläche und Zellkern, Second Messenger.
Ionenkanäle/Transporter	Membranproteine, die an Transportprozessen beteiligt sind.
Rezeptoren	Vorwiegend Transmembranproteine teilweise auch Kernrezeptoren.
Extrazelluläre Proteine	Proteine, die von der Zelle in die Extrazellulärmatrix abgegeben werden und z.B. zur interzellulären Signalübertragung dienen können (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Signalpeptide).
Transkription	DNA-bindende Proteine, die direkt Einfluss auf die Transkription haben.
Immunantwort	Entzündungsmediatoren, Immunglobuline, Proteine, die in Immunantwort/Entzündungsprozesse involviert sind.
Enzyme	Vorwiegend Enzyme, die sich nicht den anderen Gruppen zuordnen lassen.
EST's	„Expressed Sequence Tags“, keine Information über kodierte Proteine, teilweise Sequenzhomologien entdeckt, die bei der Funktionsaufklärung weiterhelfen.
Unbekannte Funktion	Verfügbare Informationen sind zu allgemein oder ungenau oder der Bezug zur Fragestellung dieser Arbeit ist nicht klar ersichtlich.
Stoffwechsel	Gene, die für Proteine kodieren, die im weitesten Sinne in den Zellstoffwechsel involviert sind.
Zellzyklus	Gene, die für Proteine kodieren, die an der Regulation des Zellzyklus (z.B. Zellteilung) beteiligt sind.

Abbildung 20 zeigt die Klassifizierung der regulierten Transkripte nach der Funktion ihrer Proteine. Auffällig dabei ist die große Anzahl der „Expressed Sequence Tags“ (EST's), mRNA-Sequenzen, die bislang noch keinem bekannten Transkript zugeord-

net werden können. Die Suche nach Sequenzhomologien in molekularbiologischen Datenbanken führte teilweise zum Erfolg und ist in der vollständigen Liste im Anhang mit angegeben.



**Abb. 20. Einteilung der induzierten (oben) und unterdrückten Gene (unten) in funktionelle Gruppen.** Daten der Proben aus sechs Monate alten Tieren.



**Abb. 21. Einteilung der induzierten (oben) und unterdrückten Gene (unten) in funktionelle Gruppen.** Daten der Proben aus zwölf Monate alten Tieren.

### 3.1.4.6. Validierung der Genexpressionsdaten

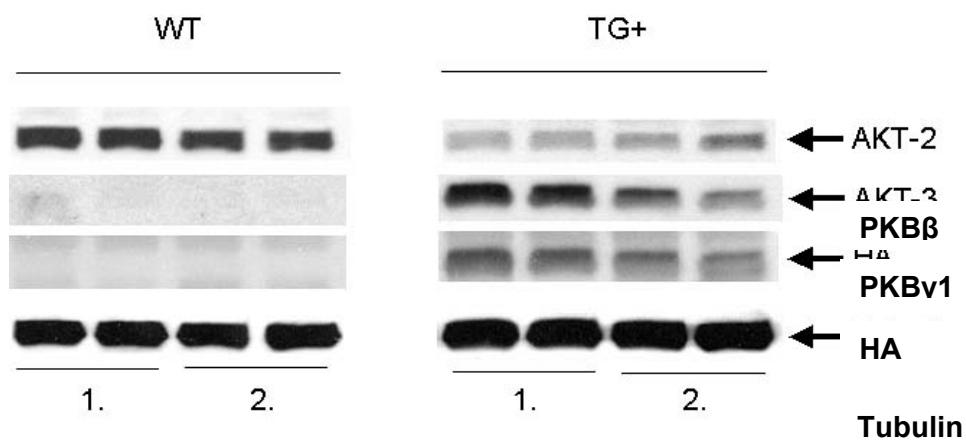
Im Anschluß an die Analyse der Chipdaten erfolgte die Verifizierung der Daten mit quantitativer Real-Time-PCR. Hier wurden exemplarisch 40 der am stärksten regulierten oder im Zusammenhang mit dem Modell interessanten Gene ausgesucht und Primer validiert. Die 24 Gene, für welche die qRT-PCR erfolgreich aufgebaut werden konnte, sind in Tabelle 8 gezeigt. Um ein laut Microarray nicht reguliertes Gen ebenfalls zu überprüfen, wurden Primer für den Transkriptionsfaktor GATA-4, der ebenfalls als in Hypertrophieentwicklung involviert beschrieben wurde, validiert. Genau wie bei den differentiell exprimierten Genen korrelierten die PCR-Daten mit den Microarray-Daten. Die Liste der dazu verwendeten Oligonukleotidsequenzen befindet sich in Kapitel 2.15. dieser Arbeit.



Tab. 8. Durch quantitative Real-Time-PCR bestimmte Genexpressionsänderungen

GB Acc.	Gen	6 Monate	12 Monate
D16497	Brain Natriuretic Peptide precursor	-1,8	3,6
AJ223362	Myosin heavy polypeptide 7 cardiac muscle beta	-1,6	2,5
AW061307	TNF intracellular domain-interacting protein	1,99	1,9
U03419	Procollagen type I alpha 1	1,4	1,9
NM_008092	GATA binding protein 4	1,1	1,3
AW046627	Serine/threonine-protein kinase pim-3	-5,3	-1,8
AF091351	Homeobox protein NKX 2.5	1,4	1,8
L04503	Clara cell phospholipid-binding protein (Uteroglobin)	6,5	14,3
U77630	Adrenomedullin precursor	3,8	2,4
U84005	Growth/differentiation factor 8 precursor (Myostatin)	13	2,3
L12447	Insulin-like growth factor binding protein 5	4,4	4,9
K02781	Atrial natriuretic factor precursor	1,8	2,5
U23778	hematopoietic-specific early-response A1-b protein (A1b) gene	2,4	4,6
D86037	Sulfonylurea receptor 2	-3,3	-4
AF033017	Potassium channel subfamily K member 1 (TWIK-1)	2,4	1,1
U58513	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	2,9	2,2
X63615	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta chain	4,9	1,9
AJ250489	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	4,9	2,8
U93291	Calsequestrin skeletal muscle isoform	2,7	1
AV241808	ATPase Ca <sup>++</sup> transporting cardiac muscle fast twitch 1	16,8	1,6
X65687	PKB $\alpha$	1	-3,2
U22445	PKB $\beta$	-1,8	-2,5
X13297	vascular smooth muscle alpha-actin	-4,2	1

Auch auf Proteinebene konnten die MicroArray- und qRT-PCR-Daten im Prinzip bestätigt werden. So zeigt ein Western-Blot aus Herzgewebelysaten transgener und Wildtyp-Mäuse auf zwei PKB-Isoformen eine klare Abnahme der Proteinmenge von PKB $\beta$  im Vergleich zu Tubulin sowohl im Alter von 6 als auch im Alter von 12 Monaten (Abbildung 22).



**Abb. 22. Western-Blot-Analyse aus Mäuseherzlysaten von Wildtyp (WT)- und transgenen (TG+) Mäusen**  
 1. Proben aus 6 Monate alten Tieren; 2. Proben aus 12 Monate alten Tieren  
 Während das HA-markierte PKB $\gamma$ 1-Transgen stark exprimiert wird, ist die PKB $\beta$ -Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unterdrückt.

### 3.1.4.7. Untersuchung der differentiell exprimierten Gene durch eine „*in-silico*“-Promotoranalyse

Da die differentiell regulierten Gene in den transgenen Mäusen zunächst keinen eindeutigen Rückschluss auf in die Hypertrophieentwicklung involvierte Signaltransduktionswege zuließen, wurden die Promotoren der am stärksten regulierten und der für Hypertrophie als relevant bekannten regulierten Gene näher untersucht. Dazu wurde in der Datenbank ENSEMBL ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) für jedes zu untersuchende Gen eine 1000 Basenpaare große Sequenz vom 5'-Ende des ersten Exons an aufwärts gesucht. Diese Sequenzen wurden in einem „*in-silico*“-Ansatz mit der Software MATINSPECTOR der Firma Genomatix (München) auf mögliche Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in der Hypertrophie eine Rolle spielen könnten. Zusätzlich dazu wurden die Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Klasse mit in die Untersuchung einbezogen, da neuere Forschungsergebnisse aus *C. elegans* darauf hindeuten, dass das in Säugern zu PKB homologe Protein *daf-16* diese phosphoryliert und zu deren Export aus dem Zellkern führt.

Die Transkriptionsfaktorfamilien, für die die einzelnen Promotoren untersucht wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

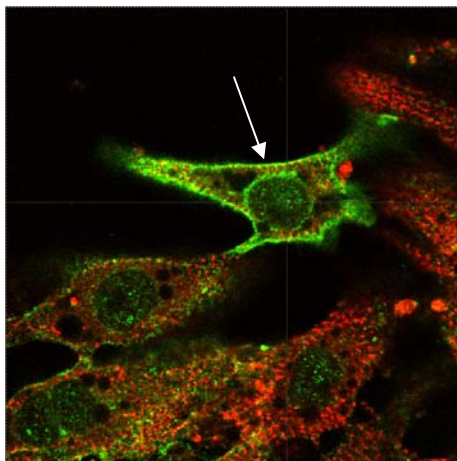
Transkriptionsfaktor	Erläuterung
AP-1	Activator Protein A1
EGRF	EGR/nerve growth Factor Induced protein C & verwandte Transkriptionsfaktoren.
FKHD	Fork Head Transkriptionsfaktoren
GATA	GATA-bindende Faktoren
LHXF	LIM-Domänen bindende Faktoren
MEF2	Myocyte-specific enhancer binding-Transkriptionsfaktoren.
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor κ-B-Transkriptionsfaktoren + c-Rel
NKXH	NKX/DLX-Homöodomänen bindende Faktoren
STAT	Signal transducer and activator of transcription-Faktoren

Die Untersuchung ergab eine überraschende Häufung von möglichen Bindungsstellen (2-8) für die Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie in den Promotoren der induzierten Gene, während in den Promotoren der unterdrückten Gene nur

wenige Bindungsstellen (0-2) zu finden waren Die ausführliche Promotoranalyse befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

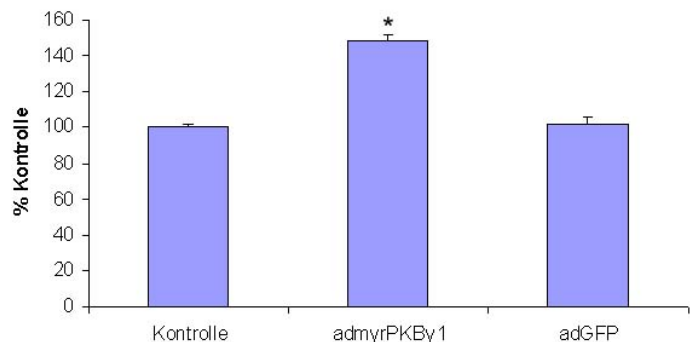
### 3.1.5. Etablierung eines Zellmodells zur weiteren Untersuchung der hypertrophieauslösenden Wirkung von PKB

Um die Vorgänge in den Herzen der PKB $\gamma$ 1-überexprimierenden Tiere auf molekularer Ebene besser zu verstehen, wurde zunächst die transiente Transfektion neonataler Kardiomyozyten mit verschiedenen Konstrukten optimiert. Nach der Transfektion mit einem Expressionsvektor, der für ein myristyliertes (und damit konstitutiv-aktives), Hämagglutinin-markiertes PKB $\gamma$ 1-Protein kodiert, ließ sich nach Immunfluoreszenzfärbung deutlich erkennen, dass das exprimierte Protein in den Zellen vorwiegend an den Membranen, wenig im Cytosol, teilweise aber auch im Kern lokalisiert ist (Abbildung 23). Damit ist zumindest theoretisch die Möglichkeit zur direkten Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren im Kern gegeben.



**Abb. 23. Immunfluoreszenzfärbung adenoviral infizierter Kardiomyozyten.**

Konfokale Lasermikroskop-Aufnahme neonataler Kardiomyozyten, die myristylierte, HA-markierte PKB $\gamma$ 1-Kinase überexprimieren. Die isolierten neonatalen Kardiomyozyten wurden mit PKB $\gamma$ 1myr-HA transfiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit anti-alpha-sarcomeric Actinin (fötale Isoform, rot) und anti-HA (grün) gefärbt. Überlappungen erscheinen gelb (Pfeil).



**Abb. 24.  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Aufnahme als Zeichen verstärkter Proteinsynthese.**

Adenoviral mit dem Transgen infizierte Kardiomyozyten zeigen verstärkte Proteinsynthese im Vergleich mit unbehandelten (Kontrolle) und adGFP-infizierten Zellen.

Auch die Aufnahme  $^{14}\text{C}$ -markierten Leucins als Zeichen der Proteinsynthese stieg nach adenoviraler Infektion mit konstitutiv-aktiver PKB $\gamma$ 1 (Abbildung 24). Die Kontrolle wurde mit GFP adenoviral infiziert und zeigte keinen Unterschied zu völlig

unbehandelten Zellen. Damit konnten für PKBy1 im Zellkulturmodell klare Anzeichen einer Hypertrophieentwicklung gezeigt werden.

### **3.1.5.1. Reporterassays zur näheren Untersuchung der PKB-Signaltransduktion**

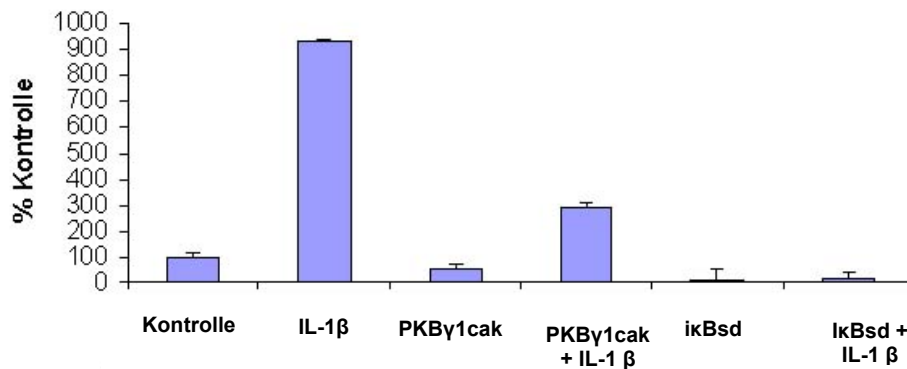
#### **3.1.5.1.1. BNP-Luciferase-Reportersystem**

Die Induktion von BNP wurde in verschiedenen Modellen und auch durch die Genexpressionsdaten dieser Arbeit als verlässlicher Marker für Hypertrophie charakterisiert. Die Kotransfektion eines BNP-Reporterkonstruktes mit konstitutiv-aktiver PKBy1 zeigte keinerlei Induktion des Luciferase-Systems im Vergleich mit GFP- oder Leervektor-transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis passt sehr gut zur Promotoranalyse, da dort auf den ersten 1000 Basenpaaren des BNP-Promotors keine möglichen Forkhead-Bindungsstellen ausgemacht werden konnten.

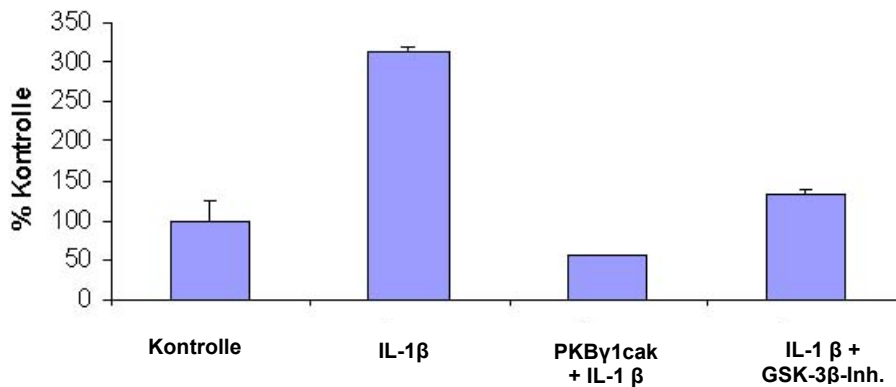
#### **3.1.5.1.2. NFκB-Luciferase-Reportersystem**

In der Literatur wurde mehrfach die Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion durch PI3K/PKB beschrieben (Ghosh & Karin 2002). Darüber hinaus publizierten Cook *et al.* (2003) während der Anfertigung dieser Arbeit Daten, die darauf schließen lassen, dass die Inhibition von NFκB *in vivo* eine Hypertrophieantwort durch Aorten-Ligatur verhindert. Letztlich werden diese Daten jedoch immer noch kontrovers diskutiert, und es ist nicht eindeutig, welches System hier wie beeinflusst wird. Aufgrund der differentiell exprimierten Gene im PKBy1-Modell lässt sich nicht auf eine Aktivierung des NFκB-Systems schließen. Um auszuschließen, dass die Genexpressionsdaten ein möglicherweise falsches Bild liefern, wurde diese Fragestellung an Hand eines NFκB-Luciferase-Reportersystems näher untersucht. Dazu wurden neonatale Kardiomyozyten mit dem Reporterkonstrukt transient transfiziert. Während das System hervorragend auf Stimulation mit Interleukin-1β (IL-1β) ansprach und die Koexpression einer konstitutiv-aktiven IκBα-Mutante (Inhibitor von NFκB) selbst das Hintergrundsignal des Reportersystems unterdrückte, war das konstitutiv-aktive PKBy1-Konstrukt nicht in der Lage, ein von der Kontrolle signifikant unterschiedliches Signal zu generieren (Abbildung 25). Nach Kotransfektion des Reporterkonstruktes mit konstitutiv-aktiver PKBy1 wurde die Signalintensität der IL-1β-Antwort jedoch überraschend stark unterdrückt (Abbildung 25). Offensichtlich wirkt die PKBy1-Aktivierung in diesem Zellmodell inhibierend auf NFκB. Um die weitere Signaltransduktion näher zu beleuchten, wurde der gleiche Versuchsaufbau gewählt. Ein

Ansatz mit NF $\kappa$ B-Reporter wurde jedoch eine Stunde vor der Aktivierung mit IL-1 $\beta$  mit einem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (A003128634) vorinkubiert. Tatsächlich zeigte sich auch hier eine signifikante Abschwächung der Antwort auf Stimulation mit einem Zytokin (Abbildung 26). Da GSK-3 $\beta$  mittels Phosphorylierung durch PKB inaktiviert wird, legen diese Ergebnisse nahe, dass dies die Ursache für den NF $\kappa$ B-inhibierenden Effekt ist.



**Abb. 25. NF $\kappa$ B-Luciferase-Reporter in neonatalen Kardiomyozyten**  
Koexpression einer konstitutiv-aktiven PKB $\gamma$ -Mutante mit dem Reportersystem unterdrückt die IL-1 $\beta$ -induzierte Signalantwort.



**Abb. 26. NF $\kappa$ B-Luciferase-Reporter in neonatalen Kardiomyozyten**  
Auch Vorbehandlung mit einem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor unterdrückt die IL-1 $\beta$ -induzierte Signalantwort.

### 3.1.5.1.3. FKHR-L-Luciferase-Reportersystem

Um eine mögliche Rolle dieser Transkriptionsfaktoren näher zu untersuchen, stand ein Forkhead-Luciferase-Reporterkonstrukt zur Verfügung. Leider war es nicht möglich, die Transfektionsbedingungen in neonatalen Kardiomyozyten so zu optimieren, dass dieses Reporterkonstrukt verwendet werden konnte. Da der PI3K/PKB/FOXO-Signaltransduktionsweg aber als konserviert angesehen wird, wurde die Entscheidung getroffen, dieses System in einem einfachen Modell in HEK-293-Zellen zu testen. Das Reportersystem besteht aus einem für Luciferase kodierenden Plasmid, welches einen Promotor mit einer FKHR-L-Bindungsstelle enthält. Gleichzeitig mit diesem Konstrukt wird ein FKHR-L-Expressionsvektor kotransfiziert. Wird FKHR-L exprimiert, setzt sich dieser Transkriptionsfaktor an den Promotor des Luciferasekonstruktes, so dass bei erfolgreicher Transfektion ein ständig hohes Expressionsniveau von Luciferase herrscht. Wird FKHR-L nun phosphoryliert und erhält damit das Signal, die DNA-Bindung aufzugeben und den Kern zu verlassen, sinkt das Expressionsniveau und damit auch das Signal. In Abbildung 27 sieht man deutlich, dass das System funktioniert. Das Reportersystem alleine führte zu einem starken Luciferase-Signal; die Behandlung mit Insulin, welches den PI3K/PKB-Signalweg aktiviert, führte zur Inhibition, die Kotransfektion mit konstitutiv-aktiver PKBy1 ebenfalls.

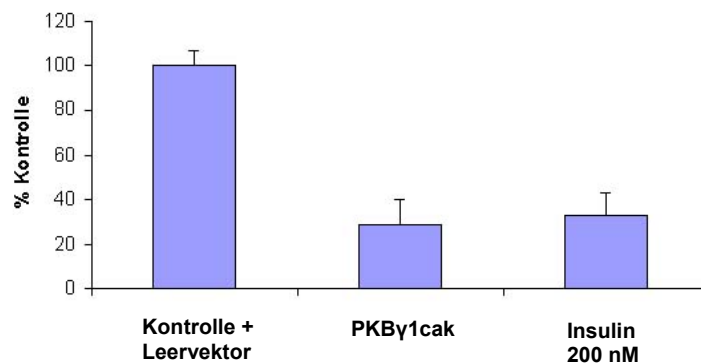
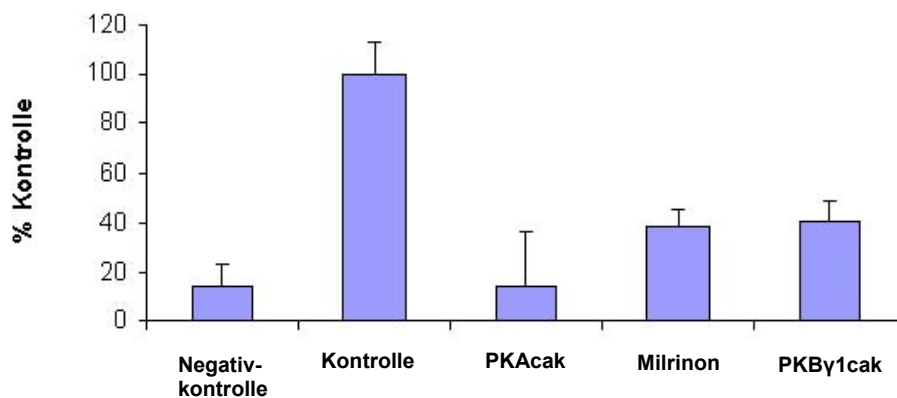


Abb. 27. FKHR-L-Luciferase Reporter in HEK-293-Zellen

Die in den PKBy1-transgenen Tieren beschriebene Hypertrophie ist mit Abstand die am stärksten ausgeprägte, die je in der Literatur beschrieben wurde. Die mögliche Beteiligung der Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Klasse wirft nun die Frage auf, ob durch dieses Hypertrophiemodell lediglich ein weiterer Beteiligter an dem bislang

recht unübersichtlichen Geschehen gefunden wurde, oder ob es sich hierbei möglicherweise um einen gemeinsamen Mechanismus zur Hypertrophieentwicklung in verschiedenen Modellen handelt. Auch von anderen Proteinkinasen, die der gleichen Familie wie PKB angehören, weiß man, dass ihre Aktivierung zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen kann. So führt  $\beta$ -adrenerge Stimulation und dadurch bewirkte Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) ebenfalls zu Hypertrophie und späterer Herzinsuffizienz (Lohse *et. Al.* 2003). Aus diesem Grund wurde ein Expressionsvektor, der für eine konstitutiv-aktive PKA-Mutante kodiert, mit dem FKHR-L-Reportermodell kotransfiziert. Dabei zeigte sich, dass sowohl die aktive PKA-Mutante, als auch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels durch den PDE-3-Inhibitor Milrinon in diesem Modell zu einer signifikanten Veränderung im Reportersignal führen (Abbildung 28).



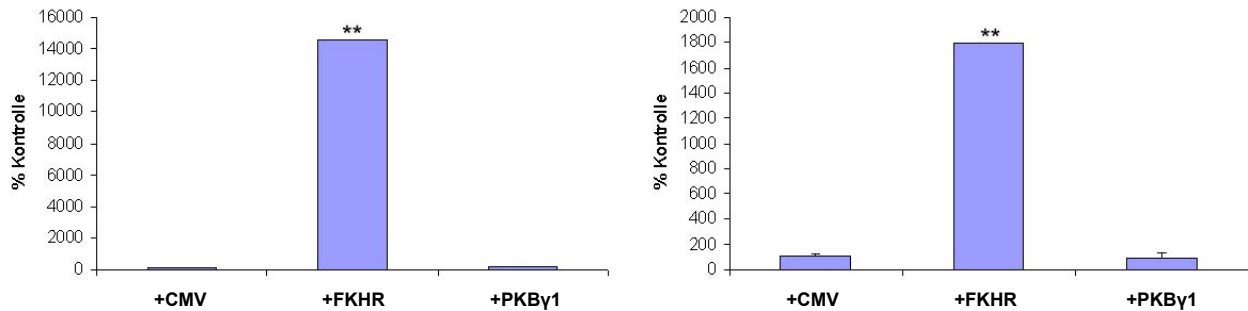
**Abb. 28. FKHR-L-Luciferase Reporter in HEK 293-Zellen**

Der PDE III-Inhibitor Milrinon, wie auch konstitutiv die aktiven Mutanten von PKA und PKB haben einen deutlichen Einfluss auf das Reportersignal.

### 3.1.5.2. Abschließende Untersuchungen zum Zellmodell

Die bis hierher vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass von den vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen, die Herzhypertrophie auslösen können, der PI3K/PKB-Weg über die Phosphorylierung der Forkhead-Transkriptionsfaktoren möglicherweise der wichtigste sein könnte. Die Tatsache, dass auch die cAMP-abhängige Proteinkinase in der Lage zu sein scheint, diese Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese als gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion verschiedener Hypertrophie-auslösender Ereignisse in Frage kommen. Um die Hypothese der zentralen Rolle der Forkhead-Transkriptions-

faktoren in dem vorliegenden transgenen Tiermodell zu überprüfen, wurde das FKHR-L-Expressionskonstrukt zusammen mit Luciferase-Reporterkonstrukten für zwei im Tiermodell regulierte Gene in HEK-293-Zellen koexprimiert. Dabei zeigte sich, dass diese Koexpression zu einem in beiden Fällen sehr starken Ansprechen des Reportersystems führte (Abbildung 29). Im Falle des ANF-Reporterkonstruktes war das Ansprechen deutlich stärker.

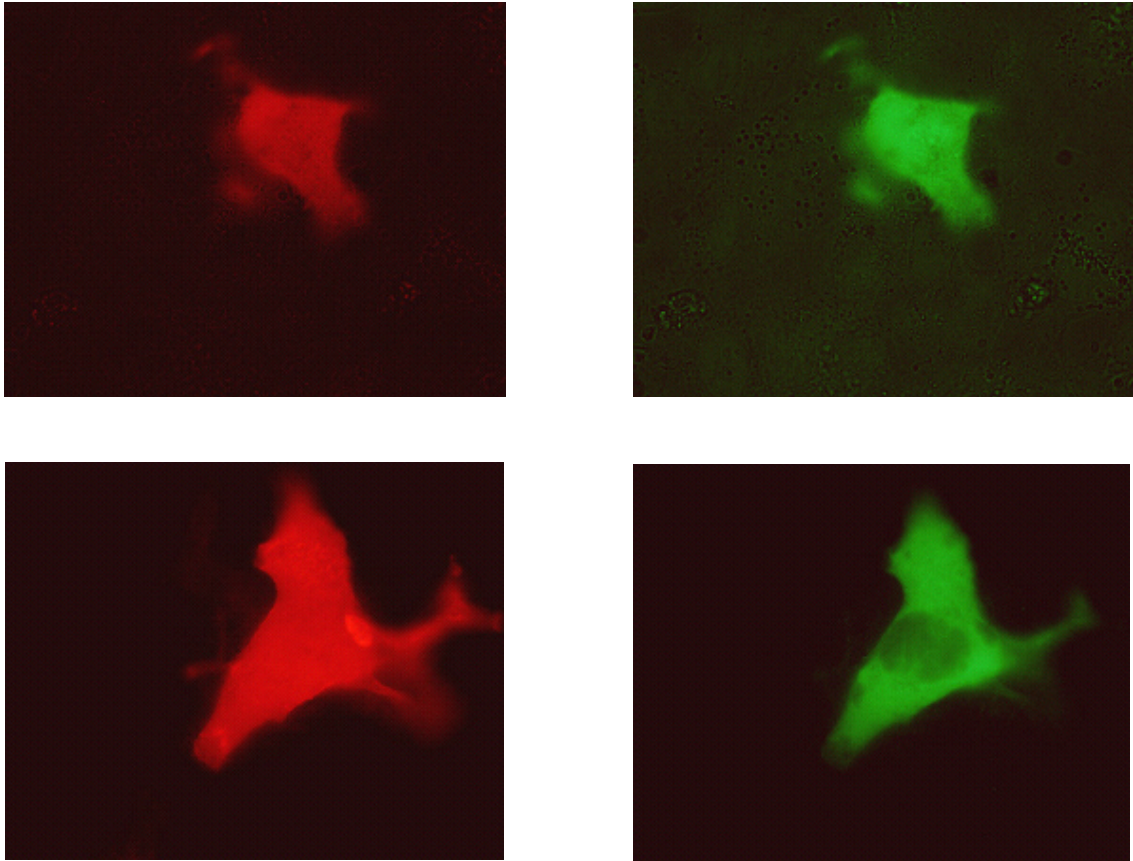


**Abb. 29. ANF-Luciferase-Reporter (links) und BNP-Luciferase-Reporter (rechts)**  
Beide Reportersysteme kotransfiziert mit Leervektor (CMV), FKHR-L und AKT-3cak.

Um dieses Phänomen erklären zu können, wurde eine erneute Promotoranalyse des ANF- und des BNP-Promotors durchgeführt, diesmal jedoch auf einer Länge von 3000 Basenpaaren. Dabei wurden auch im BNP-Promotor mögliche Bindungsstellen für Forkhead-Transkriptionsfaktoren gefunden, jedoch deutlich weniger als im ANF-Promotor und in größerer Distanz zum ersten Exon (Abbildung im Anhang). Dies könnte das deutlich stärkere Ansprechen des ANF-Reporterkonstruktes erklären

Die Frage, ob in diesem Modell PKBy1 tatsächlich Forkhead-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und zu deren Export aus dem Zellkern führt, wurde bis hierher noch nicht ausreichend untersucht. Dazu wurde der FKHR-L-Expressionsvektor mit einem für konstitutiv-aktive PKBy1 kodierenden Konstrukt auf der einen Seite und einer inaktivierten PKBy1-Mutante auf der anderen Seite kotransfiziert. Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung zeigen deutlich, dass der überexprimierte Transkriptionsfaktor bei Koexpression der Totmutante in der ganzen Zelle, also auch im Kern, gleichmäßig verteilt vorliegt. Wird er jedoch mit der konstitutiv-aktiven PKBy1-Mutante koexprimiert, beschränkt sich die Verteilung aufs Zytosol (Abbildung 30). Durch die hohe Transfektionseffizienz und die daraus resultierende sehr starke Expression der Fremdproteine in diesem Zelltyp kann man die Membranlokalisierung des Transgens auf diesem Bild nicht erkennen.





**Abb. 30. Expression von PKBy1-Mutanten und FKHR-L in HepG2-Zellen**

Obere Reihe: Expression einer PKBy1-HA-Totmutante. Untere Reihe: Expression einer konstitutiv-aktiven PKBy1-HA-Mutante Immunfluoreszenzfärbung gegen Hämagglutinin (rot) und FKHR-L (grün). Bei aktivierter PKBy1 wird FKHR-L aus dem Kern transloziert.

### 3.2. Differentielle Genexpression in $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten

#### 3.2.1. Das Modell der $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten

Am Modellsystem isolierter Kardiomyozyten neonataler Ratten kann man Hypertrophiereaktionen durch eine Vielzahl extrazellulärer Signalmoleküle hervorrufen. Diese Signalmoleküle (Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Zytokine, etc.) binden an spezifische, membranständige Rezeptoren, die unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Es gibt drei große Rezeptorfamilien, die an Kardiomyozyten eine Hypertrophieantwort induzieren können: Zytokinrezeptoren und Tyrosinkinaserzeptoren, wie z.B. der Insulin-like-growth-factor-I-Rezeptor, und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor. Die von diesen Rezeptorfamilien aktivierten Signalkaskaden münden teilweise in eine gemeinsame Endstrecke bei der Stimulation transkriptionaler und translationaler Vorgänge (Olson und Frey, 2003).

Um die komplizierten systemischen und hämodynamischen Interaktionen *in vivo* zu umgehen, wurden bereits in der Vergangenheit Zellkulturmodelle mit isolierten Kardiomyozyten entwickelt (Simpson & Savion, 1982). Diese erlauben es, neurohumorale Faktoren unabhängig von deren hämodynamischen Eigenschaften in Bezug auf ihre Hypertrophie-induzierende Wirkung zu untersuchen. Solche Zellkulturmodelle haben zudem den Vorteil, dass die Zellen von definierten Kulturmedien und Wirkstoffkonzentrationen umgeben sind. Außerdem kann eine etwaige Hypertrophieantwort direkt dem kultivierten Zelltyp zugeordnet werden.

Nach einem Hypertrophiestimulus erfolgt eine Größenzunahme der Kardiomyozyten. Das Verhältnis von Proteinsynthese und Proteindegradation ist zugunsten der Synthese verschoben. Neben der Größenzunahme der Kardiomyozyten (Simpson, 1983) kann die Hypertrophie in Zellkulturmodellen deshalb auch durch andere Parameter definiert werden, die jedoch nicht notwendigerweise gleichzeitig auftreten:

1. Zunahme des zellulären Gesamtproteingehaltes (Simpson, 1983; Waspe *et al.*, 1990)
2. Zunahme des myofibrillären Protein-Kompartiments (Waspe *et al.*, 1990)
3. Zunahme der Proteinsyntheserate (Meidell *et al.*, 1986)

4. Erhöhung des zellulären RNA-Gehaltes, der sich zu über 85% aus ribosomaler RNA zusammensetzt und damit ein Maß für die Translationskapazität isolierter Kardiomyozyten ist (Waspé *et al.*, 1990).
5. Die Reexpression fötaler Proteinisoformen, wie  $\alpha$ -Aktin (Long *et al.*, 1989) oder der  $\beta$ -Isoform der schweren Myosinketten (Waspé *et al.*, 1990).
6. Die verstärkte Expression der nukleären Protoonkogene c-Myc, c-Fos, c-Jun und EGR-1 (Iwaki *et al.*, 1990)

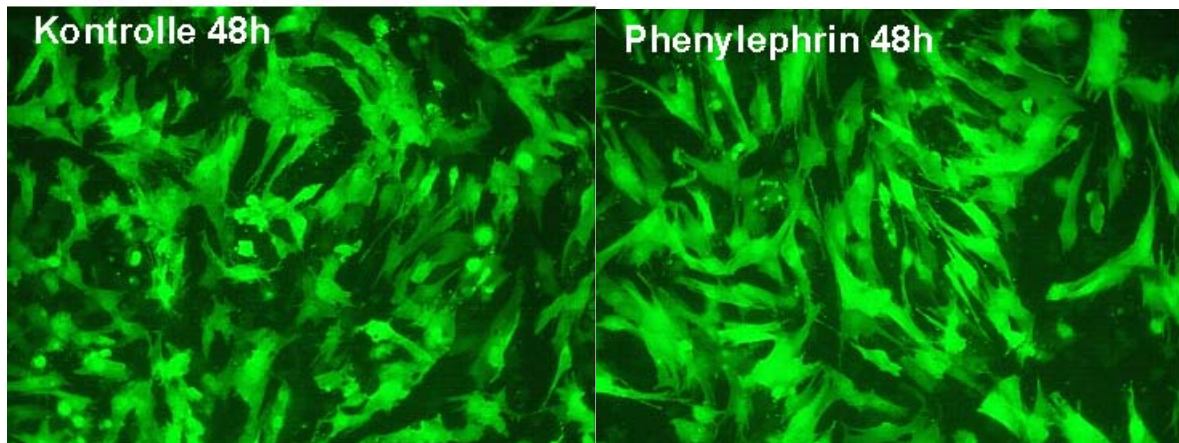
Anhand von Zellkulturmodellen isolierter Kardiomyozyten neonataler und adulter Ratten konnte direkt gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation zu einer Hypertrophieinduktion führt (Simson, 1983; Meidell *et al.*, 1986). Diese wird dann ausschließlich über  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermittelt (Simpson, 1983). Die Existenz des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Subtyps konnte an isolierten Kardiomyozyten dagegen nicht nachgewiesen werden (Buxton & Brunton, 1985). Nach einem  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus treten neben einer Vergrößerung der Kardiomyozyten eine erhöhte Proteinsyntheserate und ein erhöhter zellulärer Protein- und RNA-Gehalt auf.

In der Literatur lassen sich sehr viele Untersuchungen zum Thema Hypertrophie an diesem Modell finden (Long *et al.* 1989; Waspé *et al.* 1990). Allen gemeinsam ist, dass niemand bislang erklären konnte, wie genau die Signaltransduktion in den Kern funktioniert und welcher der vielen involvierten Faktoren für die spätere Hypertrophieentwicklung verantwortlich ist. Verschiedene Gene wurden als induzierbare Marker für Hypertrophie diskutiert, jedoch herrscht hier außer bei ANF, BNP und  $\beta$ -MHC weiter große Unsicherheit. Ein wünschenswertes Ergebnis der weiteren Arbeit wäre deshalb, neue Markergene für Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz zu finden. Aus diesem Grund wurde ein möglichst unvoreingenommener Ansatz zur Untersuchung gewählt. Isolierte neonatale Kardiomyozyten sollten nach sechsstündiger Stimulation mit entweder 10  $\mu$ M Phenylephrin oder Noradrenalin in Kombination mit dem  $\beta$ -Blocker Atenolol mit Hilfe von cDNA-MicroArrays auf differentiell exprimierte Gene untersucht werden.

### **3.2.1.1. Etablierung des Zellmodells**

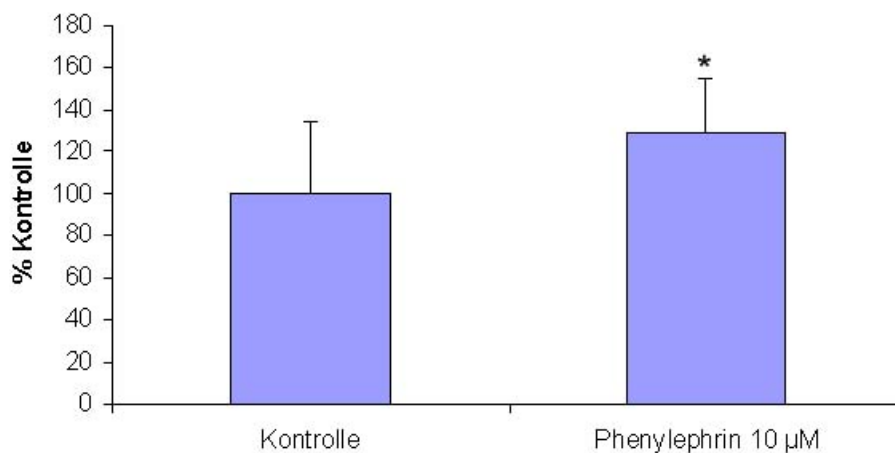
Um den experimentellen Ansatz zu validieren, wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt. Kulturen neonataler Kardiomyozyten wurden adenoviral mit einem GFP-Expressionsvektor infiziert. 12 h nach der Infektion wurden die Zellen für 24 h

in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit 10  $\mu$ M Phenylephrin stimuliert. Nach 48 h Stimulation ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Vergrößerung der Zellen feststellen (Abbildung 31). Durch die GFP-Expression ließen sich die Zellflächen mit Hilfe der zur Kamera gehörenden Software leicht messen. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Zellfläche zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen (Abbildung 32).



**Abb. 31. Stimulation neonataler Kardiomyozyten mit Phenylephrin**

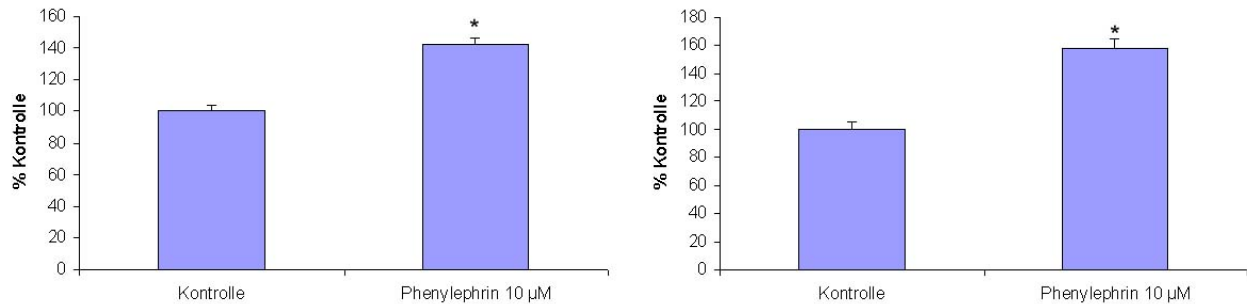
Adenoviral mit einem GFP-Expressionsvektor infizierte Zellen wurden 48h mit Phenylephrin stimuliert. Zur Flächenmessung wurde die Image-Pro-Plus-Software von Media Cybernetics L.P. bei 40-facher Vergrößerung verwendet.



**Abb. 32. Zelloberflächenmessung von neonatalen Kardiomyozyten.**

In beiden Fällen wurden 85 Zellen gemessen \*  $p < 0,05$

Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Protein- und RNA-Syntheserate in den kultivierten Kardiomyozyten durchgeführt. Mit Hilfe des Einbaus  $^{14}\text{C}$ -markierten Leucins und Uracils nach 48 h Kultivierung mit Phenylephrin ließ sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und behandelter Probe feststellen (Abbildung 33).



**Abb. 33.  $^{14}\text{C}$ -Leucin- und  $^{14}\text{C}$ -Uridin-Aufnahme von neonatalen Kardiomyozyten**

Neonatale Kardiomyozyten wurden in Medium, das radioaktiv markierte Aminosäuren oder Nukleotide enthielt, kultiviert. Nach 48 h war eine deutliche Zunahme der Protein- bzw. RNA-Synthese in den mit Phenylephrin stimulierten Zellen festzustellen ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2. Vergleichende Genexpressionsanalyse in $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten

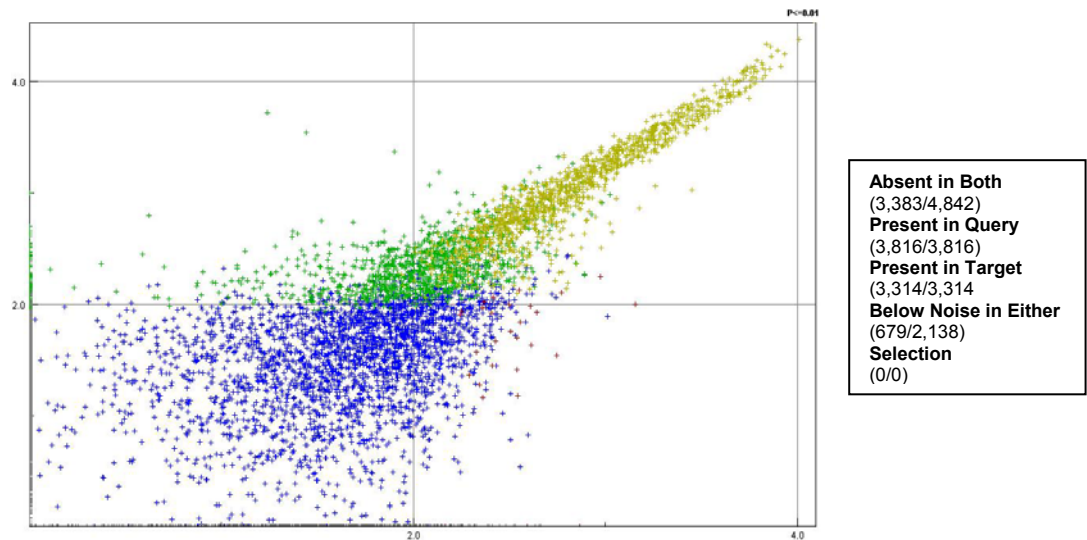
Zur Genexpressionsanalyse wurden die 6 h in Kultur gehaltenen Zellen geerntet und die mRNA isoliert. Nach dem „*standard-one-round amplification protocol*“ wurde die RNA in biotinylierte *antisense*-RNA umgeschrieben und mit den *RG\_U34A*-DNA-Microchips (Fa. Affymetrix), die ca. 20.000 Gene enthalten, hybridisiert.

Für die Hybridisierung behandelter und Kontroll-cDNA wurden je zwei DNA-Microchips verwendet. Die erhaltenen Datensätze von behandelten und Kontroll-Zellen wurden anschließend miteinander verglichen und Differenzen aus den Signalintensitäten gebildet. Gene, die differentiell in behandelten Zellen vorkommen (die stärker oder ausschließlich in diesen Zellen exprimiert werden), werden bezüglich der Kontrollzellen als hochreguliert bezeichnet.

#### 3.2.2.1. Qualitätskontrolle der erhaltenen Hybridisierungsdaten

Die so erhaltenen Datensätze wurden ebenfalls zunächst auf ihre Qualität geprüft. Dazu wurden die Intensitätsdaten jedes Chips gegen die gleichen Daten eines anderen Chips derselben Gruppe aufgetragen. Bei gleicher Anzahl an detektierten Genen und gleicher Signalstärke sollte dabei im Idealfall der Scatter-Plot (Abbildung 34) eine Gerade mit der Steigung 1 ergeben. Blaue Datenpunkte repräsentieren

dabei Gene, die wegen zu geringer Intensität nicht detektiert werden können, rote bzw. grüne Datenpunkte repräsentieren die auf dem einen (Query) bzw. anderen (Target) Chip detektierten Gene. Gene, die gleichermaßen auf beiden Chips detektiert wurden, sind gelb dargestellt.



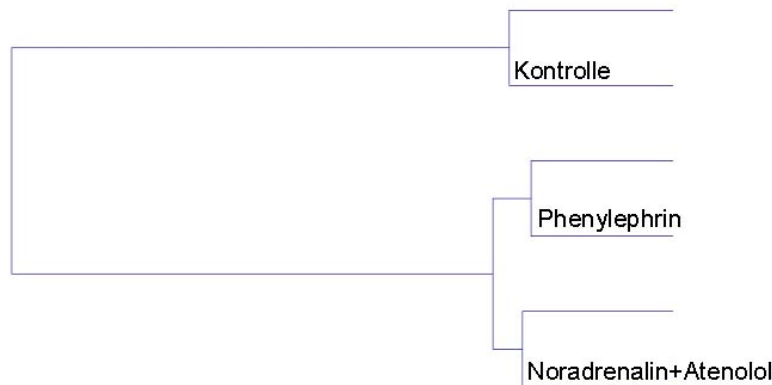
**Abb. 34. Scatterplot der Intensitätssignale zweier cDNA-Microarrays**

Blaue Datenpunkte repräsentieren Gene, die zu schwach exprimiert sind, um detektiert zu werden, rote bzw. grüne Punkte die Gene, die nur in einem Chip detektiert wurden, gelbe Datenpunkte die in beiden Chips detektierten Gene

Bei keinem der hybridisierten MicroArrays ließen sich auf diesem Wege Qualitätsmängel feststellen.

Auch bei diesem Experiment wurde zur Bestimmung differentiell exprimierter Gene und zur Qualitätskontrolle der Chipdaten das hierarchische Clustern nach dem „Complete-Linkage“-Verfahren verwendet.

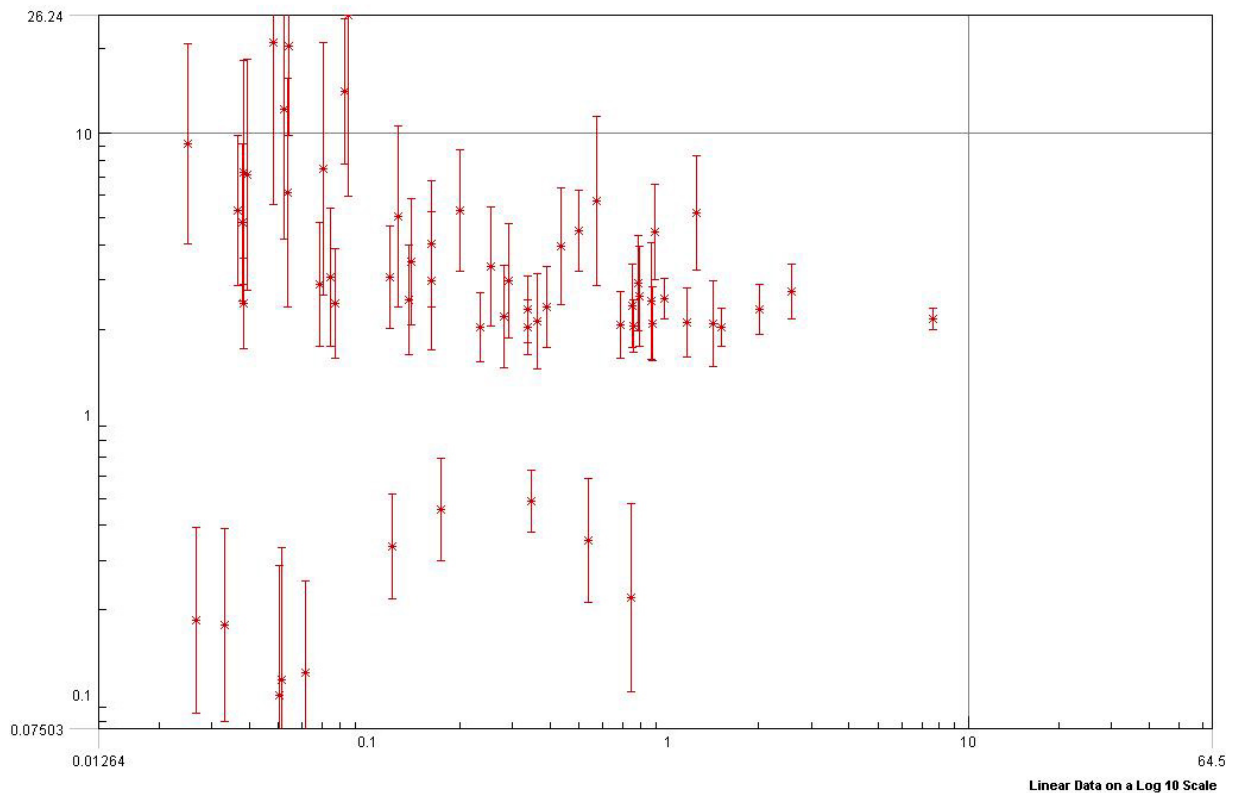
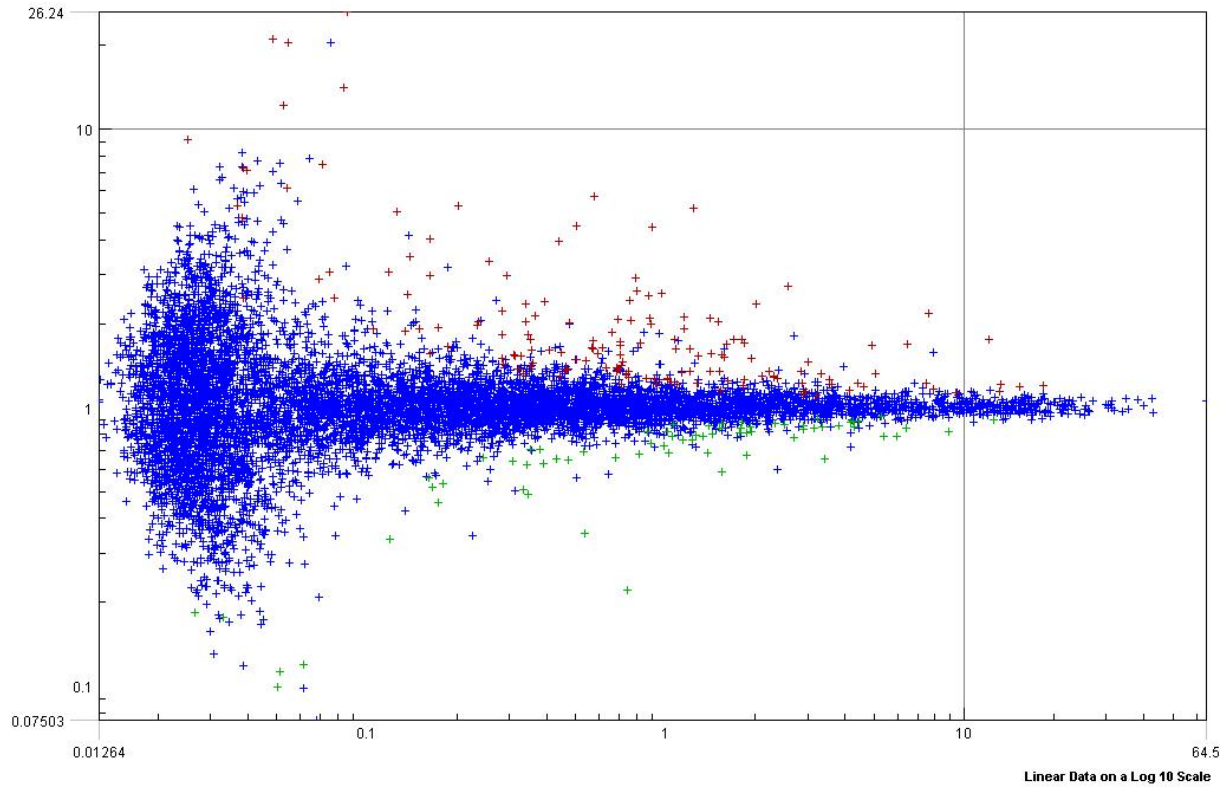
Die Dendrogramme der hybridisierten Microarray-Daten zeigten klar voneinander getrennte Gruppen, die sich den Proben von Phenylephrin-behandelten bzw. Noradrenalin+Atenolol-behandelten sowie Kontroll-RNA zuordnen ließen. Erwartungsgemäß lagen beide behandelte Gruppen deutlich näher beieinander als an den Kontrollproben, da in beiden Fällen ausschließlich  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation erwartet wird (Abbildung 35).



**Abb. 35. Dendrogramme der „geclusterten“ Chipintensitätsdaten.**  
Sowohl für die mit Phenylephrin behandelten als auch für die mit Noradrenalin und Atenolol behandelten Proben wurden die einzelnen Intensitätsdaten im Dendrogramm klar einer von beiden Gruppen zugeordnet.

### 3.2.2.2. Identifikation der regulierten Gene

Zur eigentlichen Genexpressionsanalyse werden die Intensitätsdaten der behandelten Proben mit denen der Kontroll - Proben verglichen. In Abbildung 36 oben dargestellt sind die Datenpunkte für alle auf dem Chip befindlichen Gene. Blau markiert sind die Gene, die von der Software als nicht reguliert („unchanged“) klassifiziert werden, rot steht für die induzierten („upregulated“), grün für die unterdrückten („downregulated“) Gene. In Abbildung 36 unten sind die als reguliert identifizierten Gene nach dem Anlegen von Filterkriterien gezeigt. Als statistisch und biologisch relevant wurden für dieses Experiment die Gene definiert, deren Expression sich  $\geq 1,6$ -fach nach oben oder unten veränderte und deren p-wert  $\leq 0,05$  war. Auf der X-Achse ist die logarithmierte Intensität der Datenpunkte dargestellt, auf der Y-Achse das logarithmierte Expressionsverhältnis von phenylephrin-behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle. Hochregulierte Gene sind demnach auf einem Y-Achsenabschnitt  $>0,2$  zu finden, unterdrückte Gene auf einem Y-Achsenabschnitt  $\leq 0,2$ . Bei der Auswahl der Filterkriterien ist anzumerken, dass hier die geringste, statistisch noch sinnvolle Stringenz gewählt wurde, um eine nennenswerte Genregulation sichtbar zu machen.



**Abb. 36. In mit Phenylephrin behandelten Kardiomyozyten als reguliert identifizierte Gene.**

Im oberen Schaubild sind die im Ganzen als differentiell exprimiert erkannten Gene zu sehen. Induzierte Gene sind rot dargestellt, herunterregulierte als grüne Datenpunkte.

Im unteren Schaubild sind die nach dem Anlegen von Filterkriterien (Expressionsänderung  $\geq \pm 1,5$ -fach,  $p \leq 0,05$ ) als reguliert erkannten Gene dargestellt.



In Tabelle 9 sind die als differenziell reguliert identifizierten Gene zusammengefasst. Bei der Auswertung zeigte sich, dass sowohl über 95% der in beiden Experimenten regulierten Gene identisch waren, als auch das Ausmaß der Regulation. Nur die Gene, die in beiden Ansätzen als signifikant reguliert erkannt wurden, wurden in die Auswertung mit aufgenommen. Insgesamt zeigten sich 69 Gene als induziert und lediglich 5 Gene als unterdrückt. In beiden Fällen lag die Expressionsänderung entweder deutlich über 5-fach oder dicht am unteren Rand der Filterkriterien (1,5-3-fach).

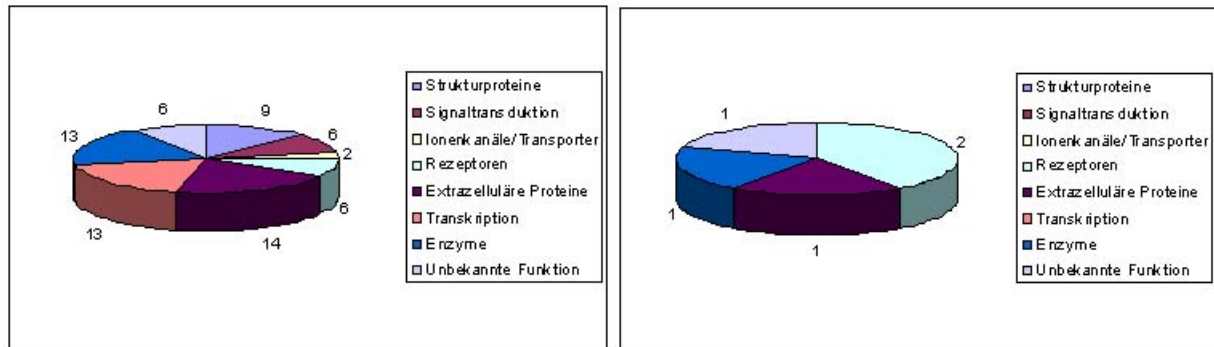
**Tab. 9. In mit Phenylephrin oder Noradrenalin+Atenolol behandelten Kardiomyozyten differenziell exprimierte Gene**

<b>Induzierte Gene</b>	<b>69</b>
> 5-fach	20
< 5-fach & > 3-fach	13
< 3-fach & > 1,5-fach	36
<b>Unterdrückte Gene</b>	<b>5</b>
> 5-fach	2
< 5-fach & > 3-fach	0
< 3-fach & > 1,5-fach	3

Eine vollständige Liste der in den beiden Experimenten regulierten Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### 3.2.2.3. Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen

Auch bei dieser Auswertung wurden die differentiell exprimierten Gene nach der Funktion der durch sie kodierten Proteine einzelnen Gruppen zugeordnet (Abbildung 37).



**Abb. 37. Zuordnung der differentiell exprimierten Gene nach der Funktion der von ihnen kodierten Proteine.**

### 3.2.2.4. Validierung der Expressionsdaten

Zur Validierung der Chipdaten-Auswertung wurde erneut für eine Reihe von regulierten Genen ein quantitativer Real-Time-PCR-Assay etabliert. Dies gelang für 5 regulierte Gene. Insgesamt war deren Expressionsänderung laut PCR größtenteils mit den Chipdaten vergleichbar (Tabelle 10). Auffällig war hier das qRT-PCR-Ergebnis für Interleukin-6 (IL-6). IL-6 tauchte in den Chipdaten mit 20-facher Überexpression als eines der am stärksten induzierten Gene auf. Den PCR-Daten zu Folge war die Induktion sogar noch weit stärker (beinahe 80-fach). Eine Liste der für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotidsequenzen befindet sich im Kapitel 2.15. dieser Arbeit.

**Tab. 10. Durch quantitative Real-Time-PCR bestimmte Genexpressionsänderungen**

GB Acc.	Gen	-fache Veränderung
U75397	Early Growth Response 1 (EGR-1)	+5,4
U78102	Early Growth Response 2 (EGR-2)	+2,4
M26745	Interleukin 6 (IL-6)	+78,8
X06769	c-fos	+4,4
X17163	c-jun	+7,0

### 3.2.2.5. Untersuchung der differentiell exprimierten Gene durch eine „in silico“-Promotoranalyse

Die als differentiell exprimiert aufgefallenen Gene unterscheiden sich bis auf die bekannten Marker (ANF, BNP,  $\beta$ -MHC) stark von den im transgenen Tiermodell regulierten Genen. Auf Grund der differentiell exprimierten Gene lässt sich auch hier nicht ohne weiteres auf einen einzigen Signaltransduktionsweg schließen, der für die Hypertrophieentwicklung verantwortlich sein könnte.

Erneut wurden die Promotoren der am stärksten regulierten und der für Hypertrophie als relevant bekannten regulierten Gene näher untersucht (s. 3.1.4.7.). Da der cAMP-abhängige Transkriptionsfaktor CREM (cAMP Responsive Element Modulator) zu den im Zellmodell am stärksten regulierten Genen gehörte, wurden die Transkriptionskofaktoren der cAMP-Responsive Element Binding Proteins (CEBP) und der Ccaat/Enhancer Binding Protein (CBP)-Klasse mit in die Untersuchung einbezogen.

Die Transkriptionsfaktorfamilien, für die die einzelnen Promotoren untersucht wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. Transkriptionsfaktoren, auf deren mögliche Bindungsstellen die in neonatalen Kardiomyozyten regulierten Gene untersucht wurden.**

<b>Transkriptionsfaktor</b>	<b>Erläuterung</b>
AP-1	Activator Protein A1
EGRF	EGR/nerve growth Factor Induced protein C & verwandte Transkriptionsfaktoren.
CREB	Camp-Responsive Element-bindende Proteine
CEBP	Ccaat/Enhancer-bindende Proteine
GATA	GATA-bindende Faktoren
LHXF	LIM-Domänen bindende Faktoren
MEF2	Myocyte-specific enhancer binding-Transkriptionsfaktoren
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
NFKB	Nuclear Factor $\kappa$ -B-Transkriptionsfaktoren + c-Rel
NKXH	NKX/DLX-Homöodomänen bindende Faktoren
STAT	Signal transducer and activator of transcription-Faktoren

Die Promotoranalyse ergab eine starke Häufung von möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der CREB- und EGR-Familie. Die ausführliche Promotoranalyse befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### **3.2.3. Weitere Untersuchungen zur Signaltransduktion $\alpha_1$ -adrenerg stimulierter Kardiomyozyten**

Neuere Publikationen deuten darauf hin, dass durch  $\alpha$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten sehr verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden (Lazou *et al.* 1998; de Windt *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurde versucht, die Phenylephrin-induzierte Signaltransduktion mit Hilfe des  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Einbaus, der transienten Transfektion eines BNP-Luciferase-Reporterkonstruktes und verschiedenen pharmakologisch wirksamen Substanzen näher zu charakterisieren. Dazu wurden frisch isolierte neonatale Kardiomyozyten entweder durch Elektroporation mit einem BNP-Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert oder in Scintillatorplatten ausgesät, 12 h in serumfreiem Medium kultiviert, 30 min. mit pharmakologisch wirksamen Substanzen vorinkubiert und anschließend mit Phenylephrin behandelt.

#### **3.2.3.1. Untersuchung des Calcineurin-NFAT-Signalübertragungsweges**

Die Ergebnisse der Untersuchung des Calcineurin-NFAT-Signalübertragungsweges sind in Abb. 38 & 39 dargestellt. Die Leucin-Inkorporation als Maß für die Proteinsyntheserate bzw. das Luciferase-Signal als Marker der BNP-Expression wurden für die Kontrollen auf 100% festgesetzt und die übrigen Ergebnisse darauf normalisiert.

Einige Forschungsergebnisse deuten daraufhin, dass die als antihypertroph bekannte Wirkung von NO durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und die cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I) vermittelt wird (Scherrer-Crosbie *et al.* 2001). Weitere Publikationen konnten zeigen, dass die cGMP/PKG-I-vermittelte Signaltransduktion intrazelluläre Calciumspiegel und darüber die Calcium-aktivierte Phosphatase Calcineurin beeinflusst (Schroder *et al.* 2003; Fiedler *et al.* 2003). Deshalb wurde für diese Experimente neben dem direkten Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A, ein Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (HMR 1766) und ein Phosphodiesterase-III (PDE-III)-Inhibitor (Milrinon) zur Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels verwendet. Dazu ist anzumerken, dass Milrinon als Kontrolle hier nur in Zusammenhang mit den anderen Substanzen sinnvoll eingesetzt werden kann, da eine Inhibition der PDE III den cAMP-Spiegel deutlich stärker erhöht als den cGMP-Spiegel. Zur direkten Beeinflussung der PKG I wurden jeweils ein selektiver Aktivator (8-cpt-cGMP) und ein Inhibitor (RP-8-cpt-cGMP) eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass sich die Phenylephrin-induzierte Steigerung der Proteinsynthese am besten durch Cyclosporin A und den sGC-Aktivator HMR 1766 inhibieren lässt. Auch der PKG-

Aktivator 8-cpt-cGMP und der PDE-III-Hemmer Milrinon zeigten beide einen deutlichen Effekt, erbrachten jedoch keine vollständige Inhibition.

Dieses Resultat konnte mit einem BNP-Luciferase-Reporterassay im wesentlichen bestätigt werden. Jedoch zeigte hier Milrinon die stärkste Wirkung, der PKG-Aktivator und HMR 1766 lagen dicht dahinter, während bei Cyclosporin A eine schwache, aber noch signifikante Wirkung zu beobachten war.

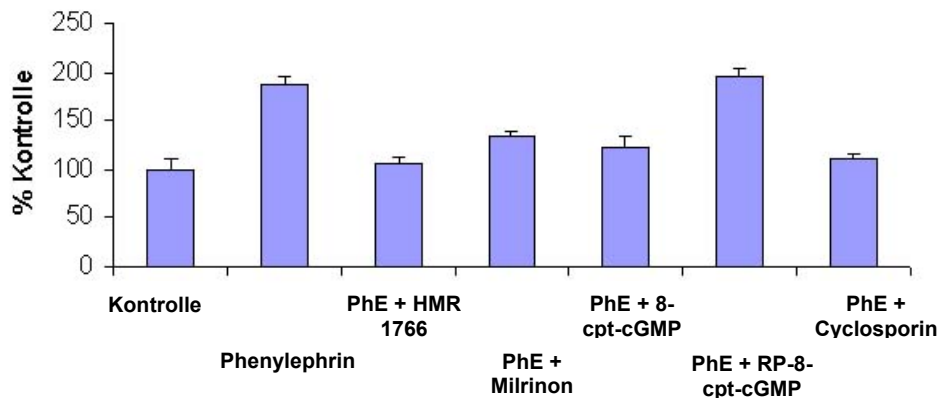


Abb. 38. <sup>14</sup>C-Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

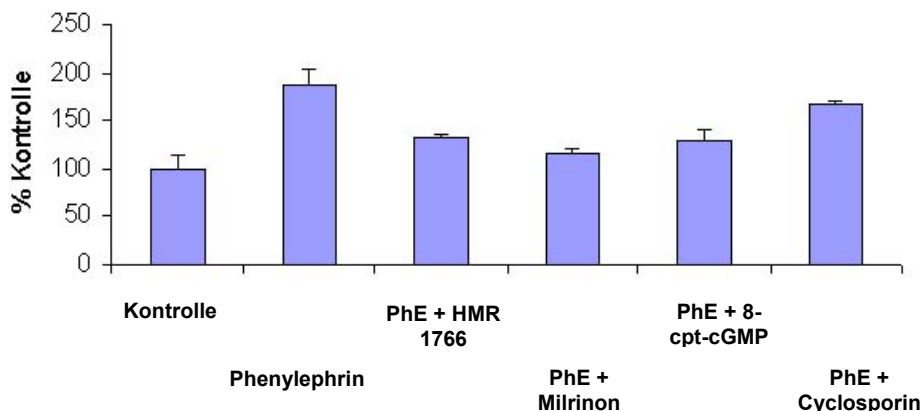


Abb. 39. BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

### 3.2.3.2. Untersuchung des PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signalübertragungsweges

Zur Untersuchung des PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signalübertragungsweges wurden ein PI3K-Inhibitor (LY294002), ein PKB-Inhibitor (AKT-Inhibitor III, Calbiochem), ein mTor-Inhibitor (Rapamycin) und ein GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (A003128634) verwendet. Die durch Phenylephrin induzierte verstärkte Proteinsynthese ließ sich dabei am stärksten durch Behandlung mit Rapamycin und dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor verhindern. Der PI3K-Inhibitor und der PKB-Inhibitor zeigten beide eine deutlich schwächere

Wirkung (Abbildung 40). Im BNP-Luciferase-Reporterassay hatten nur der PI3K-Inhibitor und Rapamycin einen relativ schwachen Effekt (Abbildung 41).

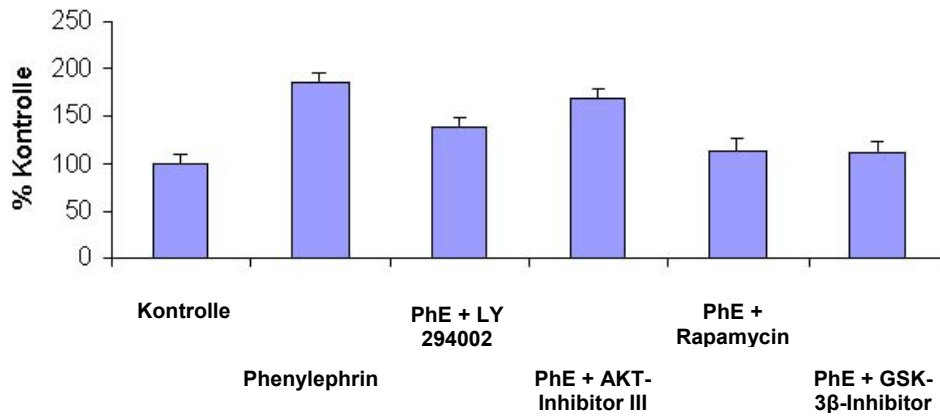


Abb. 40. <sup>14</sup>C-Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

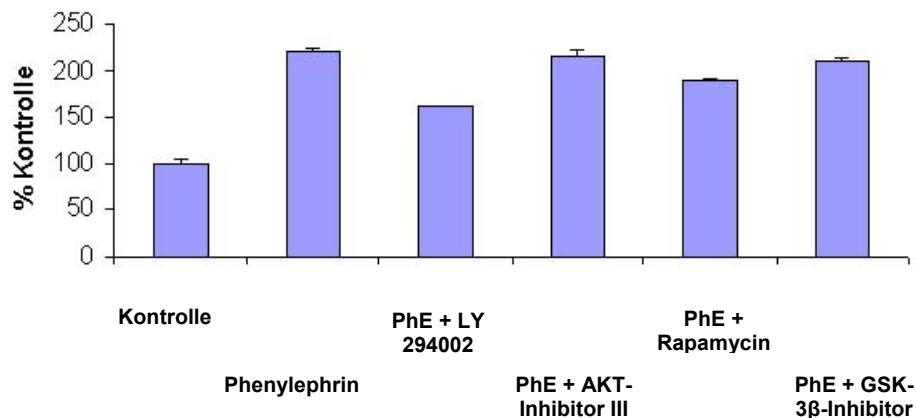


Abb. 41. BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

### 3.2.3.3. Untersuchung der Signalübertragung durch „kleine“ GTP-bindende Proteine

Zur Untersuchung der Signalübertragung durch „kleine“ GTP-bindende Proteine stand nur eine Substanz, der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632, zur Verfügung, welcher in beiden experimentellen Ansätzen eine vergleichbare Abschwächung des Signals zeigte (Abbildungen 42 und 43).

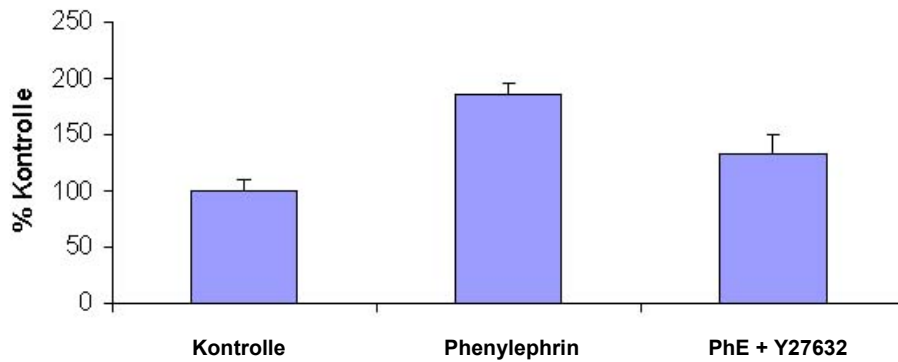


Abb. 42. <sup>14</sup>C-Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

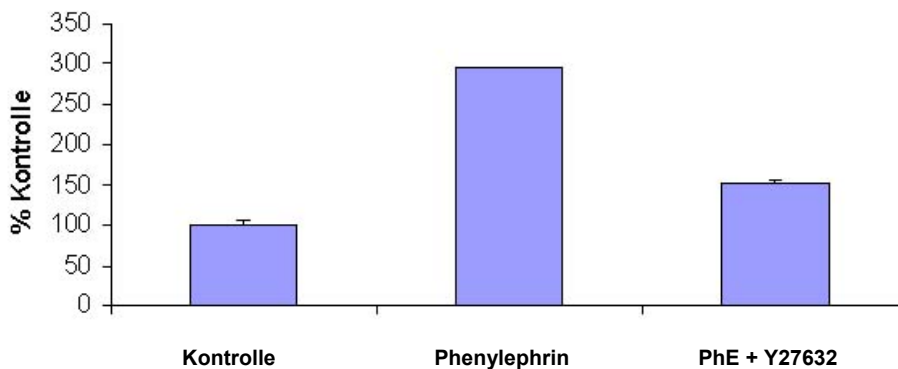


Abb. 43. BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

#### 3.2.3.4. Untersuchungen zum MAP-Kinasen-Signalübertragungsweg

Die Untersuchung der Rolle der MAP-Kinasen erfolgte mit einem JNK- (RPR202351) und einem p38MAPK-Inhibitor (SB203580). Während der JNK-Inhibitor keine Wirkung zeigte, konnte der p38MAPK-Inhibitor sowohl den Phenylephrin-induzierten Anstieg der Proteinsyntheserate als auch das BNP-Luciferase-Reportersignal fast bis auf Kontrollniveau abschwächen (Abbildungen 44 und 45).

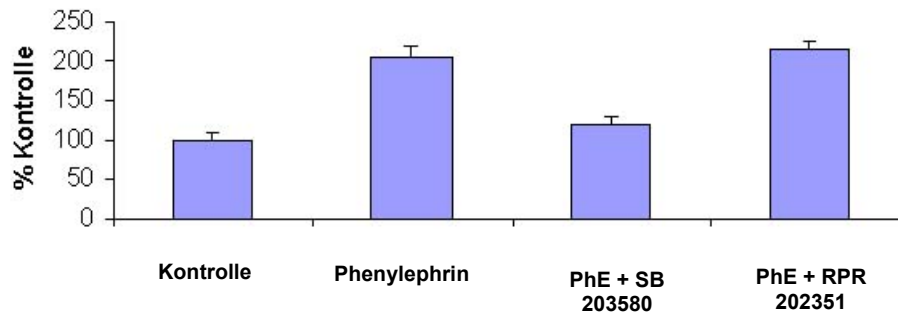


Abb. 44. <sup>14</sup>C-Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

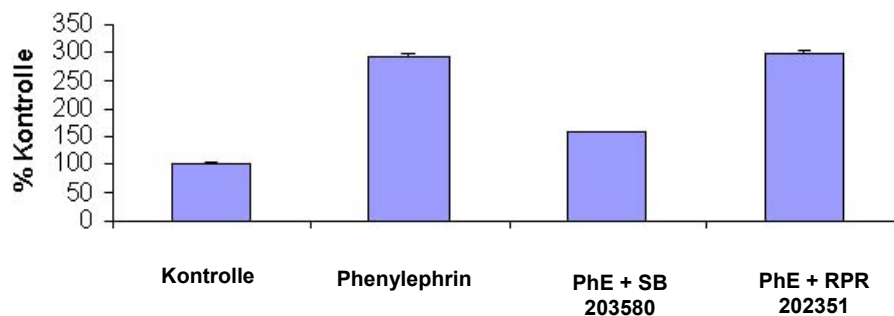


Abb. 45. BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

### 3.2.3.5. Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C

Zur Untersuchung der Rolle der Proteinkinase C (PKC) in der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie standen der unselektive PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIS I) und der selektive PKC- $\beta$ -Inhibitor LY333531 zur Verfügung. Durch beide Substanzen konnte das durch Phenylephrin-Stimulation ausgelöste Signal fast bis auf Kontrollniveau gesenkt werden. Dabei zeigte sich, dass der PKC- $\beta$ -Inhibitor bei gleicher Konzentration eine stärkere Wirkung hatte (Abbildungen 46 und 47). Als Kontrollexperiment wurde die PKC in beiden Assays direkt mit dem Phorbol-ester Phorbol-12,13-Dibutyrate (PDBU) stimuliert, was allein bereits zu einer verstärkten Aufnahme radioaktiv markierten Leucins führte. Durch Behandlung mit den PKC-Inhibitoren ließ sich dieses Signal vollständig inhibieren (Abbildung 48). Die BNP-Induktion scheint jedoch PKC-unabhängig zu sein, da es im BNP-Luciferase-Assay nicht gelang, durch PDBU-Stimulation ein nennenswertes Signal zu generieren.



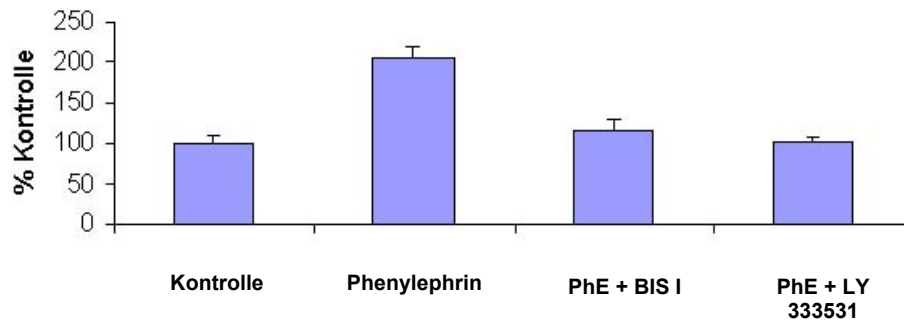


Abb. 46.  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

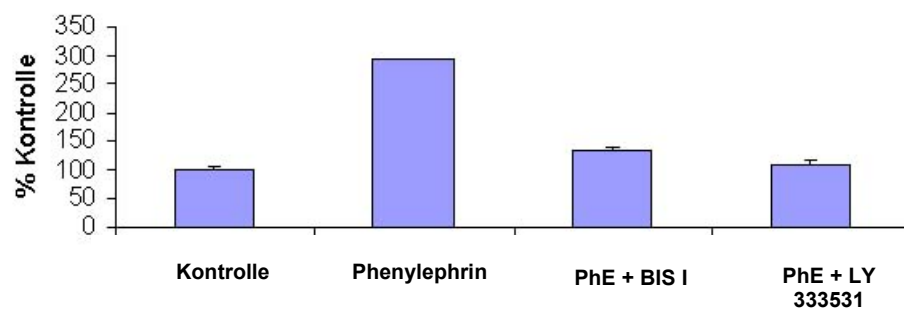


Abb. 47. BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

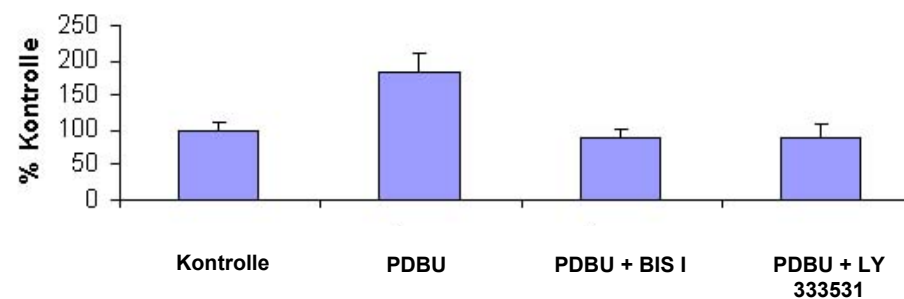
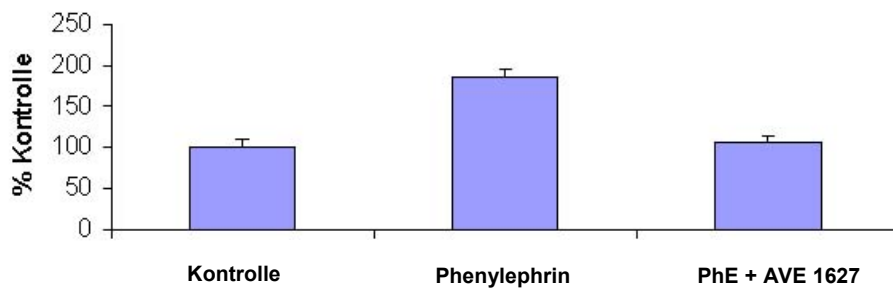


Abb. 48.  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Aufnahme in mit PDBU stimulierten Kardiomyozyten

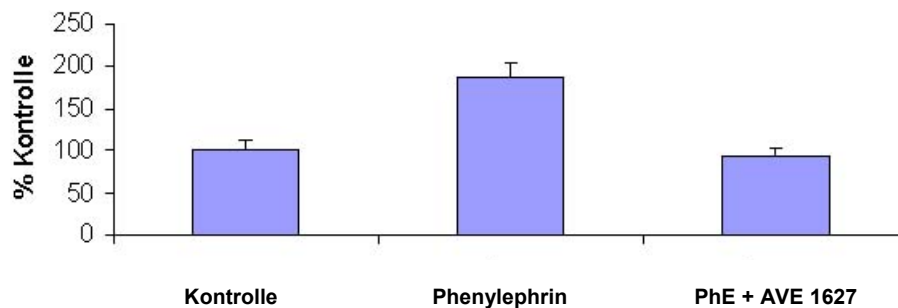
### 3.2.3.6. Untersuchungen zur Rolle von NFκB

Cook *et al.* (2003) publizierten während der Anfertigung dieser Arbeit Daten, die darauf schließen lassen, dass die Inhibition von NFκB *in vivo* eine Hypertrophieantwort durch Aorten-Ligatur verhindert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des IκB-Inhibitors AVE1627 auf beide Assays getestet. Hier zeigte sich die bislang stärkste Inhibition des durch Stimulation mit Phenylephrin ausgelösten Signals (Abbildungen 49 und 50). Eine Koftransfektion des Reporterkonstruktes mit einem für

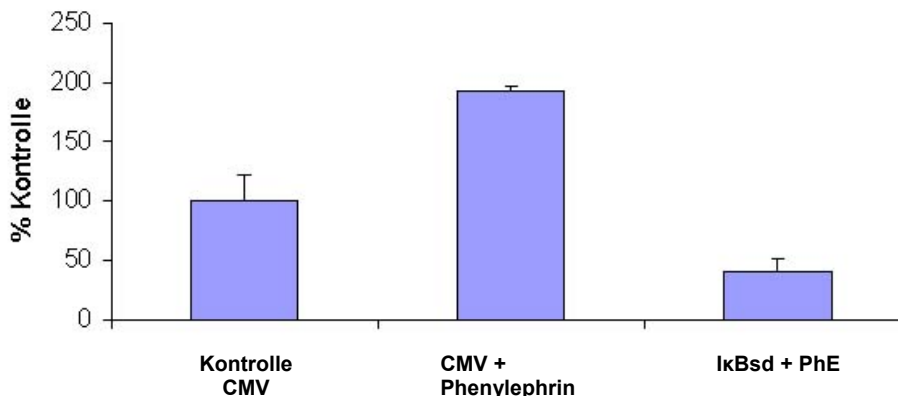
IkB kodierenden Plasmid ergab eine vollständige Inhibition des durch Phenylephrin ausgelösten Signals (Abbildung 51).



**Abb. 49.** <sup>14</sup>C-Leucin-Aufnahme in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten



**Abb. 50.** BNP-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten



**Abb. 51.** BNP-Luciferase-Reporter in mit verschiedenen Expressionsvektoren kotransfizierten und stimulierten Kardiomyozyten

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Aktivierung von NFκB mit Hilfe der transienten Transfektion mit einem spezifischen Luciferase-Reporterkonstrukt näher untersucht. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation mit PDBU, als auch mit Interleukin-1β ein starkes Reportersignal induzierte, welches im Falle von PDBU mit dem PKC-Inhibitor BIS I, in beiden Fällen durch Kotransfektion mit IkB unterdrückt werden konnte (Abbildungen 52 und 53).

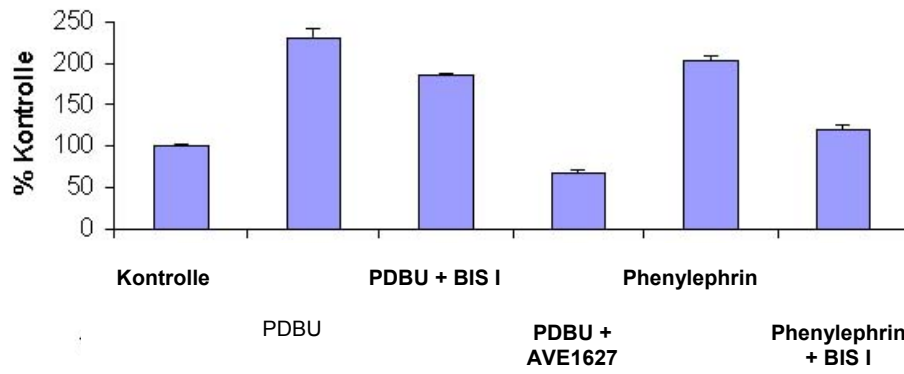


Abb. 52. NFκB-Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

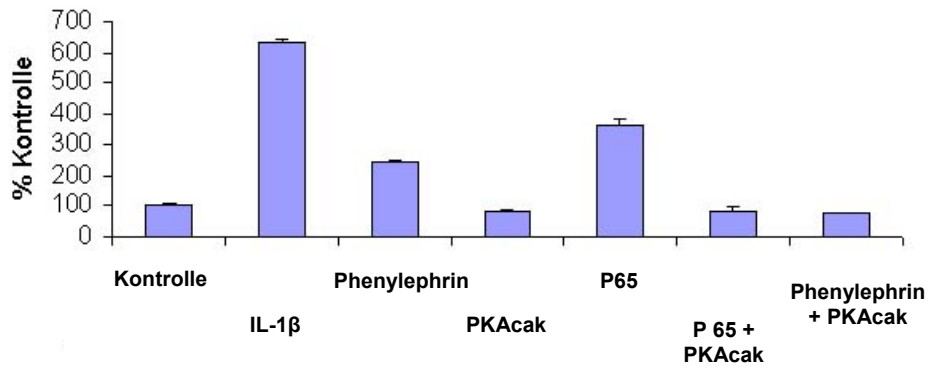


Abb. 53. NFκB -Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

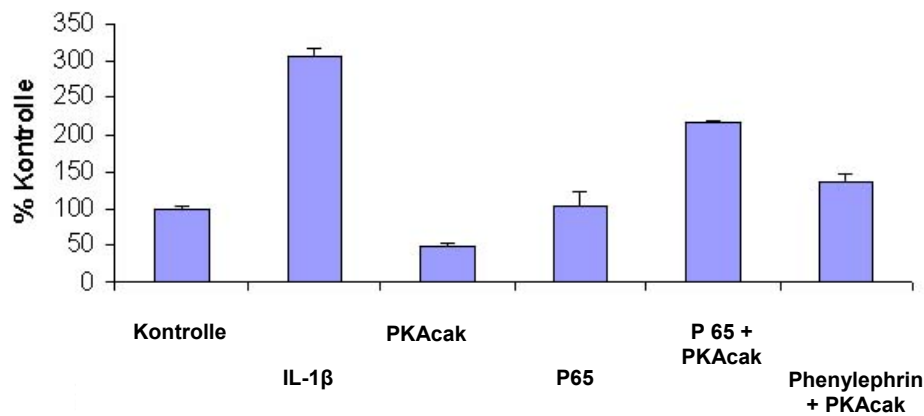


Abb. 54. NFκB -Luciferase-Reporter in mit Phenylephrin stimulierten Kardiomyozyten

Da die Genexpressionsdaten der Phenylephrin-Stimulation auf eine durch cAMP-Anstieg-vermittelte transkriptionelle Veränderung schließen lassen, wurde versucht durch Kotransfektion mit einer konstitutiv-aktiven PKA-Mutante Einfluss auf das Reportersignal zu nehmen. Interessanterweise zeigte sich dabei nach Kotransfektion mit dieser Mutante eine starke Inhibition des durch Phenylephrin oder IL-1 $\beta$  ausgelösten Signals. Sogar ein durch Kotransfektion mit der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 ausgelöstes sehr starkes Reportersignal ließ sich auf diese Weise unterdrücken (Abbildungen 53 und 54).

## **4. Diskussion**

Die Herzhypertrophie als stärkster Prädiktor für das Erkranken an Herzinsuffizienz betrifft vor allem ältere Menschen und spielt daher in modernen Gesellschaften mit hoher durchschnittlicher Lebenserwartung eine große Rolle. Da es auch immer besser gelingt, Vorerkrankungen erfolgreich zu therapieren, überleben viele Patienten einen Herzinfarkt und entwickeln, resultierend aus der Infarkt-Schädigung, eine Herzhypertrophie und später Herzinsuffizienz.

Die Bedeutung der Herzinsuffizienz und der ihr häufig vorausgehenden Herzhypertrophie werden nach wie vor von Ärzten und Patienten unterschätzt. Krebserkrankungen z. B. werden subjektiv als viel schwerwiegender wahrgenommen. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft haben lediglich Lungenkrebspatienten eine ähnlich schlechte Prognose wie an Herzinsuffizienz erkrankte Menschen. Auch die Lebensqualität dieses Patientenkollektivs ist stärker eingeschränkt als z. B. die von Dialysepatienten oder Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen. Aus all diesen Gründen erlangt die Suche nach den Ursachen der pathophysiologischen Entwicklung von Hypertrophie eine immer größere Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der globalen Expressionsanalyse zweier Herzhypertrophie-Modelle ein möglichst objektiver Ansatz gewählt, um die molekularen Ursachen der Hypertrophieentwicklung besser zu verstehen.

### **4.1. Datenerfassung und Datenverarbeitung in der globalen Genexpressionsanalyse**

Die cDNA-Microchip-Hybridisierung ist heutzutage die „state-of-the-art“-Methode zur Detektion verschiedener Genexpressionsmuster, wobei allerdings dabei vor allen Dingen die anfallenden großen Datenmengen (z.B. ca. 20.000 Gene pro Chip) Probleme aufwerfen.

Die Frage nach der richtigen Auswertemethode ist immer noch ein zentraler Diskussionspunkt der Microarray-gestützten Genexpressionsanalyse. Das generelle Problem der statistischen Analyse der Microarray-Daten ist dabei, dass die Anzahl  $n$  der untersuchten Proben (Gewebe, Zelllinien, Patientenproben) klein ist. Dem gegenüber steht die sehr große Anzahl  $p$  der in einem Ansatz untersuchten Parameter (Gene). In der Literatur wird vom „large- $p$ , small- $n$ “-Problem gesprochen. Obwohl zur Zeit viele Artikel mit Ergebnissen aus Genexpressionsanalysen veröffentlicht werden, ist die Zahl der Arbeiten, die sich gezielt mit den Möglichkeiten zur

Auswertung befassen vergleichsweise gering (Ben-Dor *et al.*, 2000; Brazma *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Ein Konsens über angemessene Normalisierungs- oder Analysemethoden besteht nicht, wenngleich es Bestrebungen in diese Richtung gibt (Knight, 2002). Häufig wird zur Identifikation differentiell exprimierter Gene der statistische t-Test für zwei unverbundene Proben angewandt. Dieser Test geht von der Annahme aus, dass die Mittelwerte zweier Datensätze gleich sind. Mit t-Tests kann dann überprüft werden, ob die Mittelwerte zweier Stichproben zufällig unterschiedlich sind. Zu den Voraussetzungen des t-Test gehört die Normalverteilung der beiden Grundgesamtheiten, in diesem Falle der Genexpressionsdaten der beiden Gruppen „transgene Tiere“ und „Kontrolle“.

Um diese Annahme ausreichend sicherstellen zu können, stehen vor der eigentlichen Datenauswertung eine Reihe von Kontrollen, wie das gegeneinander Auftragen von verschiedenen Intensitätsdaten („Intensity-Plot“) oder das „Clustern“ von Proben.

Unter Clustern versteht man die Einteilung von Proben in Gruppen aufgrund von Ähnlichkeiten in verschiedenen Merkmalen, in diesem Falle ähnlicher Expressionsmuster, ohne dabei die Klassenzuordnung der Proben zu beachten. Das Einsortieren in zu bildende Gruppen oder Cluster geschieht nur unter Berücksichtigung der gemessenen, damit intrinsischen Probeneigenschaften. Aus dieser Eigenschaft rührt der Name des „unsupervised learning“ oder unüberwachten Clusters. Eine Vielzahl an Clustermethoden ist auf die mit Microarrays ermittelten Expressionsprofile angewendet worden, darunter das „Hierarchische Clustern“ (Alon *et al.*, 1999; Eisen *et al.*, 1998), „Self-organizing Maps (SOM)“ (Tamayo *et al.*, 1999), „Relevance Networks“ (Butte *et al.*, 2000) oder das „k-Means Clustering“ (Sherlock *et al.*, 2000). Die dahinterstehenden mathematischen Methoden sind nicht neu, werden aber zunehmend für die Analyse genomischer Daten benutzt. Jede dieser Methoden scheint dazu geeignet, die vorherrschenden Strukturen in einem Datensatz aufzuspüren (Golub *et al.*, 2001). Prinzipiell eignen sich die unterschiedlichen Methoden zum Clustern und zum Klassifizieren. Das von RESOLVER auf Genexpressionsdaten angewandte hierarchische Clustern beruht mathematisch auf einer „Nearest Neighborhood Analysis“ auf Grundlage der Pearson-Korrelation und erkennt Muster in Genexpressionsprofilen. Der Vorteil dieser Methode ist die Darstellung der Ergebnisse in hierarchisch organisierten Bäumen (Dendrogrammen), welche die Verwandtschaft oder Ähnlichkeit von Gruppen oder Clustern anschaulich machen.

Einander ähnliche Proben sind durch kurze Äste miteinander verbunden. Je länger die Äste werden und je mehr Verzweigungen zwischen zwei Proben liegen, desto unähnlicher sind sie sich. Hierarchische Clustermethoden sind gut dazu geeignet, die Daten in zwei Dimensionen zu clustern. Erstens können die Proben zu Gruppen sortiert werden. Hierbei wird danach geschaut, welche Proben, über den jeweiligen Microarray betrachtet, Ähnlichkeiten aufweisen. Zweitens können Gene geclustert werden, indem nach Genen gesucht wird, die, über die verschiedenen Proben betrachtet, ähnliche Expressionsmuster besitzen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben, also in diesem Fall zwischen zwei Datenreihen von Messwerten, wird mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt. Zum Zusammenfügen der Proben, also zum eigentlichen hierarchischen Clustern, bietet das Programm drei Optionen an: Average Linkage Clustering, Complete Linkage Clustering und Single Linkage Clustering. Die Unterschiede in den Algorithmen bestehen in der Berechnung der Distanzen und der Erstellung der Distanzmatrix. Weitere Clustermethoden sind die „Self-organizing Maps“ (Tamayo *et al.*, 1999) oder das „*k*-Means-Clustern“. Diese Methoden eignen sich gut, komplexe Datensätze zu betrachten und profunde Muster der Genexpression aufzuspüren. In der Anwendung haben *k*-Means Clustermethoden oder SOM jedoch den Nachteil, dass vom Nutzer selbst die Anzahl der zu generierenden Cluster festgelegt werden muss. Dies birgt die Schwierigkeit, dass eine biologisch angemessene Zahl an Gruppen im voraus kaum bekannt ist. Für die Betrachtung von nur zwei zellulären Zuständen, in diesem Fall „kranke Zelle“ und „gesunde Zelle“, eignen sich SOM als Clustermethode für Gene nicht sehr gut. Ein weiterer Nachteil der SOM ist, dass es keinen Hinweis auf die Verbindung oder den Grad der Ähnlichkeit zwischen einzelnen Clustern gibt. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung funktioneller Gruppen differentiell exprimierter Gene und zur Qualitätskontrolle der Chipdaten das hierarchische Clustern nach dem „Complete-Linkage“-Verfahren verwendet.

Weiterhin gibt es keinen Konsens, vor allem auch keine Untersuchungen darüber, ab welcher Größe ein auf Transkriptionsebene gemessener Expressionsunterschied wirklich biologisch bedeutsam ist. Die Faktoren („Fold Change, FC“), die von den unterschiedlichen Autoren als minimaler Unterschied zugelassen werden, reichen von 1,5 (Chen *et al.*, 2001) bis 4 (Notterman *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung des transgenen Tiermodells ein Expressionsunterschied von  $\pm 2$  mit einem *p*-Wert von  $\leq 0,01$  gewählt, weil hier sehr viele Gene statistisch

relevant reguliert erschienen. Im Zellkulturmodell der  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten neonatalen Kardiomyozyten war die Summe der statistisch signifikant regulierten Gene erheblich geringer, so dass weniger stringente Filterkriterien zur Datenauswertung (Expressionsunterschied von  $\pm 1,5$  mit einem p-Wert von  $\leq 0,05$ ) herangezogen wurden.

Um die cDNA-Microarray-Daten einer weiteren Kontrolle zu unterziehen, wurde die Regulation ausgewählter Transkripte durch Einsatz von qRT-PCR und Western-Blotting auf Proteinebene untersucht. Da sich die Ergebnisse gegenseitig bestätigten, kann von einer gelungenen Chip-Hybridisierung und vertrauenswürdigen Genexpressionsdaten in diesem Experiment ausgegangen werden. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte unter Berücksichtigung der „Minimum-Information-About-a-Microarray Experiment (MIAME)“-Regeln (Brazma et al., 2000), die weltweit als wissenschaftlich sinnvolles Standardvorgehen zur Chipdatenanalyse anerkannt sind.

#### **4.2. Differentiell exprimierte Transkripte im Modell der PKBy1-überexprimierenden transgenen Mäuse.**

Für viele der in dieser Arbeit identifizierten regulierten Gene konnte bislang keine Rolle in der Ausbildung von Herzhypertrophie gezeigt werden, bei einigen ist die Funktion gänzlich unbekannt. An dieser Stelle sollen die wichtigsten der differentiell exprimierten Transkripte und deren Rolle in der Hypertrophieentwicklung diskutiert werden.

##### **4.2.1. Hypertrophiemarker**

Unter den als reguliert identifizierten Genen fällt zunächst eine Reihe von Hypertrophiemarkern auf. Die Transkripte für ANF,  $\beta$ -MHC und BNP sind in nahezu jedem Hypertrophiemodell induziert. Von den natriuretischen Peptiden ist bekannt, dass sie vor allem in der fötalen und frühen neonatalen Entwicklung von ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert werden und dass sie während der Restrukturierungsprozesse in der Hypertrophieentwicklung und einem Fortschreiten dieser Entwicklung zur Herzinsuffizienz erneut bis zu >100-fach induziert werden (Wei *et al.*, 1993). Tsutamoto *et al.* (1997) konnten in einer klinischen Studie mit Herzinsuffizienz-Patienten einen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-BNP-Werten und signifikant niedrigerer Überlebenschancen nachweisen. Darüber hinaus konnten Yoshimura *et al.*



(2002) zeigen, dass eine wirksame Therapie bei Herzinsuffizienz-Patienten und eine Verbesserung deren Zustandes nach der „New-York-Heart-Association“-Klassifizierung zu einer Abnahme der BNP-Plasmaspiegel führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von kultivierten Herzfibroblasten mit BNP deren Kollagenproduktion hemmt und Metalloproteinasen aktiviert (Tsuruda *et al.*, 2002). Die Behandlung von ventrikulären Kardiomyozyten mit ANF unterdrückte die mit Hypertrophie einhergehende Zunahme der Proteinsynthese und die Restrukturierung des Zytoskeletts (Calderone *et al.*, 1998). Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass die Expression natriuretischer Peptide als endogene Antagonisten des Myozytenwachstums wirken, was ihre Rolle als mögliche Hypertrophiemarker unterstreicht.

Die Induktion von  $\beta$ -MHC ist zunächst eine Anpassungsreaktion der Kardiomyozyten auf veränderte äußere Umstände. Die vermehrte Synthese kontraktile Proteine hilft dem Herzmuskel, sich diesen Umständen anzupassen, trägt jedoch im weiteren Verlauf stark zur Herzinsuffizienzentwicklung bei (Carvalho *et al.*, 2003).

Die Induktion des „Cardiac adriamycin responsive protein“ (CARP) parallel zur BNP-Induktion konnte in verschiedenen Hypertrophie-Modellen gezeigt werden (Aihara *et al.*, 2000). Obwohl über die Rolle dieses Proteins, das eine Rolle als Transkriptions-Kofaktor zu spielen scheint, noch nicht viel bekannt ist, deuten Publikationen darauf hin, dass CARP die Expression einiger kardialer Gene, wie  $\beta$ -MHC, die leichte Myosinkette und kardiales Troponin unterdrückt und darüber möglicherweise die Kontraktilität des Herzmuskels beeinflusst (Zolk *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 1997). Da dieses Transkript zusätzlich in beiden Modellen gleichermaßen induziert auftritt, spricht dies für einen möglichen neuen Hypertrophiemarker.

Auch die Induktion von Typ-I-Kollagen ist eine wohlbekanntes Hypertrophieantwort des Herzmuskels. Die Akkumulation von Typ-I-Kollagen, vorwiegend in Fibroblasten im Herzmuskel, führt zu kardialer Fibrose und einer Versteifung der Ventrikelwand, die in verminderter Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des Herzens resultiert (Manabe *et al.*, 2002).

#### **4.2.2. Extrazellulär sezernierte Proteine**

Sun *et al.* (2000) berichteten von einer belastungsbedingten Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-(RAA-)Systems in Kardiomyozyten, die an Infarkt-narben angesiedelt sind. Angiotensin II (Ang II) und der „Fibroblast Growth Factor

(FGF)“ werden als die stärksten Auslöser kardialer Fibrose beschrieben (Booz *et al.*, 1995). Beides sind Proteine, deren Transkription im Modell der PKBy-1-überexprimierenden Mäuse induziert wurde. Die Induktion von Osteopontin wurde von Kawano *et al.* (2000) als Reaktion auf die Ang-II-Sekretion der Kardiomyozyten beschrieben. Möglicherweise dient die Sekretion von Angiotensinogen (dem Vorläuferprotein von Ang II) und Bindegewebswachstumsfaktoren dazu, das Kardiomyozyten-Wachstum durch Akkumulation kontraktile Proteine in passendes Bindegewebe einzubetten.

Adrenomedullin ist ein stark vasoaktives und diuretisch wirkendes Peptidhormon, das im Plasma von Herzinsuffizienzpatienten in signifikant erhöhten Konzentrationen gefunden wurde, die sich mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren lassen (Kato *et al.*, 1996). In Tiermodellen kardialer Hypertrophie und kardialer Ischämie konnte die verstärkte Expression von Adrenomedullin ebenfalls gezeigt werden (Oie *et al.*, 2000). Exogen zugeführt zeigte das Peptid in isolierten neonatalen Kardiomyozyten eine deutliche Abschwächung des Phenylephrin-induzierten <sup>14</sup>C-Phenylalanin-Einbaus. Da auch ein Rezeptor (RAMP-1) für Adrenomedullin induziert wurde, kann bei diesen regulierten Transkripten möglicherweise ebenfalls davon ausgegangen werden, dass es sich hier nicht nur um einen zuverlässigen Hypertrophiemarker handelt, sondern dass die Expression dieser Proteine auf Grund ihrer antihypertrophen Wirkung induziert wurde.

Die starke Induktion von Myostatin („Growt-Differentiaton-Factor-8 (GDF-8)) ist besonders bemerkenswert. GDF-8 tritt als negativer Regulator des Muskelwachstums in Skelettmuskelzellen auf (McPherron *et al.*, 1997). Unter Berücksichtigung dieser Funktion in Skelettmuskelzellen liegt hier ebenfalls der Schluss nahe, dass es sich bei der Induktion dieses Transkriptes um eine sekundäre Kompensationsreaktion auf die Expression des Transgens und die daraus resultierende Hypertrophie handelt.

#### **4.2.3. Rezeptoren**

Die Induktion des  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptors scheint schwer zu erklären. Zumal von Zuscik *et al.* (2001) gezeigt werden konnte, dass die kardiale Überexpression dieses Rezeptorsubtyps zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz führt und lange bekannt ist, dass die Stimulation des Rezeptors in isolierten neonatalen Kardiomyozyten zum selben Ergebnis führt (Knowlton *et al.*, 1993).

Für die Induktion des TWEAK-Rezeptors (TNF-like weak inducer of apoptosis) gibt es zwei mögliche Erklärungen. Einerseits konnten Donohue *et al.* (2003) kürzlich zeigen, dass der TWEAK-Rezeptor durch Stimulation mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) in Endothelzellen induziert wird und dort die Proliferation und Angiogenese stimuliert. Da FGF in der Untersuchung des vorliegenden Tiermodells induziert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Induktion von TWEAK sich darauf zurückführen lässt. Andererseits deuten jüngste Publikationen darauf hin, dass TWEAK durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) reguliert wird. Durch Phosphorylierung wird eine Translokation in den Kern und die Expression NF $\kappa$ B-abhängiger Gene initiiert. Die Inhibition von GSK-3 $\beta$  konnte diesen Effekt verhindern (De Ketelaere *et al.*, 2004). Da bei Expression einer konstitutiv-aktiven PKB $\gamma$ -1-Mutante GSK-3 $\beta$  dauernd inaktiviert ist, könnte es sich bei der Induktion dieses Proteins um eine Kompensation dieser Aktivierung handeln.

Die Induktion des Angiotensin-II-Rezeptors ist sehr schwer zu interpretieren. Zumal Kanno *et al.* (2004) jüngst *in vivo* einen positiven Einfluss von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten auf die Entwicklung von Herzhypertrophie zeigen konnten. Die "Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global End point Trial (ONTARGET)" (Zimmermann *et al.*, 2004) könnte hier schon bald neue Therapieerkenntnisse über die Angiotensin-II-Rezeptor-Blockade bei Herzerkrankungen liefern.

#### 4.2.4. Ionenkanäle und Transportproteine

Über die differentielle Expression von Ionenkanälen in Kardiomyozyten (in diesem Modell Kv 1.7, Kv 1.5) in verschiedenen Krankheitsmodellen gibt es eine Vielzahl von Arbeiten (Lopatin *et al.*, 2001). Die Ergebnisse sind jedoch alles andere als eindeutig. Lee *et al.* (1999) konnten für ein Hypertrophiemodell die differentielle Expression verschiedener spannungsabhängiger Kaliumkanäle zeigen und diese Ergebnisse mit Veränderungen in der ventrikulären Repolarisation bei fortgeschrittener Hypertrophie korrelieren. Die Induktion des Ryanodin-Rezeptors (RyR) und der im Sarkoplasmatischen Retikulum exprimierten Calcium-ATPase (SERCA, atp2a) sind von besonderer Bedeutung, weil diese beiden Proteine als Schlüsselmoleküle der Regulation des intrazellulären Calciumhaushaltes von Kardiomyozyten gelten. Beide Proteine können von der Calcium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert und damit in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Dieses Protein verursacht bei kardialer

Überexpression Herzhypertrophie und ist im vorliegenden Modell initial stark induziert. Zhang *et al.* (2003) konnten nicht nur die hypertrophe Wirkung dieser kardialen Überexpression zeigen, sondern auch eine verstärkte Phosphorylierung einiger den intrazellulären Calciumhaushalt beeinflussender Proteine.

#### **4.2.5. Enzyme**

Die differentielle Expression der meisten Enzyme lässt sich nicht ohne Weiteres der Hypertrophieentwicklung zuordnen. Die Rolle der Calcium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase wurde bereits in Zusammenhang mit der Induktion von Calcium-homöostase-regulierenden Proteinen diskutiert. Hervorzuheben ist die Induktion der Rho-Kinase (ROCK), die in der Proliferation und der Immunantwort von Glattmuskelzellen eine wichtige Rolle spielt. Hattori *et al.* (2004) konnten kürzlich zeigen, dass die Inhibition dieser Kinase in einem Infarktmodell das linksventrikuläre „remodeling“ und die Ausprägung einer Hypertrophie verhindert.

Die Unterdrückung der Expression der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) ist ebenfalls interessant. Chan *et al.* (2004) konnten jüngst zeigen, dass die Aktivierung der AMPK über die Inhibition von mTOR und p70S6K - beides in die PKB-Signaltransduktion involvierte Effektoren – und die direkte Phosphorylierung der eEF2-Kinase die Proteinsynthese in PKB-transfizierten Kardiomyozyten hemmt. Die Unterdrückung der Transkription der AMPK könnte also direkt mit der verstärkten Proteinsynthese in Kardiomyozyten zusammenhängen.

Auffällig ist auch die Unterdrückung der Expression der beiden PKB-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ . Hier liegt ebenfalls die Vermutung nahe, dass dies ein Versuch der Zelle ist, die Hypertrophie-auslösende Expression des PKB $\gamma$ -1-Transgenes zu kompensieren.

#### **4.2.6. Weitere differentiell exprimierte Transkripte**

Die differentielle Expression der beiden IGF-bindenden Proteine IGFBP-5 und IGFBP-3 könnte ebenfalls von Bedeutung für die Hypertrophieausprägung in diesem Modell sein. Von IGFBP-3 wurde kürzlich berichtet, dass es für die Vermittlung der antihypertrophen Wirkung von Myostatin benötigt wird (Kamanga-Sollo *et al.*, 2003), das zu einem der in diesem Modell am stärksten induzierten Gene zählt. Möglicherweise handelt es sich bei der Unterdrückung dieses Transkriptes um einen negativen Regelkreis, der durch die hohen Mengen an Myostatin aktiviert wird. Möglicherweise steht die in diesem Modell beobachtete massive Herzhypertrophie aber auch damit

im Zusammenhang, dass zusätzlich zur Induktion von Myostatin eine ähnlich starke Induktion von IGFBP-3 nötig wäre, um den kompensatorischen Effekt von Myostatin zu vermitteln. Von IGFBP-5 konnte gezeigt werden, dass es nicht nur in Kombination mit IGF extrazellulär wirkt, sondern unabhängig davon ebenfalls Aktivität als Transkriptionsfaktor besitzt (Xu *et al.*, 2004). In transgenen IGFBP-5-überexprimierenden Mäusen konnte eine generelle Wachstumsretardierung und verkümmerte Muskelbildung gezeigt werden (Salih *et al.*, 2004). Ein erneuter Hinweis darauf, dass die Induktion dieses Proteins nur eine Folgereaktion des Herzens auf die Hypertrophie bedeutet.

Während der Anfertigung dieser Arbeit publizierten Cook *et al.* (2002) Veränderungen des Transkriptoms in Mäusen, die kardioselektiv PKB $\alpha$  überexprimieren. Interessanterweise konnten bei dieser Analyse nur deutlich weniger differenziell exprimierte Gene gefunden werden; allerdings waren unter den regulierten Genen einige der wichtigsten der in diesem Modell aufgefallenen Transkripte zu finden (Typ-I-Kollagen, RAMP-1, IGFBP-5, Myostatin, CARP, BNP), was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Auch hier konnten die meisten der regulierten Gene nicht in Zusammenhang mit einer hypertrophieauslösenden Wirkung gebracht werden

#### **4.2.7. Promotoranalyse**

Nachdem auf den ersten Blick unter den regulierten Genen keines entdeckt werden konnte, das direkt für die in den transgenen Tieren festgestellte massive Herzhypertrophie verantwortlich gemacht werden kann, wurden die Promotoren der am stärksten regulierten Gene auf mögliche Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei wurde eine starke Häufung an möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Klasse festgestellt. In der Insulin-Signaltransduktion sind diese Transkriptionsfaktoren bereits seit einigen Jahren als in ihrer Funktion durch PKB gesteuert bekannt und konnten mit verschiedenen biologischen Prozessen (Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Stoffwechsel, DNA-Reparatur) in Verbindung gebracht werden.

#### **4.3. Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Herzhypertrophie**

Über die durch Forkhead-Transkriptionsfaktoren gesteuerte Genexpression in Säugerherzen ist bisher leider sehr wenig bekannt. Durch Untersuchungen in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* konnte eine Reihe regulierter Gene identifiziert

werden, die vorwiegend zellulären Energiestoffwechsel, Zellzyklus und Zellreparaturmechanismen betreffen (van der Heide *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression einer konstitutiv-aktiven PKB $\gamma$ -1-Mutante in der Lage ist, den Forkhead-Transkriptionsfaktor FKHR-L (oder FOXO1) zu phosphorylieren und dessen Export aus dem Kern zu veranlassen (vgl. Abb. und Abb.).

Eines der am besten untersuchten Hypertrophie-Modelle ist die  $\beta$ -adrenerge Stimulation von Herzmuskelzellen. Die Signaltransduktion verläuft dabei über die Proteinkinase A (PKA), die der Proteinkinase B strukturell sehr ähnlich ist. Für die Überexpression von PKA in den Herzen transgener Mäuse konnte als Resultat Herzhypertrophie belegt werden (Antos *et al.*, 2001). Unklar ist bislang jedoch weiterhin, wie die Signaltransduktion von PKA aus weiter verläuft und welcher Effektor letztendlich für die hypertrophe Wirkung verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die Koexpression einer konstitutiv-aktiven PKA-Mutante zusammen mit dem FKHR-L-Luciferase-Reportersystem in der Lage ist, FKHR-L in zu PKB $\gamma$ -1 vergleichbarem Ausmaß zu aktivieren. Der PDE-III-Inhibitor Milrinon, der den Abbau von cAMP verhindert und dadurch PKA indirekt aktiviert, zeigte ein ähnliches Ergebnis (Abb. 28). Die gemeinsame Expression des FKHR-L-Konstruktes mit ANF- oder BNP-Luciferase-Reporterkonstrukten in HEK-293-Zellen zeigte schließlich eine sehr starke Induktion des Reporters, die hervorragend mit der Zahl der Forkhead-Bindungsstellen auf der Promotorsequenz korreliert.

Als ein Resultat der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass Forkhead-Transkriptionsfaktoren in der Lage sind, die Expression zweier wichtiger Hypertrophie-Marker, ANF und BNP, zu regulieren. Weiterhin ist die Proteinkinase B in der Lage, die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Es besteht Grund zu der Annahme, dass die durch PKB vermittelte Signaltransduktion auch in anderen Hypertrophie-Modellen eine Rolle spielen könnte.

#### **4.4. Differentiell exprimierte Transkripte im Modell der $\alpha_1$ -adrenergen Induktion einer Myokardzellhypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten**

Nachdem in einigen Vorversuchen eine Zellvergrößerung sowie eine Zunahme der RNA- und Proteinsynthese in mit Phenylephrin stimulierten neonatalen Kardiomyozyten gezeigt werden konnte, wurde 6 h nach Stimulation RNA für die Hybridisierung von cDNA-Arrays isoliert.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass viele der differentiell exprimierten Gene an der Regulation der intrazellulären Calcium-Homöostase beteiligt sind. Weiterhin auffällig ist die Tatsache, dass viele der induzierten Gene mit der Regulation der cAMP-gesteuerten Transkription zu tun haben, was zunächst sehr verwundert, da man diese Art der Signaltransduktion (GPCR, Adenylatcyclase, cAMP, PKA,...) eher von einer  $\beta$ -Stimulation erwarten würde. Überraschenderweise ist über die  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Signaltransduktion in Kardiomyozyten relativ wenig bekannt. Die bislang dazu publizierten Arbeiten beschränken sich größtenteils auf die Signalvermittlung in Glattmuskelzellen der Gefäße. Ruan *et al.* (1998) konnten jedoch inzwischen auch in Fibroblasten einen  $\alpha_{1A}$ -ausgelösten und Phospholipase D vermittelten cAMP-Anstieg zeigen und Gosau *et al.* (2002) fanden den gleichen Mechanismus in isolierten Kardiomyozyten. Zusammen mit der Tatsache, dass in der mit Noradrenalin und Atenolol behandelten Kontrolle über 95% der Gene identisch in Art und Ausmaß der Expression reguliert waren und nur diese Gene in die Auswertung aufgenommen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete differentielle Expression tatsächlich auf die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation zurückzuführen ist.

##### **4.4.1. Hypertrophiemarker**

Auch im Modell der  $\alpha_1$ -adrenergen Induktion einer Myokardzellhypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten sind die klassischen Hypertrophiemarker  $\beta$ -MHC, BNP und CARP induziert. Besonders auffallend an diesem Modell ist die, verglichen mit dem transgenen Modell, sehr viel deutlichere Induktion der „Immediate early genes (IEG)“ oder „Early growth response genes“, die Transkriptionsfaktoren der Klasse IV, wie z.B. c-Fos, c-Myc, c-Jun und EGR-1 kodieren. Die sehr deutliche Induktion dieser Transkripte und das Fehlen der Induktion von ANF lassen sich mit der relativ kurzen Stimulation (6 h) der Zellen erklären. Die Induktion von CARP ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da Zolk *et al.* (2003) *in vivo* zeigen konnten,

dass die Induktion dieses Proteins direkt mit der Erhöhung des cAMP-Spiegels und der Aktivierung von PKA und CamK in Kardiomyozyten zusammenhängt.

#### **4.4.2. Extrazellulär sezernierte Proteine**

Die Induktion von TGF- $\beta$  und Endothelin I (ET-I) in hypertrophen Kardiomyozyten ist bereits seit längerem bekannt (Ruwhof, van der Laarse A., 2000). Endothelin I ist ein vasokonstriktorisches Peptid, das bei Kardiomyozyten Hypertrophie auslöst. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten selbst unter Hochdruckbedingungen ET-I produzieren und dass sich der Grad der Proteinexpression mit dem Ausmaß an ausgebildeter Hypertrophie korrelieren lässt (Arai *et al.*, 1995). Die Induktion von TGF- $\beta$  als Reaktion auf hypertrophe Stimuli wird mit der vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix-Proteine (ECM) in Verbindung gebracht. Sowohl Typ-I-Kollagen als auch TGF- $\beta$  werden in gesunden Herzen nur in sehr geringem Maß produziert, nach einem Herzinfarkt aber stark induziert. Transgene TGF- $\beta$ -überexprimierende Tiere zeigen starke Anzeichen von kardialer Fibrose, die durch Inhibition von TGF- $\beta$  verhindert werden konnte (Lijnen *et al.*, 2000), so dass davon ausgegangen werden kann, dass TGF- $\beta$  ein wichtiger Auslöser des „cardiac remodeling“ ist. Die Induktion gleich zweier TGF- $\beta$ -Isoformen im Modell der Phenylephrin-stimulierten neonatalen Kardiomyozyten, zusammen mit dem „TGF- $\beta$ -maskierenden Protein“, welches für den Transport und die Steuerung der Aktivität von TGF- $\beta$  verantwortlich gemacht wird, zeigt sehr deutlich, dass die hier beobachteten Genexpressionsänderungen mit einer Hypertrophieantwort der Zellen in Verbindung stehen.

Die Induktion von Interleukin 6 (IL-6), einem der beiden am stärksten induzierten Transkripte, wurde bereits in den Herzen insuffizienter Patienten beobachtet und mit einer möglichen späteren Verschlechterung der Herzfunktion dieser Patienten in Verbindung gebracht (Kanda, Takahashi, 2004). Interessanterweise konnten Yang *et al.* (2004) die starke Induktion von IL-1 und IL-6 als Reaktion auf die kardiale Überexpression von Endothelin I in Mäusen nachweisen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Induktion beider Gene in dem hier untersuchten Modell in Zusammenhang steht. In diesen Kontext passt auch die Induktion der Cyclooxygenase II (COX II), einem Enzym, das für die Produktion von Entzündungsmediatoren, den Prostaglandinen, verantwortlich ist. Wong *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass dieses Enzym im Herzgewebe von Patienten mit chronischer



Herzinsuffizienz im Endstadium, besonders in Regionen um fibrotische Infarktstellen, vermehrt exprimiert wird und dass dort die NF $\kappa$ B-Signaltransduktion aktiviert ist.

LaPointe *et al.* (2004) konnten kürzlich die gleiche Induktion in einem Infarktmodell an Mäusen nachweisen. Darüber hinaus gelang es, durch selektive Inhibition von COX II die Hypertrophieantwort auf den Infarkt, die interstitielle Kollageneinlagerung und die Expression von TGF- $\beta$  signifikant abzuschwächen.

#### 4.4.3. Rezeptoren

Die Induktion des RAA-Systems und die pro-fibrotische Rolle von Ang II wurde bereits in Kap. 4.2.2. diskutiert. Die Induktion zweier Ang-II-Rezeptorsubtypen deutet wie auch die verstärkte Expression von TGF- $\beta$  darauf hin, dass im untersuchten Modell ein Einsetzen des „cardiac remodeling“ als Reaktion auf die stimulierte Hypertrophie zu beobachten ist.

Die verstärkte Expression des Bradykinin-2-Rezeptors (BK-2R) könnte eine Schutzreaktion der Kardiomyozyten auf die induzierte Hypertrophie sein. Die initiale Induktion von BK-2R nach Infarkten geht bei der Weiterentwicklung zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz in eine starke Abnahme der Rezeptordichte im Herzgewebe über. Kuoppala *et al.* (2003) konnten kürzlich in zwei Tiermodellen *in vivo* zeigen, dass die BK-2-Rezeptordichte bereits 12 h nach Aortenligatur signifikant erhöht ist. Am Modell spontan hypertensiver Ratten konnte die gleiche Arbeitsgruppe die oben beschriebene Änderung in der Rezeptordichte während der Entwicklung von Bluthochdruck über Hypertrophie und Herzinsuffizienz nachweisen.

Die verringerte Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren nach Phenylephrinstimulation ist ebenfalls bemerkenswert. Da Phenylephrin an die in neonatalen Kardiomyozyten exprimierten  $\alpha_1$ -Rezeptoren bindet, verwundert eine kompensatorische Runterregulation dieses Rezeptorsubtyps nach nur wenigen Stunden kaum. Die Unterdrückung der Expression der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist ohne weitere Untersuchungen dagegen nicht zu erklären. Von einer verstärkten Stimulation dieser Rezeptoren mit z. B. Isoprenalin kennt man eine solche kompensatorische Regulation, die dazu dient, das System unempfindlicher gegen diese „unnatürliche“ Stimulation zu machen; eine Erklärung, die in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell eigentlich ausgeschlossen ist. Möglicherweise steht die beobachtete Regulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren mit der verstärkten Expression des cAMP-

abhängigen Transkriptionsfaktors CREM in Zusammenhang (Näheres dazu in Kapitel 4.4.4.).

#### **4.4.4. Weitere differentiell exprimierte Transkripte**

Wie bereits beschrieben, sind viele die intrazelluläre Calcium-Homöostase- und die cAMP-vermittelte Transkription betreffende Gene differentiell exprimiert. Über die  $\alpha_1R/G_q/PLC$ -vermittelte Signaltransduktion kann einer der wichtigsten Effektoren intrazellulär freigesetzten Calciums, das Calcium/Calmodulin-System direkt aktiviert werden. Ein cAMP-Anstieg in der Zelle führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die über die Steuerung von L-Typ-Calciumkanälen und Calcium-Einstrom ebenfalls das Calcium/Calmodulin-System aktivieren kann.

Genau wie im PKBy1-transgenen Tiermodell ist auch in den mit Phenylephrin stimulierten neonatalen Kardiomyozyten die sarkoendoplasmatische Natrium/Calcium-ATPase (SERCA 2) induziert. Dieser Calciumtransporter ist für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase in der Herzmuskelzelle direkt verantwortlich. Nach der Depolarisation der Herzmuskelzelle, dem Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen, daraus resultierendem Ausstrom von Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und der folgenden Kontraktion muss das cytosolische Calcium schnell wieder in die intrazellulären Speicher befördert werden, damit es für die nächste Kontraktion zur Verfügung steht. Genau dies ist die Aufgabe der SERCA. Im SR wird Calcium an Calsequestrin gebunden und solange „verwahrt“, bis es zur nächsten Kontraktion wieder freigesetzt wird. Die kardioselektive Überexpression von Calsequestrin in transgenen Mäusen führt nicht nur zu konzentrischer Herzhypertrophie mit Induktion von Hypertrophiemarkern (CARP), sondern auch zur verminderten Expression von SERCA (Ihara *et al.*, 2002). Dies könnte eine kompensatorische Reaktion der Zellen auf die verstärkte Calsequestrin-Expression sein, da Calsequestrin große Mengen an Calcium im SR bindet und damit auch (zu) große Calciummengen freigesetzt werden. Eine Verringerung der SERCA-Expression würde zu weniger Calciumeinlagerung im SR und vermehrtem Abtransport aus der Zelle über Membranproteine führen. Unter Berücksichtigung dieser Forschungsergebnisse in Kombination mit der Induktion vieler an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase und der Calcium-Signaltransduktion beteiligter Proteine liegt die Vermutung nahe, dass es in den stimulierten Kardiomyozyten zu einer massiven Calciumüberladung kommt und die Zelle dies zu kompensieren

versucht. Eine kombinierte Induktion von SERCA und Calsequestrin könnte der Zelle helfen, das schädliche intrazelluläre Calcium ins SR zu befördern und dort zu binden. Nicht nur die Induktion von SERCA, Calsequestrin und die starke Unterdrückung der Expression der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamK II) sprechen für eine Beeinflussung eines ganzen Signaltransduktionsweges, sondern auch die Induktion einiger, in der Funktion ihrer Proteine weiter „stromaufwärts“ liegender Transkripte wie die cAMP-Phosphodiesterasen vom Typ III und IV. Diese Enzyme sind für den katalytischen Abbau von cAMP in der Zelle zuständig. Für beide Enzyme konnte im Tiermodell eindeutig eine Induktion in der Hypertrophieentwicklung und darüber hinaus eine verstärkte Aktivität bei Herzinsuffizienz gezeigt werden (Takahashi *et al.*, 2002). In dem hier beschriebenen Modell könnte die Induktion der Phosphodiesterasen eine Reaktion auf stark erhöhte cAMP-Spiegel bedeuten.

Eines der am stärksten induzierten Transkripte ist der cAMP-regulierte Transkriptionsfaktor CREM (cAMP responsive element modulator). Mäuse, in denen CREM ausgeschaltet wurde, zeigen klare Anzeichen von Herzinsuffizienz, wie z. B. deutlich schwächere Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels im Vergleich zu Kontrolltieren. Darüber hinaus reagieren die Herzen dieser Tiere deutlich schlechter auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Bei näherer Untersuchung des Herzgewebes stellte sich heraus, dass sowohl die  $\beta$ -Rezeptordichte im linken Ventrikel deutlich unterdrückt war als auch die Expression von SERCA (Muller *et al.*, 2003). Der Phänotyp dieser Tiere scheint zumindest eine wichtige Rolle für CREM in der Erhaltung der Kontraktilität und der  $\beta$ -Rezeptordichte aufzuzeigen. Die gleichzeitige Induktion der für die Funktion von CREM wichtigen Kofaktoren Cbp/p300 und C/EBP im hier untersuchten Modell scheint im großen und ganzen dafür zu sprechen, dass diese Transkripte als Kompensation der einsetzenden Hypertrophie-reaktion vermehrt gebildet werden.

#### 4.4.5. Promotoranalyse

Auch im Modell der  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten wurde eine Promotoranalyse der ersten 1000 Basen vom Transkriptionsstart an aufwärts der am stärksten regulierten Gene durchgeführt. Dabei zeigte sich eine starke Häufung von möglichen Bindungsstellen für cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsfaktoren der EGR- und NKX-Familie. Da EGR-1+2 deutlich induziert sind und der cAMP-gesteuerte Transkriptionsfaktor CREM zu den am stärksten heraufregulierten Genen gehört, liegt die Vermutung nahe, dass die bislang nicht erklärbare Induktion dieser Transkripte Ursache für die beobachtete differentielle Expression vieler anderer Gene ist.

#### 4.5. Pharmakologische Untersuchungen der $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Hypertrophie

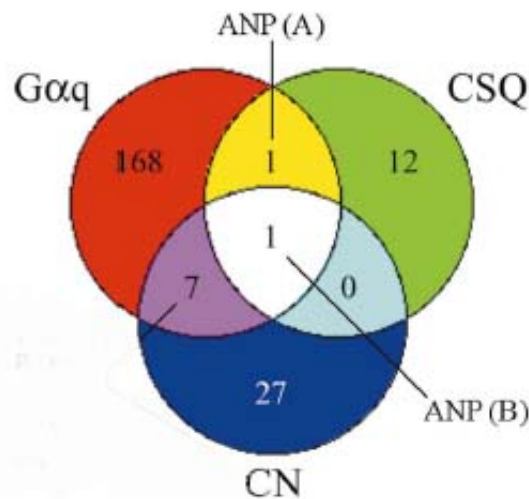
Zu den pharmakologischen Untersuchungen der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie lässt sich zusammenfassend sagen, dass Eingriffe in praktisch jeder der untersuchten Signalkaskaden zu einer die Phenylephrin-induzierte Hypertrophie abschwächenden Wirkung führten. Dies lässt den Schluss zu, dass es DEN hypertrophen Signaltransduktionsweg, ausgehend von der Stimulation an der Zelloberfläche, bis in den Zellkern, nicht gibt. Einer näheren Betrachtung bedürfen dabei sicherlich die Ergebnisse der pharmakologischen Eingriffe im PI3K/PKB/GSK-3 $\beta$ -Signaltransduktionsweg. Hier zeigt sich nämlich eine Diskrepanz in den Ergebnissen der beiden verwendeten Assays. Im  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Aufnahmeassay konnte mit einem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor und dem mTOR-Inhibitor Rapamycin klar eine Hemmung der Phenylephrin-induzierten Proteinsynthese belegt werden. Erstaunlicherweise trifft dies für die BNP-Expression als Hypertrophiemarker nicht zu. Offensichtlich gelingt es hier sehr gezielt, die mit Hypertrophie verknüpfte Proteinsynthese zu hemmen, ohne eine der wichtigsten in diesem Zusammenhang diskutierten transkriptionellen Veränderung zu beeinflussen.

Die Rolle von NF $\kappa$ B bleibt auch nach den erfolgten Untersuchungen unklar. Die von Cook *et al.* (2003) publizierte antihypertrophe Wirkung der Inhibition von NF $\kappa$ B konnte mit den vorliegenden Daten *in vitro* bestätigt werden. Warum dieser Effekt auftritt, welche Rolle NF $\kappa$ B tatsächlich spielt und warum dann im Transkriptom keine dafür typischen Gene (wie z.B. Adhäsionsmoleküle) zu finden sind, lässt sich

genauso wenig durch die Ergebnisse dieser Arbeit oder Literaturdaten erklären, wie den hier entdeckten inhibierenden Einfluss der Proteinkinase A.

#### **4.6. Abschließende Betrachtung**

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass sich die transkriptionelle Regulation in den zwei untersuchten Hypertrophie-Modellen deutlich unterscheidet. Die Gemeinsamkeiten beschränken sich vorwiegend auf die Markergene und die Transkriptionsfaktoren der Klasse IV. Dabei konnten neben den bekannten Markern ANF und BNP das „Cardiac adriamycin responsive Protein“ (CARP) und Interleukin-6 (IL-6) als mögliche neue Hypertrophie-Marker identifiziert werden. Keines der regulierten Transkripte konnte mit einer eindeutig hypertrophie-auslösenden Wirkung in Verbindung gebracht werden. Die meisten induzierten Gene scheinen Kompensationsmechanismen der Zelle zu reflektieren und stehen für anti-hypertrophe Mechanismen oder negative Regulation von Zelldifferenzierung und/oder Proliferation. Die während der Anfertigung dieser Arbeit von Kerstin Klämbt bei Aventis durchgeführten Experimente (Klämbt, 2004) stellen eine differentielle Regulation bestimmter Gene als Auslöser der Herzhypertrophie noch weiter in Frage. Im Rahmen ihrer Arbeit wurde Phenylephrin-induzierte Hypertrophie in adulten Rattenkardiomyozyten untersucht. Bei der Untersuchung differentiell exprimierter Transkripte wurden insgesamt nur 9 Gene als reguliert identifiziert, von denen lediglich fünf mit den Ergebnissen aus neonatalen Kardiomyozyten übereinstimmen. Trotzdem war das Ausmaß der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie sowohl im Aufnahme-Assay mit radioaktiv markierten Aminosäuren als auch bei Zellgrößenbestimmungen vergleichbar zu dem neonataler Kardiomyozyten. Auch die Behandlung mit verschiedenen pharmakologisch wirksamen Substanzen brachte vergleichbare Ergebnisse. Vor einigen Jahren konnten Aronow *et al.* (2001) mit der Untersuchung verschiedener transgener Tiermodelle für Hypertrophie zeigen, dass zwar in allen Modellen Gene differentiell exprimiert waren, die Schnittmenge sich jedoch auf genau ein Transkript, den Atrialen Natriuretischen Faktor (ANF), beschränkt (Abbildung 55).



**Abb. 55. Aus Aronow *et al.*, 2001. Vergleich differentiell exprimierter Transkripte in den Herzen transgener Tiere.**

CSQ=Calsequestrin, CN=Calcineurin, ANP=ANF.

Insgesamt lässt sich sagen, dass es sehr viele verschiedene Signalwege gibt, über die Herzhypertrophie ausgelöst werden kann. Auf Transkriptionsebene scheinen all diese Wege allerdings nicht viel gemeinsam zu haben, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Herzhypertrophie ein Prozess ist, der nicht auf Transkriptionsebene beginnt, sondern durch die selektive Steuerung der Proteinsynthese entsteht. Neu ist die Tatsache, dass zumindest bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Modellen eine kompensatorische Reaktion der Zellen auf Transkriptionsebene stattfindet.

Für die Hypothese der translationalen Regulation von Herzhypertrophie spricht besonders die Tatsache, dass die Expression der wohl bekanntesten Hypertrophiemarker ANF und BNP durch PKB und Forkhead-Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann, sowie die unerwartet stark ausgeprägte Hypertrophie der PKB $\gamma$ -1-überexprimierenden Mäuse. Über die PKB-Signaltransduktion wird die GSK-3 $\beta$  gehemmt, eine Kinase, die durch Phosphorylierung die Aktivität des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 2B epsilon (eIF2Bepsilon) reguliert. Von den Proteinen der eIF2-Familie ist bekannt, dass sie unter Mitwirkung von mTOR und der p70S6-Kinase die anabole Wirkung von Insulin oder Aminosäuren im Skelettmuskel neugeborener Tiere vermitteln (O'Connor *et al.*, 2004). Weiterhin konnte kürzlich belegt werden, dass vermehrte Skelettmuskelkontraktionen, wie sie bei verstärktem Training auftreten, genau diese Translationsmaschinerie aktivieren und zur vermehrten Bildung von kontraktile Proteinen führen. Aus der onkologischen Forschung weiß man, dass ein weiteres Protein aus der Familie der Translations-Initiationsfaktoren, eIF4e, die Translation bestimmter mRNA's kontrolliert,

die für die Zellzyklussteuerung, die Aktivierung von proto-Onkogenen, die Angiogenese, das Zellwachstum, Apoptose und Kommunikation mit der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind. All diese Prozesse sind nach dem bisherigen Verständnis für die Hypertrophieentwicklung wichtig (Mamane *et al.*, 2004).

Nachdem Hardt *et al.* (2004) kürzlich zeigen konnten, dass GSK-3 $\beta$  über eIF2-Bepsilon die Entwicklung einer Herzhypertrophie verhindern kann, liegen mittlerweile eine ganze Reihe starker Hinweise vor, dass die Gründe für Hypertrophie eher auf translationaler Ebene, denn auf transkriptioneller Ebene zu suchen sind. Die Struktur- und Funktionsaufklärung der die Translation steuernden Proteine könnte möglicherweise in den nächsten Jahren dazu beitragen, dass selektive Arzneistoffe entwickelt werden, um in diese Prozesse gezielt einzugreifen.

#### **4.7. Ausblick**

In den letzten 30 Jahren hat die alterskorrigierte Mortalitätsrate infolge koronarer Herzkrankheit, Bluthochdruck und Myokardinfarkt in westlichen Ländern als Folge von Maßnahmen in der Primärprävention und verbesserten Behandlungsmöglichkeiten kontinuierlich abgenommen. Parallel dazu wird eine stetige Zunahme der Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz beobachtet. Neben anderen Faktoren ist dieses Phänomen vor allem durch die Änderung der Altersstruktur der Bevölkerung und durch längeres Überleben von Patienten mit Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zu erklären. Das Syndrom der Herzinsuffizienz geht nicht nur mit einer hohen Mortalität, Morbidität und beträchtlicher Einschränkung der Lebensqualität einher, sondern verursacht auch enorme Kosten.

Die derzeitige Standardtherapie zur Behandlung der Herzinsuffizienz besteht (nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Kardiologie) bei allen Schweregraden der Erkrankung (NYHA I-IV) aus ACE-Inhibitoren mit  $\beta$ -Blockern als Zusatzgabe. Für diese Medikation sind signifikant geringere kardiovaskuläre Letalität und Hospitalisationsrate durch klinische Studien belegt (ATLAS-Studie). Eine tendenziell niedrigere Gesamtletalität zeigte sich als nicht signifikant. Bei Auftreten von Nebenwirkungen in der Therapie mit ACE-Hemmern (Reizhusten) zeigen AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine vergleichbar positive Wirkung bei systolischer Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II-IV und stellen damit eine sinnvolle Alternative dar. Eine Überlegenheit dieser Therapie lässt sich aus den bisherigen Daten allerdings nicht ableiten (ELITE-II-Studie). Bei Herzinsuffizienz mit Flüssigkeitsretention ist die Therapie mit

Diuretika indiziert. In kontrollierten Studien führte diese Therapie bei symptomatischer Herzinsuffizienz zu einer signifikanten Gewichtsabnahme und Beschwerdebesserung. Weitere Daten zu „harten“ klinischen Endpunkten liegen zu dieser Arzneimittelklasse allerdings nicht vor.

Bei schwerer Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) hat sich die additive Gabe von Spironolacton bewährt (RALES-Studie), welches die unvollständige Inhibierung der Aldosteronsynthese durch ACE-Hemmer teilweise ausgleicht. Inwieweit die additive Gabe von Aldosteron-Antagonisten zu  $\beta$ -Blockern dem Patienten nützt, ist bislang ungeklärt. Ebenfalls bei schwerer Herzinsuffizienz ist die Gabe von Herzglykosiden indiziert, deren wesentlicher Nutzen jedoch in der Verbesserung der Belastbarkeit und der Symptomatik besteht. Ein Einfluss auf die Gesamtmortalität konnte für diese Substanzen nicht belegt werden.

Trotz dieser unterschiedlichen pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten liegt die 5-Jahres-Mortalitätsrate bei schwerer Herzinsuffizienz bei etwa 50%. Von einer wirklich effektiven Pharmakotherapie dieser Erkrankung kann also nach wie vor keine Rede sein. Auf Grund dieser Situation und der sich aus der Epidemiologie ableitenden Marktchancen suchen Wissenschaftler weltweit nach neuen Therapien, die in teilweise sehr innovativen Ansätzen münden. Die wichtigsten aktuellen Entwicklungen sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden.

In der EPHEBUS-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit dem neuen Aldosteronantagonisten Eplerenon einen hohen Nutzen für Herzinsuffizienz-Patienten bringt, der mit der diuretischen Wirkung allein nicht zu erklären ist. Wenn sich diese Ergebnisse bestätigen und sich der über den Aldosteron-Antagonismus hinausgehende Mechanismus aufklären lässt, entstehen möglicherweise neue Therapieansätze aus einem zunächst bekannten Prinzip.

Ein neues Wirkprinzip verspricht die parallele Blockade von ACE und der neutralen Endopeptidase (ACE/NEP-Inhibitoren). Die Leitsubstanz dieser Wirkstoffklasse, Omapatrilat, konnte in frühen, kleineren Studien einen erhöhten Blutdruck deutlich senken und darüber hinaus positive Auswirkungen auf das Krankheitsgeschehen bei Herzinsuffizienz zeigen. In den folgenden, größer angelegten Studien (OVERTURE, OCTAVE) gelang es zwar die blutdrucksenkende Wirkung zu belegen, es trat jedoch eine sehr hohe Rate schwerwiegender Nebenwirkungen auf (Angioödem). Auch ließ sich ein über die ACE-Inhibition hinausgehenden Nutzen nicht belegen.



Nach ersten Erfolgen in der Therapie mit dem unselektiven Endothelin-Antagonisten Bosentan befindet sich nun der ET-II-Antagonist Sitaxsentan (TBC11251) in der klinischen Prüfung. Die blutdrucksenkende Wirkung, vor allem durch Relaxation der Pulmonararterien ist hier unstrittig. Nachdem erste, kleinere Studien einen darüber hinausgehenden Nutzen in der Herzinsuffizienztherapie vermuten ließen, konnte dies bislang in größeren Studien mit „harten“ Endpunkten (wie z. B. Mortalität) nicht mehr bestätigt werden (Rich, McLaughlin; 2003).

Für das synthetische BNP-Analogon Nesiritid (Natreacor<sup>®</sup>) konnte in der PROACTION-Studie ein klarer Nutzen in der intensivmedizinischen Therapie der Herzinsuffizienz gezeigt werden. Nesiritid war hier in der Lage, überraschend schnell die klinischen Symptome der Erkrankung zu reduzieren. Diese Ergebnisse gingen mit einer signifikanten Senkung des Spiegels der Neurohormone Noradrenalin, Aldosteron und Endothelin einher (DiDomenico *et al.*; 2004).

Weitere Hoffnungsträger in der klinischen Entwicklung sind MC-135, eine Substanz, die die Calciumaufnahme des Sarkoplasmatischen Reticulums und die Sensitivität des Myofilamentes für Calcium erhöht (Yang; 2004), und einige Vasopressin-antagonisten. Besonders in der zuletzt genannten Substanzklasse ist die Entwicklung schon recht weit fortgeschritten. Erste Therapieerfolge von Conivaptan (YM 087) werden derzeit in der ADVANCE-Studie, weitere Substanzen in der ACTIV- und der CHF-Studie näher untersucht.

Ein vielversprechender Ansatz in der präklinischen Entwicklung ist ferner die Inhibition des Natrium-/Protonenaustauschers (NHE). Für diesen Mechanismus konnte *in vitro* und im Tiermodell ein positiver Effekt auf strukturellen Änderungen in der Hypertrophie-entwicklung („cardiac remodeling“) gezeigt werden (Doggrell, Hancox; 2003). Diese Daten erscheinen bedeutsam, sofern es gelingt die positiven Effekte in klinischen Studien auch am Menschen zu zeigen.

Auch bei Urotensin-II-Antagonisten, die zur Bluthochdrucktherapie entwickelt werden, lässt die Datenlage die Vermutung zu, dass Herzinsuffizienzpatienten von einer Therapie profitieren könnten. Allerdings existieren hier noch keine klinischen Studien, die diesen Effekt eingehender untersuchen.

Nachdem Plenz *et al.* (1998) und Kanda *et al.* (2004) zeigen konnten, dass die Expression von IL-6 im Myokard von Herzinsuffizienz-Patienten mit dem Verlauf der Krankheit und der Expression von ANP und BNP korreliert, bietet das in der

vorliegenden Arbeit untersuchte Modell  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierter Kardiomyozyten eine Möglichkeit, die Auswirkungen neu entwickelter Pharmaka an Hand der Expression dieser Markergene in Kombination mit CARP im Zellkulturmodell zu testen.

Mechanismen, die für die Untersuchung in einem solchen Modell in Frage kommen, wären z. B. die Inhibition der Glykogen-Kinase-Synthase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), der p38-MAP-Kinase oder neu entwickelter Substanzen, die in die Calcium-Homöostase eingreifen. Diese Wirkprinzipien werden derzeit als sehr vielversprechend für die Entwicklung neuer Wirkstoffe angesehen.

## **5. Zusammenfassung**

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist einer der stärksten Prädiktoren für die spätere Abnahme der Blutauswurfleistung des Herzens mit einer Gefährdung der Organdurchblutung und drohendem Kreislaufversagen, einem klinischem Syndrom, welches als Herzinsuffizienz bezeichnet wird. Die Herzhypertrophie ist eine Folge vieler verschiedener Herzerkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, dilatativer Kardiomyopathie oder Hypertonie. Ein besseres Verständnis dieser Entwicklung auf molekularer Ebene könnte dazu beitragen, mit neu zu entwickelnden Medikamenten gezielt in diese Prozesse eingreifen zu können, sie abzuschwächen, zu verhindern oder gar rückgängig zu machen. Das Ziel dieser Arbeit war, die molekularen Ursachen der Herzhypertrophieentwicklung durch eine globale Genexpressionsanalyse zweier Hypertrophie Modelle näher zu untersuchen und dabei neue Hypertrophie-marker zu identifizieren.

Dazu wurde sowohl aus Herzproben PKBy1-überexprimierender transgener Mäuse, welche eine massive Herzhypertrophie entwickeln, als auch aus  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten RNA isoliert und mit dieser cDNA-Microarrays hybridisiert.

Die Auswertung der differentiell exprimierten Gene in beiden Modellen ergab keine eindeutigen Hinweise auf universelle Faktoren, die für die Hypertrophieentwicklung verantwortlich gemacht werden könnten. Bei näheren Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die Mehrzahl der regulierten Gene einen Versuch der Kardiomyozyten repräsentiert, die Hypertrophieentwicklung zu kompensieren. Im Modell der PKBy1-überexprimierenden Mäuse konnte durch eine „*in silico*“-Promotoranalyse ein möglicher Einfluss von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Klasse auf die differentielle Expression vieler regulierter Gene gefunden werden. Unter Zuhilfenahme eines Forkhead-Reporter-Systems konnte in verschiedenen Zellkulturmodellen ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem konstitutiv-aktiven Transgen und eben diesen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Darüber hinaus gelang es, anhand zweier Reportersysteme für die wichtigen Hypertrophie marker ANF und BNP zu zeigen, dass sich diese beiden Gene durch die Koexpression eines Forkhead-Transkriptionsfaktors induzieren lassen.

Im Modell der  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gelang es, durch eine „*in silico*“-Promotoranalyse cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren sowie

Faktoren der EGR-Klasse als mögliche Auslöser der beobachteten Genregulation zu identifizieren. Dieses Ergebnis passte sehr gut zu den beobachteten transkriptionellen Veränderungen, da sowohl die Transkriptionsfaktoren selbst, als auch viele in den cAMP-Stoffwechsel involvierte Transkripte sehr stark induziert waren. In beiden untersuchten Modellen stimmten nur wenige differentiell exprimierte Transkripte überein und diese bestanden vorwiegend aus den klassischen Hypertrophiemarkern. Als möglicher neuer Hypertrophiemarker wurde das „Cardiac Adriamycin Responsive Protein“ (CARP) identifiziert, welches in beiden Modellen deutlich induziert war. In Kombination mit der Beobachtung, dass viele der jeweils regulierten Gene mit einer antihypertrophen Wirkung in Verbindung gebracht werden, legt den Schluss nahe, dass die transkriptionellen Veränderungen den Versuch der Zellen widerspiegeln, der Hypertrophie entgegenzuwirken, und dass die hypertrophieauslösende Wirkung durch andere, nicht-transkriptionelle Steuerungsmechanismen der Zelle vermittelt wird.

Frühere Arbeiten, welche die transkriptionellen Veränderungen in anderen Hypertrophie modellen untersuchten, sowie neuere Hinweise aus der Literatur und weitere in der Abteilung durchgeführte Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Hypertrophieentwicklung eher auf translationaler Ebene reguliert wird. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass PKB $\gamma$ 1-überexprimierende Mäuse die größte jemals beobachtete Herzhypertrophie entwickeln und der PKB/GSK-3 $\beta$ -Signalweg bekanntermaßen translationelle Vorgänge in der Zelle steuert. Weitere Arbeiten in dieser Richtung könnten somit neue, vielversprechende Therapieansätze eröffnen.

## 6. Literaturverzeichnis

Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R. (2000) Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension*. **36** 48-53.

Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN. (2001) Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res*. **89** 997-1004.

Anversa P, Kajstura J. (1998) Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*. **83**, 1-14.

Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T. (1995) Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*. **268** 2084-91.

Aronow BJ, Toyokawa T, Canning A, Haghighi K, Delling U, Kranias E, Molkentin JD, Dorn GW 2nd. (2001) Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics*. **6** 19-28.

Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N, Nachman I, Schummer M, Yakhini Z. (2003) Tissue classification with gene expression profiles. *J Comput Biol*. **7** 559-83.

Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ. (2000) Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. **32** 817-30.

Boluyt MO, Zheng JS, Younes A, Long X, O'Neill L, Silverman H, Lakatta EG, Crow MT. (1997) Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ Res*. **81** 176-86.

Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. (1998) Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res*. **83**, 580-93.

Booz GW, Baker KM. (1995) Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* **30** 537-43.

Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. (1997) Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. : *J Clin Invest.* **100** 2189-95.

Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell.* **64** 573-84.

Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD. (2002) PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol.* **156** 905-19

Brazma A, Vilo J. (2000) Gene expression data analysis. *FEBS Lett.* **25** 17-24.

Bueno OF, De Windt LJ, Lim HW, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. (2001) The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res.* **88** 88-96.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19** 6341-50.

Buxton IL, Brunton LL. (1985) Action of the cardiac alpha 1-adrenergic receptor. Activation of cyclic AMP degradation. *J Biol Chem.* **260**, 6733-7.

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. (1998) Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest.* **101** 812-8.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, De Assis JM, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-Silva MD. (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol.* **84** 201-6.

Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG, Dyck JR. (2004) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem*. May 24 epub ahead of print

Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. (2001) Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **97** 2115-20.

Cook SA, Matsui T, Li L, Rosenzweig A. (2002) Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J Biol Chem*. **277** 22528-33.

Crabtree GR, Olson EN. (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. **109** Suppl:S67-79.

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. **390** 88-91.

D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW 2nd. (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94** 8121-6.

De Ketelaere A, Vermeulen L, Vialard J, Van De Weyer I, Van Wauwe J, Haegeman G, Moelans I. (2004) Involvement of GSK-3beta in TWEAK-mediated NF-kappaB activation. *FEBS Lett*. **566** 60-4.

De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T, Molkentin JD. (2000) Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem*. **275** 13571-9.

Doggrell SA, Hancox JC (2003) Is timing everything? Therapeutic potential of modulators of cardiac Na(+) transporters. *Expert Opin Investig Drugs*. **12** 1123-42

DiDomenico RJ, Park HY, Southworth MR, Eyrich HM, Lewis RK, Finley JM, Schumock GT Guidelines for Acute Decompensated Heart Failure Treatment. *Ann Pharmacother* **38** 649-60

Donohue PJ, Richards CM, Brown SA, Hanscom HN, Buschman J, Thangada S, Hla T, Williams MS, Winkles JA. (2003) TWEAK is an endothelial cell growth and

chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23** 594-600.

Duan C, Liimatta MB, Bottum OL. (1999) Insulin-like growth factor (IGF)-I regulates IGF-binding protein-5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B/Akt, and p70 S6 kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* **274** 37147-53.

Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ. (2002) Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res* **90** 814-9.

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Doring V, Kalmar P, Hoppner W, et al. (1992) Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res.* **70** 688-96.

Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. (2002) Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** 11363-8.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16** 1472-87.

Frey N, Olson EN. (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* **65** 45-79

Gaudin C, Ishikawa Y, Wight DC, Mahdavi V, Nadal-Ginard B, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ. (1995) Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice. *J Clin Invest.* **95** 1676-83.

Ghosh S, Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* **109** S81-96.

Ginger RS, Dalton EC, Ryves WJ, Fukuzawa M, Williams JG, Harwood AJ. (2000) Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a Dictyostelium STAT protein. *EMBO J.* **19** 5483-91.



Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. (1996) Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* **78** 954-61

Glennon PE, Sugden PH, Poole-Wilson PA (1995) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J* **73** 496–499.

Gosau N, Fahimi-Vahid M, Michalek C, Schmidt M, Wieland T. (2002) Signalling components involved in the coupling of alpha 1-adrenoceptors to phospholipase D in neonatal rat cardiac myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **365** 468-76.

Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkenin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, Force T. (2000) Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol.* **151** 117-30.

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* **1697**(1-2):3-16.

Hardt SE, Tomita H, Katus HA, Sadoshima J. (2004) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2Bepsilon by glycogen synthase kinase-3beta regulates beta-adrenergic cardiac myocyte hypertrophy. *Circ Res.* **94** 926-35.

Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Tsutsui H, Kaibuchi K, Takeshita A. (2004) Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* **109** 2234-9.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **10** 986-94.

Henrich CJ, Simpson PC. (1988) Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to alpha 1-adrenergic and phorbol ester stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* **20** 1081-5.

Hines WA, Thorburn A. (1998) Ras and rho are required for galphaq-induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **30** 485-94.

Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, Muller W, Chien KR. (1999) Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell.* **97** 189-98.

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* **406** 86-90.

Hoshijima M, Chien KR. (2002) Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest.* **109** 849-55.

Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH. (1998) The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem.* **273** 7725-30.

Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR. (1995) Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem.* **270** 23173-8.

Ichida M, Finkel T. (2001) Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* **276** 3524-30.

Ihara Y, Suzuki YJ, Kitta K, Jones LR, Ikeda T. Modulation of gene expression in transgenic mouse hearts overexpressing calsequestrin. *Cell Calcium.* **32** 21-9.

*Int J Clin Pract Suppl.* **100**, 21-3.

Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR. (1990) Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem.* **265**, 13809-17.

Kamanga-Sollo E, Pampusch MS, White ME, Dayton WR. (2003) Role of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in TGF-beta- and GDF-8 (myostatin)-induced

suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. *J Cell Physiol.* **197** 225-31.

Kanda T, Takahashi T. (2004) Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J.* **45** 183-93.

Kanno Y, Kaneko K, Kaneko M, Kotaki S, Mimura T, Takane H, Suzuki H. (2004) Angiotensin receptor antagonist regresses left ventricular hypertrophy associated with diabetic nephropathy in dialysis patients. *J Cardiovasc Pharmacol.* **43** 380-6.

Kato J, Kobayashi K, Etoh T, Tanaka M, Kitamura K, Imamura T, Koiwaya Y, Kangawa K, Eto T. (1996) Plasma adrenomedullin concentration in patients with heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 180-3.

Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA. (2000) Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* **101** 1130-7.

Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. (2002) Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol.* **93** 1168-80.

Klaembt K (2004) Untersuchungen zum Einfluss der Hemmung des Natrium/Protonenaustauschers auf die Entwicklung von Herzhypertrophie in adulten Kardiomyozyten (vorläufiger Arbeitstitel). Dissertation im Fachbereich 14 der JWG-Universität Frankfurt am Main.

Knight J. (2002) Minimum standards set out for gene-expression data. *Nature.* **28** 946.

Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR. (1993) The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* **268** 15374-80.

Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, Okabe M, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. (2000) Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective

signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** 315-9.

LaPointe MC, Mendez M, Leung A, Tao Z, Yang XP. (2003) Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286** H1416-24.

LaPointe MC, Wu G, Garami M, Yang XP, Gardner DG. (1996) Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes. *Hypertension.* 1996 Mar;27(3 Pt 2):715-22.

Lazou A, Sugden PH, Clerk A. (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem J.* **332** 459-65.

Lee JK, Nishiyama A, Kambe F, Seo H, Takeuchi S, Kamiya K, Kodama I, Toyama J. (1999) Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol.* **277** H1725-31.

Levy D, Wilson PW, Anderson KM, Castelli WP. (1990) Stratifying the patient at risk from coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study. *Am Heart J.* **119**, 712-7.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* **71** 418-35.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* **21** 20-4.

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res.* **93** 896-906.

Long CS, Ordahl CP, Simpson PC. (1989) Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest.* **83**, 1078-82.

Lopatin AN, Nichols CG. (2001) Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol.* **33** 625-38.

Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR, Gilbert EM. (1999) Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber geometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* **83** 1201-5.

Lu C, Schwartzbauer G, Sperling MA, Devaskar SU, Thamocharan S, Robbins PD, McTiernan CF, Liu JL, Jiang J, Frank SJ, Menon RK. (2001) Demonstration of direct effects of growth hormone on neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*. **276** 22892-900.

Mahalati K, Kahan BD. (2000) Pharmacological surrogates of allograft outcome. *Ann Transplant*. **5** 14-23.

Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. (2004) eIF4E-- from translation to transformation. *Oncogene*. **23** 3172-9.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. (2002) Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. **91** 1103-13.

Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A. (2002) Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem*. **277** 22896-901.

McPherron AC, Lee SJ. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94** 12457-61.

Meidell RS, Sen A, Henderson SA, Slahetka MF, Chien KR. (1986) Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am J Physiol*. **251**, H1076-84.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. **93** 215-28.

Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, Tschlis P, Vatner SF, Sadoshima J. (2000) The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **275** 14466-75.

Muller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, Schutz G, Schmitz W. (2003) Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J.* **17** 103-5.

Nicol RL, Frey N, Olson EN. (2000) From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **1** 179-223.

Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. (2001) Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* **61** 3124-30.

O'Connor PM, Kimball SR, Suryawan A, Bush JA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA. (2003) Regulation of translation initiation by insulin and amino acids in skeletal muscle of neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **285** E40-53.

Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM. (1998) Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J.* **17** 4304-12.

Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Sandberg C, Groggaard HK, Attramadal H. (2000) Induction of a myocardial adrenomedullin signaling system during ischemic heart failure in rats. *Circulation.* **101** 415-22.

Olson EN, Williams RS. (2000) Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell.* **101** 689-92.

Packer M. (1999) Implications of the ATLAS study for clinical practice. *Int J Clin Pract Suppl.* **100** 21-3

Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. (2000) Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** :931-6.

Plenz G, Song ZF, Reichenberg S, Tjan TD, Robenek H, Deng MC. (1998) Left-ventricular expression of interleukin-6 messenger-RNA higher in idiopathic dilated than in ischemic cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg.* **46** 213-6.

Post GR, Goldstein D, Thuerlauf DJ, Glembotski CC, Brown JH. (1996) Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* **271** 8452-7.

Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevycz T, Fidelman N, Desai K, Vranizan K, Lee EK, Coward P, Shah N, Warrington JA, Fishman GI, Bernstein D, Baker AJ, Conklin BR. (2000) Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** 4826-31.

Rich S, McLaughlin VV (2003) Endothelin receptor Blockers in cardiovascular disease. *Circul.* **108** 2184-90

Roman BB, Geenen DL, Leitges M, Buttrick PM. (2001) PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280** H2264-70.

Ruan Y, Kan H, Parmentier JH, Fatima S, Allen LF, Malik KU. (1998) Alpha-1A adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: inhibition by protein kinase A. *J Pharmacol Exp Ther.* **284** 576-85.

Ruwhof C, van der Laarse A. (2000) Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* **47** 23-37.

Sadoshima J, Izumo S. (1995) Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **77** 1040-52.

Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, Yang G, Warden J, Liu J, Takagi G, Karoor V, Hong C, Johnson GL, Vatner DE, Vatner SF. (2002) The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* **110** 271-9.

Sah VP, Minamisawa S, Tam SP, Wu TH, Dorn GW 2nd, Ross J Jr, Chien KR, Brown JH. (1999) Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J Clin Invest.* **103** 1627-34.

Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, Dorn GW 2nd. (1998) Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation* **97** 1488-95.

Salih DA, Tripathi G, Holding C, Szeszak TA, Gonzalez MI, Carter EJ, Cobb LJ, Eisemann JE, Pell JM. (2004) Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** 4314-9.

Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. (2001) Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* **104** 1286-91.

Schroder F, Klein G, Fiedler B, Bastein M, Schnasse N, Hillmer A, Ames S, Gambaryan S, Drexler H, Walter U, Lohmann SM, Wollert KC. (2003) Single L-type Ca(2+) channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice. *Cardiovasc Res.* **60** 268-77.

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* **14** 2501-14.

Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **11** 2537-48.

Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. (2002) Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* **22** 2799-809.

Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. (2003) Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst.* **95** 14-8.

Simpson P, McGrath A, Savion S. (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res.* **51** 787-801.



Simpson P. (1983 ) Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest.* **72**, 732-8.

Sugden PH, Clerk A. (1998) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* **76**, 725-46.

Sun Y, Weber KT. (2000) Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* **46** 250-6.

Sussman MA, Welch S, Walker A, Klevitsky R, Hewett TE, Price RL, Schaefer E, Yager K. (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J Clin Invest.* **105** 875-86.

Suzuki H, Nakamoto H, Okada H, Sugahara S, Kanno Y. (2003) A selective angiotensin receptor antagonist, Valsartan, produced regression of left ventricular hypertrophy associated with a reduction of arterial stiffness. *Adv Perit Dial.* **19**:59-66.

Takahashi K, Osanai T, Nakano T, Wakui M, Okumura K. (2002) Enhanced activities and gene expression of phosphodiesterase types 3 and 4 in pressure-induced congestive heart failure. *Heart Vessels.* **16** 249-56.

Teerlink JR, Massie BM. (1999) Beta-adrenergic blocker mortality trials in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* **84** 94R-102R.

Thomas JG, Olson JM, Tapscott SJ, Zhao LP. (2001) An efficient and robust statistical modeling approach to discover differentially expressed genes using genomic expression profiles. *Genome Res.* **11** 1227-36.

Thorburn A. (1994) Ras activity is required for phenylephrine-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cardiac muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **205** 1417-22.

Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr. (2002) Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res.* **91** 1127-34.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. (1997) Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain

natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*.; **96** 509-16.

Tu VC, Bahl JJ, Chen QM. (2002) Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. **300** 1101-10.

Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H. (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res*. **93**, 246-53.

Uozumi H, Hiroi Y, Zou Y, Takimoto E, Toko H, Niu P, Shimoyama M, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. (2001) gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. **276** 23115-9.

Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*. **380** 297-309.

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87** 1663-7.

Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR. (1998) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. **273** 2161-8.

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC. (1990) The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest*. **85**, 1206-14.

Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Edwards WD, Schaff HV, Burnett JC Jr. (1993) Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation* **88** 1004-9.

Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A. (1998) Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation*. **98** 100-3.

- Xiao RP. (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE*. **104** re15.
- Xu Q, Li S, Zhao Y, Maures TJ, Yin P, Duan C. (2004) Evidence that IGF binding protein-5 functions as a ligand-independent transcriptional regulator in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. **94** E46-54.
- Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. (2000) A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med*. **10** 298-303.
- Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. (1998) Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal*. **10**, 693-8.
- Yang JB (2004) Management of Chronic Heart Failure: What Do Recent Clinical Trials Teach Us? *Reviews in Cardiovascular Medicine* **5** S3-S9
- Yang LL, Gros R, Kabir MG, Sadi A, Gotlieb AI, Husain M, Stewart DJ. (2004) Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*. **109** 255-61.
- Yang TT, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW. (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*. **22** 3892-904.
- Yoshimura M, Mizuno Y, Nakayama M, Sakamoto T, Sugiyama S, Kawano H, Soejima H, Hirai N, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. (2002) B-type natriuretic peptide as a marker of the effects of enalapril in patients with heart failure. *Am J Med*. **112** 716-20.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. **342** 145-53.
- Zhang D, Gaussin V, Taffet GE, Belaguli NS, Yamada M, Schwartz RJ, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD. (2000) TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat Med*. **6** 556-63.

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. (1999) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol.* **19** 21-30.

Zimmermann M, Unger T. (2004) Challenges in improving prognosis and therapy: The Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global End point Trial Programme. *Expert Opin Pharmacother.* **5** 1201-8.

Zolk O, Marx M, Jackel E, El-Armouche A, Eschenhagen T. (2003) Beta-adrenergic stimulation induces cardiac ankyrin repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase. *Cardiovasc Res.* **59** 563-72.

Zou, Y; Evans, S; Chen, J; Kuo, H C; Harvey, R P; Chien, K R (1997) CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* **124**, 793-804.

Zuscik MJ, Chalothorn D, Hellard D, Deighan C, McGee A, Daly CJ, Waugh DJ, Ross SA, Gaivin RJ, Morehead AJ, Thomas JD, Plow EF, McGrath JC, Piascik MT, Perez DM. (2001) Hypotension, autonomic failure, and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **276** 13738-43.

## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial induzierte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate
<b>Strukturproteine</b>							
X12973	MLC1F/MLC3F gene for myosin alkali light chain	6,89	0	13,18	1,75E-29		
L31398	Dynamin 2	2,72	0,08	4,86	6,54E-04		
AF021836	hair keratin basic 5 (Hb5)	1,14	0,81	4,26	5,43E-03		
AJ223362	slow myosin heavy chain-beta	1,02	0,7	3,75	3,94E-08	-1,6	2,5
U03419	alpha-1 type I procollagen	1,35	1,30E-05	2,23	6,16E-05	1,4	1,9
J04992	Troponin I, skeletal, fast 2	6,53	3,12E-12	2,08	0,23		
AV091649	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	3,61	1,89E-04	1,08	0,56		
M19436	Myosin light chain, alkali, cardiac atria	2,43	1,55E-34	2,29	2,10E-03		
D49691	p50b (identical to LSP1 and pp52).	2,41	3,16E-16	2,24	0,05		
U51204	APC-binding protein EB2	2,24	2,48E-13	1,42	0,02		
<b>Signaltransduktion</b>							
D21165	neural visinin-like Ca2+-binding protein type 1 (NVP-1)	10,4	0	1,37	0,0027		
U58887	endophilin III	7,65	1,47E-17	3,2	0,05		
A1835990	RAB3B, member RAS oncogene family GTPase	5,07	1,66E-08	-2,81	0,54		
L34216	GTP-binding protein alpha-o subunit gene,	4,91	5,43E-03	2,62	1,53E-03		
AJ250489	receptor activity modifying protein 1 (Ramp1 gene)	4,01	0	2,22	2,84E-04	4,9	2,8
U23778	hematopoietic-specific early-response A1-b protein (A1b) gene	3,89	3,10E-03	4,19	8,72E-04	2,4	4,6
L12447	Insulin-like growth factor binding protein 5	3,83	0	5,32	0		
U93291	skeletal muscle calsequestrin	3,6	4,57E-42	1,5	0,002	2,7	1
AW061307	TNF intracellular domain-interacting protein	3,3	2,95E-03	1,23	0,4	2,0	1,9
U56651	neurexophilin 1 (Np1) gene,	3,24	5,06E-03	-1,76	0,64		
M36777	Guanine nucleotide binding protein, alpha	2,96	0	1,85	2,96E-07		
X63615	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	2,75	3,78E-08	1,09	0,44	4,9	1,9
AF096867	synapsin IIb mRNA, complete cds	2,73	8,43E-04	1,37	0,07		
A1639925	G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK-5)	2,29	3,72E-39	2,08	1,21E-12		
A1850079	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase	2,15	6,59E-29	1,74	0,00219		
<b>Ionenkanäle/Transporter</b>							
AJ225123	hyperpolarization-activated cation channel	10,46	0	1,89	0,02		
U73487	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 2 delta subunit	1,71	5,38E-14	2,3	7,04E-05		
AV241808	calcium-transporting ATPase (Atp2a1)	26,74	0	1,36	0,00198	16,8	1,6
AJ012754	glycoprotein-associated amino acid transporter y+LAT1a	9,4	5,47E-19	2,62	1,66E-05		
X67140	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	8,39	0	1,51	0,000409		
U38652	Solute carrier family 22, member 1	7,49	5,15E-09	1,91	0,03		
D38216	RyR1 mRNA for skeletal muscle ryanodine receptor	7	1,54E-12	-1,14	0,65		
AJ012569	voltage-gated calcium channel, alpha-1-G subunit	5,6	2,69E-03	6,1	0,02		
U48398	Aquaporin 4	4,85	2,07E-09	1,4	0,03		
AF080469	glucose-6-phosphatase transport protein 1 (G6pt1)	4,84	3,70E-03	1,75	4,97E-06		
AW124340	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	4,26	2,52E-16	1,08	0,45		
AF032099	voltage-gated potassium channel Kv1.7 (Kcnc7)	3,96	5,83E-03	1,2	0,53		
U88623	Aquaporin 4	3,56	3,43E-10	2,32	4,56E-04		
L48687	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide	3,02	4,81E-11	3,22	2,31E-03		
AF033017	Potassium channel, subfamily K, member 1	2,28	2,14E-09	1,23	0,000103	2,4	1,1
<b>Rezeptoren</b>							
M14343	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2,16	0,08	2,62	1,97E-03		
U96682	immunoglobulin-like receptor PIRA1 (6M21)	1,22	0,62	2,61	6,71E-03		
Z18280	Neuropeptide Y receptor Y1	6,15	1,11E-19	1,78	0,22		
D13458	Prostaglandin E receptor EP4	4,18	1,99E-06	1,07	0,93		
AV370035	CCR-5 chemokine receptor 5	3,12	3,62E-03	2,53	0,27		
U56819	mcp-1 receptor	3,1	6,95E-05	1,59	0,15		
Y12738	Adrenergic receptor, alpha 1b	2,95	1,49E-08	1,16	0,5		
U04204	Fibroblast growth factor regulated protein, TWEAK-Receptor	2,65	3,26E-09	1,77	0,0019		
AF022990	CC chemokine receptor-5 (CCR5)	2,44	5,78E-04	1,75	0,11		
U04828	Angiotensin II receptor, type 2	2,29	1,81E-03	1,6	0,7		
U21729	Corticotropin releasing hormone receptor 2	2,01	7,95E-03	1,21	0,06		

## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial induzierte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate
<b>Extrazelluläre Proteine</b>							
L04503	Uteroglobin	31,89	3,92E-12	45,74	9,23E-13	6,5	14,3
M16819	tumor necrosis factor-beta	1,05	0,96	8,97	2,54E-03		
D16497	Brain natriuretic peptide precursor	-1,29	2,75E-03	3,66	2,71E-06	-1,8	3,6
K02781	Atrial natriuretic peptide precursor	1,83	9,96E-27	2,09	1,01E-03	1,8	2,5
U84005	Myostatin	22,2	0	3,1	1,50E-13	13,0	2,3
AF045887	Angiotensinogen	7,73	1,14E-08	1,18	0,52		
AI844853	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	6,46	1,14E-27	1,76	0,000726		
AF100777	connective tissue growth factor related protein WISP-1 (Wisp1)	6,15	8,04E-13	2,31	1,29E-03		
AF065947	NOD/LtJ small inducible cytokine A5 (ScvA5) mRNA,	5,12	5,12E-03	2,29	2,00E-01		
AI842145	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	5,08	1,15E-06	1,61	0,06		
X13986	minopontin (Osteopontin precursor, SPP-1)	5,03	1,70E-05	1,23	0,52		
U77630	Adrenomedullin	4,72	0	2,26	1,00E-02	3,8	2,4
U68058	Secreted frizzled-related sequence protein 3	4,45	4,72E-06	3,87	0,18		
U66201	Fibroblast growth factor	3,42	1,55E-04	2,04	0,04		
U16985	lymphotoxin-beta	2,98	2,48E-03	1,06	0,96		
X69620	Inhibin beta-B	2,83	2,95E-04	1,12	0,67		
M19681	Small inducible cytokine A2	2,82	6,23E-05	1,14	0,52		
V00741	Epidermal growth factor	2,82	3,37E-13	4,59	4,19E-03		
M33960	Mouse plasminogen activator inhibitor (PAI-1)	2,54	1,58E-10	1,53	5,13E-06		
Z31362	(Bab/C) Tx01 mRNA	2,33	6,46E-08	1,22	0,46		
U47815	stanniocalcin gene,	2,31	5,11E-04	-1,13	0,85		
AF091351	homeobox protein NKX-2.5 (Nkx-2.5) gene	2,2	3,03E-13	1,56	0,00564	1,4	1,8
<b>Transkriptionsfaktoren</b>							
X99572	C-fos induced growth factor	4,08	6,08E-16	8,91	1,24E-04		
AF041847	cardiac ankyrin repeat protein MCARP mRNA	1,6	2,68E-12	3,95	8,33E-33		
D13664	Osteoblast-specific transcription factor 2	1,18	0,05	2,62	9,84E-04		
U33005	tbc1 mRNA,	3,12	4,84E-25	1,68	6,00E-02		
D50418	AREC3,	2,2	1,59E-05	1,82	0,00151		
X67083	chop-10 mRNA (gadd153 , C/EBP homologous )	2,08	1,63E-08	1,1	0,49		
<b>Immunantwort</b>							
J04170	CD72 antigen	4,59	4,85E-18	2,69	1,50E-03		
M18237	Ig kappa chain V-region	1,7	0,29	8,07	2,61E-07		
M80423	IgK chain gene,	1,47	0,59	7,61	1,04E-08		
AJ235940	IgVk aj4	-1,33	0,7	7,33	3,41E-03		
V00817	Mouse germ line gene fragment for mu-immunoglobulin C-terminus	1,19	0,61	2,5	2,56E-03		
U23025	C57BL/6 immunoglobulin heavy chain V region	-1,09	0,85	2,06	2,63E-03		
U35330	Histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3,37	2,16E-04	1,27	0,00148		
X16834	Mac-2 antigen	3,27	5,70E-12	2,96	3,88E-04		
X05719	immunoglobulin superfamily member CTLA-4	3,27	2,40E-04	-1,27	0,43		
M58661	CD24a antigen	3,16	2,60E-20	1,44	1,01E-08		
M21932	MHC class II H2-I-A-beta gene (k haplotype)	2,71	8,84E-04	6,1	0,02		
J00475	germline IgH chain gene, DJC region- segment D-FL16.1	2,56	7,09E-03	-1,17	0,87		
M62470	Thrombospondin 1	2,28	6,12E-07	2,69	1,92E-05		
AF010452	MHC class I related protein 1 isoform E (MR1E) pseudogene	2,15	4,84E-03	1,49	0,12		
<b>Enzyme</b>							
X66402	Matrix metalloproteinase 3	1,71	8,61E-03	3,1	6,60E-04		
U13705	Glutathione peroxidase 3	1,96	0	2,57	2,21E-07		
X53928	Glucose-6-phosphate isomerase	1,28	3,00E-08	2,27	2,18E-08		
U58332	receptor tyrosine kinase	8,34	2,35E-29	1,31	0,00528		
D88899	kidney-derived aspartic protease-like protein,	4,67	2,45E-03	2,42	0,53		
AF007267	phosphomannomutase Sec53p homolog	3,94	6,16E-03	2,26	9,00E-02		
AI842940	phospholipase C, gamma 2	3,75	7,42E-04	1,29	0,03		
X57437	Histidine decarboxylase cluster	3,61	3,35E-06	-1,31	0,43		
M82831	Macrophage metalloelastase	3,39	3,14E-04	1,62	0,4		
L06047	Glutathione-S-transferase, alpha 1 (Ya)	3,2	3,92E-44	1,66	0,04		
AI842259	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3	3,15	6,49E-41	3,76	1,68E-03		
J04627	NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	3,05	1,47E-07	1,52	0,2		
X92523	Calpain 3	2,88	3,09E-10	1,35	0,000319		
AB017482	retinal oxidase/aldehyde oxidase	2,4	7,90E-18	1,51	0,0000549		
U16162	prolyl 4-hydroxylase alpha(I)-subunit mRNA,	2,33	2,54E-12	1,52	0,15		
D78646	zeta-crystallin/quinone reductase	2,29	8,11E-04	2,29	0,68		
AJ223208	cathepsin S,	2,27	1,74E-16	2,15	1,91E-04		
AF037260	non-receptor protein tyrosine kinase Ack mRNA,	2,15	5,24E-05	1,67	0,03		
AI850079	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase	2,15	6,59E-29	1,74	0,00219		
U38261	extracellular superoxide dismutase (SOD3)	2,03	2,80E-17	1,69	0,000663		
J02652	Malic enzyme, malate oxidoreductase	2,03	3,57E-41	1,68	0,000001		
U58513	Rho-associated, coiled-coil forming protein kinase ROCK-2	1,76	5,12E-27	1,99	0,01	2,9	2,2

## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial induzierte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate

EST's					
AV331957	EST sim. To myelin-associated glycoprotein (Mag),	N/A	N/A	12,61	2,91E-03
AV355874	unknown EST	N/A	N/A	12,28	9,36E-03
AW125581	unknown EST	N/A	N/A	7,07	2,56E-03
AV268095	EST sim. To AKR alpha M290 integrin	N/A	N/A	6,15	7,90E-03
AI854771	unknown EST	N/A	N/A	3,77	9,40E-06
AI595322	unknown EST	N/A	N/A	2,77	6,83E-03
AW227545	unknown EST	N/A	N/A	2,5	6,63E-12
AI842649	EST sim. To myosin, light polypeptide 9, regulatory (Myl9)	N/A	N/A	2,47	1,42E-03
AI647612	unknown EST	N/A	N/A	2,15	5,29E-04
AI841654	EST sim. To G protein-coupled receptor 56	N/A	N/A	2,09	1,82E-03
AV223645	EST sim. To uridine monophosphate kinase (Umpk)	N/A	N/A	2,05	3,65E-04
AI875934	EST sim. To lysophospholipase 1	N/A	N/A	2,02	5,97E-11
AA840463	EST sim. To lysophospholipase 1	N/A	N/A	2,01	1,78E-08
AA690483	unknown EST	13,03	0	3,91	1,65E-04
AI840035	unknown EST	9,31	0,00E+00	N/A	N/A
AV334573	unknown EST	5,53	5,14E-06	2,27	5,65E-03
T25645	unknown EST	4,82	6,56E-10	N/A	N/A
AA163268	unknown EST	3,63	4,80E-03	N/A	N/A
AW047756	unknown EST	3,59	7,48E-03	N/A	N/A
AW122114	unknown EST	3,47	1,85E-11	N/A	N/A
AW047237	unknown EST	3,12	2,70E-03	N/A	N/A
AW123618	EST sim to frizzled homolog 2 (from: Drosophila, 7-TM-Receptor-like structure)	3,05	2,67E-03	N/A	N/A
AW050287	unknown EST	2,97	3,00E-04	N/A	N/A
AW04787	unknown EST	2,86	4,94E-03	N/A	N/A
AV049722	unknown EST	2,82	4,69E-03	N/A	N/A
AW124113	unknown EST	2,74	3,89E-05	N/A	N/A
AA796791	unknown EST	2,65	7,72E-03	N/A	N/A
AI846185	EST sim. to GTPase-activator protein for Rho-like GTPases	2,62	2,23E-17	N/A	N/A
AI181346	unknown EST	2,54	1,25E-05	N/A	N/A
AV280750	EST sim. To MAPK 10	2,53	1,81E-05	N/A	N/A
AV374213	EST sim. To guanine nucleotide binding protein, alpha o	2,46	6,76E-07	N/A	N/A
AW049732	unknown EST	2,4	1,09E-33	N/A	N/A
AI849939	EST sim. To DNA-damage-inducible transcript 4 (Ddit4)	2,39	2,98E-04	N/A	N/A
AW122114	unknown EST	2,33	1,37E-27	N/A	N/A
AI626942	unknown EST	2,33	4,49E-07	N/A	N/A
AI850558	EST sim. To alpha-2-macroglobulin-P (A2mp)	2,28	2,68E-04	N/A	N/A
AW260308	unknown EST	2,24	1,79E-08	N/A	N/A
AW048272	EST sim. To SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein (SH3BGR gene)	2,16	0	2,18	8,54E-37
AI851573	unknown EST	2,08	3,35E-07	N/A	N/A
AI836034	unknown EST	2,04	1,96E-11	N/A	N/A
AW122536	EST sim. To Profilin 2	2,03	4,64E-38	N/A	N/A

2,9 1,9

## Unbekannte Funktion

D78265	pancortin-4,	5,18	4,78E-30	2,06	0,02
U95498	AF1q	4,46	9,77E-30	1,58	0,11
X80339	Sine oculis-related homeobox 1, (Drosophila)	4,25	1,39E-08	2,14	0,02
AJ005661	Small proline-rich protein 2C	3,59	1,79E-04	9,11	0,12
M34896	Ecotropic viral integration site 2	2,45	5,53E-03	1,81	0,15
X61452	H5 clone	2,26	3,39E-29	1,2	0,17
L20315	MPS1	2,2	9,77E-04	1,65	0,26
AB014485	RA70,	2,2	3,01E-04	1,28	0,00817
Y07693	NfiC1B	2,14	6,97E-04	1,61	0,2
AF073309	nonsyndromic hearing impairment protein (DFNA5)	2,14	9,03E-03	-1,06	0,75
AF002283	alpha-actinin-2 associated LIM protein	2,1	6,97E-11	1,69	1,64E-06

## Stoffwechsel

M77497	Cytochrome P450, 2f2	3,25	3,39E-04	1,28	0,07
X82648	apolipoprotein D	3,24	1,89E-04	1,15	0,34
AI326963	angiotensin-like 4 (Angptl4)	3,18	1,49E-04	-1,96	0,26
AF093669	peroxisomal biogenesis factor (Pex11a) mRNA,	2,04	1,68E-08	-1,09	0,59

## Zellzyklus

D30743	wee1 kinase	2,86	1,25E-04	1,17	0,37
AF055638	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (Gadd45g)	2,46	7,59E-09	-1,11	0,9

## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial unterdrückte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate
<b>Strukturproteine</b>							
U82758	lung-specific membrane protein	-1,32	0,21	-2,85	2,06E-05		
M12347	Actin, alpha 1, skeletal muscle	-2,02	2,70E-04	1,99	0,17		
AJ001038	Myomesin	-2,71	6,16E-18	-2,03	4,74E-06		
X13297	vascular smooth muscle alpha-actin	-3,71	7,37E-09	-1,15	0,63	-4,2	1
<b>Signaltransduktion</b>							
U67188	G protein signaling regulator RGS5 (rgs5)	-2,22	5,90E-09	-1,32	0,3		
L32752	GTPase (Ran)	-1,03	0,37	-2,22	4,54E-03		
AF036535	AMP activated protein kinase	-1,11	0,67	-2,82	6,38E-04		
U67187	G protein signaling regulator RGS2 (rgs2)	-1,6	1,15E-10	-3,11	1,88E-24		
X65687	AKT-1	-1,63	5,56E-22	-2,52	5,13E-06	N/A	-3,2
AI845798	phospholipase A2	-1,73	8,57E-20	-2,96	4,57E-03		
AV347228	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	-2,12	2,96E-14	-2,12	2,96E-14		
AA600647	Ras-related GTP binding D (Rragd)	-2,19	2,99E-22	-1,01	0,86		
AI850288	Rhopilin, Rho GTPase binding protein 2 (Rhpn2)	-2,22	6,76E-03	-2,9	3,72E-04		
U22445	AKT-2	-1,68	1,00E-17	-2,42	1,80E-04	-1,8	-2,5
<b>Ionenkanäle/Transporter</b>							
L22218	cardiac KV1.5 delayed rectifier K+ channel protein	-1,76	6,62E-05	-3,18	9,47E-04		
AF020195	pancreas sodium bicarbonate cotransporter	-2,35	1,94E-08	-1,42	0,02		
L36179	voltage-gated sodium channel	-2,53	4,68E-03	-1,14	0,92		
D86037	Sulfonylurea receptor 2	-3,58	4,65E-41	-4,99	2,71E-19	-3,3	-4
AF057524	membrane protein Rh30 (Rh)	-3,97	3,58E-05	-1,43	0,000158		
AF058054	monocarboxylate transporter 2 (mMCT2)	-4,28	1,07E-18	1,01	0,98		
<b>Rezeptoren</b>							
AF000236	Chemokine orphan receptor 1	-1,6	1,08E-04	-3,09	3,80E-06		
<b>Extrazelluläre Proteine</b>							
X02891	Growth hormone (Somatostatin?)	-1,01	0,95	-2,01	2,59E-05		
X55573	Brain derived neurotrophic factor	-2,31	7,33E-09	1,02	0,87		
X53257	Neurotrophin 3 NGF	-3,04	5,99E-04	-1,39	0,17		
AF004833	tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	-9,18	1,20E-28	-1,67	0,00128		
<b>Transkriptionsfaktoren</b>							
AF043939	cell cycle regulatory transcription factor DP1 (DP1)	-2,53	3,56E-04	1,15	0,59		
D49473	SRY-box containing gene 17	-3,3	0,03	-2,01	3,31E-03		
D63902	Zinc finger protein 147	-1,16	7,91E-03	-2,12	3,29E-03		
X16493	Zinc finger protein 1	-1,59	0,02	-3,8	5,08E-13		
Z11886	Notch gene homolog 1	-1,27	0,37	-13,38	3,37E-06		
<b>Immunantwort</b>							
AF109905	major histocompatibility locus class III regions Hsc70t	-2,8	2,97E-03	1,15	0,21		
V00789	gene fragment for delta-immunoglobulin	1,15	0,71	-2,39	5,31E-03		
AF030001	major histocompatibility locus class III region-butrophilin-like protein gene	1,09	0,08	-2,39	2,59E-03		
M29007	complement factor H-related protein	-1,01	0,98	-3,07	3,83E-04		
M26071	Coagulation factor III (Thromboplastin)	-2,46	5,59E-25	-2,18	8,94E-07		
<b>Enzyme</b>							
AF068199	D-dopachrome tautomerase	-2,09	1,71E-13	-2,11	4,49E-04		
L24755	Bone morphogenetic protein 1	-1,6	0,21	-2,02	7,82E-03		
AB007136	Protease (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	-1,42	3,73E-16	-2,14	1,13E-21		
X51942	Phenylalanine hydroxylase	-3,61	0,11	-10,32	3,49E-19		
D86332	Matrix metalloproteinase 15	-2,12	1,62E-09	-1,12	0,3		
M88694	thioether S-methyltransferase mRNA,	-2,2	4,46E-06	-2,59	4,03E-04		
M60803	Glutamine synthetase pseudogene 1	-2,31	2,40E-04	-2	0,02		
D28941	alpha-2,3-sialyltransferase,	-2,32	5,35E-10	-2,1	3,69E-11		
L16992	branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase E1 beta-subunit	-2,34	0	-2,1	3,69E-11		
AB005450	carbonic anhydrase XIV	-2,34	0	-3,83	5,47E-44		
L09192	pyruvate carboxylase mRNA,	-2,51	2,12E-05	1,1	0,37		
Z11774	Fumarylacetoacetate hydrolase	-2,53	1,12E-09	-1,63	0,03		
J04696	glutathione S-transferase class mu (GST5-5)	-2,73	0	-2,36	5,81E-03		
AB015728	granzyme M,	-2,87	5,82E-03	-4,66	8,49E-03		
AW046627	Serin-/Threonin Kinase Pim-3	-3,8	6,88E-16	-2,05	2,08E-06	-5,2	-1,8
AI849354	glycine C-acetyltransferase	-4,5	3,22E-13	-1,65	4,91E-03		
X98056	Glutathione S-transferase, theta 2	-5,18	7,11E-03	-1,84	0,33		
AF017639	carboxypeptidase X2	-9,48	1,33E-23	-2,22	2,43E-06		
AF017639	carboxypeptidase X2	-16,41	2,98E-29	-5,26	3,55E-03		
AB006361	prostaglandin D synthetase	-17,06	1,74E-35	-7,51	0		
AB006361	prostaglandin D synthetase	-34,36	9,39E-41	-10,29	2,65E-28		



## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial unterdrückte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate
<b>EST s</b>							
AA606587	EST sim. To adenylosuccinate lyase	N/A	N/A	-2,02	5,07E-08		
AA833425	unknown EST	N/A	N/A	-2,03	1,04E-06		
AV364086	EST sim. To thrombomodulin	N/A	N/A	-2,04	1,22E-05		
AW047521	unknown EST	N/A	N/A	-2,05	4,58E-03		
AI255450	unknown EST	N/A	N/A	-2,05	3,94E-03		
AI843564	EST sim. To translocated promoter region protein (nuclear pore complex)	N/A	N/A	-2,05	5,49E-10		
AV255723	unknown EST	N/A	N/A	-2,11	2,51E-03		
AW045474	EST sim. To ADP-ribosylation factor-like 3 (Arl3)	N/A	N/A	-2,15	1,19E-04		
AI132239	EST sim. To transcription elongation factor TFIIIS h.	N/A	N/A	-2,16	2,89E-07		
AW121875	unknown EST	N/A	N/A	-2,21	1,06E-17		
AW046181	EST sim. To serum/glucocorticoid regulated kinase	N/A	N/A	-2,26	6,50E-04		
AI839886	EST sim. To amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Apbb1).	N/A	N/A	-2,29	1,02E-05		
AW045632	unknown EST	N/A	N/A	-2,34	2,55E-08		
AI561567	EST sim. To A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9 (Akap9)	N/A	N/A	-2,35	2,05E-04		
AW046496	unknown EST	N/A	N/A	-2,43	9,01E-03		
AI837621	unknown EST	N/A	N/A	-2,47	8,67E-03		
AI853019	unknown EST	N/A	N/A	-2,48	2,62E-03		
AV330895	unknown EST	N/A	N/A	-2,49	1,75E-03		
AI661370	unknown EST	N/A	N/A	-2,52	9,17E-05		
AV139913	EST sim. To chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12), transcript variant 2	N/A	N/A	-2,58	7,59E-04		
AI843685	unknown EST	N/A	N/A	-2,65	1,05E-08		
AI841387	EST sim. To lactamase, beta 2	N/A	N/A	-2,72	1,91E-03		
AW226939	EST sim. To carboxylesterase 3	N/A	N/A	-2,98	1,02E-11		
AA222943	unknown EST	N/A	N/A	-3,35	4,94E-05		
W41560	unknown EST	N/A	N/A	-4,05	2,22E-03		
AI603944	EST sim. To Homo sapiens zinc finger protein 19 (KOX 12)	N/A	N/A	-5,04	4,77E-16		
AW049331	unknown EST	N/A	N/A	-7,16	1,23E-09		
C76080	unknown EST	N/A	N/A	-9,2	1,28E-03		
AI846418	unknown EST	N/A	N/A	-10,17	1,01E-03		
AW121453	unknown EST	-2,02	1,60E-18	N/A	N/A		
AW045278	EST sim. To ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6 (Cln6)	-2,03	9,25E-04	N/A	N/A		
AI154017	unknown EST	-2,04	3,94E-05	N/A	N/A		
AW048512	unknown EST	-2,04	5,64E-37	-3,07	7,74E-13		
AI847162	unknown EST	-2,05	4,85E-05	N/A	N/A		
AV324817	EST sim. To N-acetyltransferase ARD1 homolog	-2,12	8,52E-03	N/A	N/A		
AA815845	unknown EST	-2,13	4,99E-03	N/A	N/A		
AA796690	unknown EST	-2,13	1,69E-04	N/A	N/A		
AW124470	unknown EST	-2,14	2,14E-09	N/A	N/A		
AW047343	EST sim. To D site albumin promoter binding protein	-2,16	6,90E-09	N/A	N/A		
AA200748	unknown EST	-2,21	2,76E-04	N/A	N/A		
AW122271	unknown EST	-2,23	7,59E-05	N/A	N/A		
AI846319	EST sim. To RAN quarine nucleotide release factor (Rangrnf)	-2,33	1,71E-14	-2,24	3,64E-08		
AI841295	EST sim. To glutathione S-transferase kappa 1	-2,36	7,76E-26	-2,08	3,66E-06		
AI847069	unknown EST	-2,39	1,39E-42	N/A	N/A		
AA681520	EST sim. To geminin (Gmnn)	-2,41	3,91E-13	-4,8	4,22E-04		
AI835274	EST sim. To cytoplasmic FMR1 interacting protein 2.	-2,42	7,07E-09	N/A	N/A		
AW045989	EST sim. To neuromedin B	-2,52	4,07E-03	N/A	N/A		
AI850090	unknown EST	-2,55	2,83E-13	-2,66	3,94E-04		
AW211793	EST sim. To transporter mRNA, AY260576	-2,79	1,27E-03	N/A	N/A		
AI787137	EST sim. To chemokine-like factor superfamily member 8	-2,8	8,41E-45	-2,44	5,01E-04		
AA725931	EST sim. To checkpoint suppressor 1 (Ches1)	-3,4	8,74E-03	N/A	N/A		
AI842813	EST sim. To SSC1 (Ssc1) gene	-3,59	5,29E-04	N/A	N/A		
AW123567	EST sim. To cytochrome c oxidase subunit VIb testes-specific	-3,77	3,76E-12	-3,31	5,82E-03		
AA913994	EST sim. To serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)	-3,81	3,70E-06	N/A	N/A		
AA960345	unknown EST	-4,12	3,91E-08	N/A	N/A		
AA592182	unknown EST	-4,38	1,36E-06	N/A	N/A		
AI988033	unknown EST	-4,44	1,06E-10	-2,03	2,69E-05		
AI849354	glycine C-acetyltransferase	-4,5	3,22E-13	N/A	N/A		
Incl AA879929	unknown EST	-4,72	3,85E-06	N/A	N/A		
AA711773	unknown EST	-5,16	7,13E-18	N/A	N/A		
AI839109	unknown EST	-5,23	0	-2,7	4,24E-09		
AI840733	EST sim. to prostaglandin D2 synthase	-5,33	0	-3,43	2,49E-22		
AI255961	EST sim. To hepcidin antimicrobial peptide 2 (Hamp2)	-10,46	1,78E-28	N/A	N/A		
AI314227	EST sim. To aspartoacylase-3	-13,17	2,81E-30	-12,33	2,25E-04		

## In PKBy1-überexprimierenden Mäusen kardial unterdrückte Gene

GB Acc.	Gen	3 Monate		12 Monate		qRT-PCR	
		-fache Veränderung	p-Wert	-fache Veränderung	p-value	3 Monate	12 Monate
<b>Unbekannte Funktion</b>							
AJ005567	Small proline-rich protein 2l	-10,8	3,70E-03	-1,85	4,00E-02		
AI839109	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8 (Tnfaip8)	-5,23	0	-2,7	4,24E-09		
M21247	Uncoupling protein, mitochondrial	-3,52	0,02	-1,75	0,27		
AC002397	Mouse chromosome 6 BAC-284H12 (Research Genetics mouse BAC library)	-3,48	5,60E-03	-6,35	8,57E-03		
D29797	syntaxin 3A,	-2,34	9,27E-03	-1,75	0,3		
M32032	Selenium binding protein 1	-2,3	2,50E-28	-3,76	4,66E-16		
AB016835	SH3-domain binding protein,	-2,19	1,29E-11	-1,49	0,26		
AF035643	VAMP5 mRNA,	-2,13	2,03E-05	-9,26	1,19E-03		
U66900	Insulin-like growth factor binding complex acid labile subunit	-2,09	6,34E-05	-1,29	0,65		
Y10495	CDV-1R	-2,01	8,55E-44	-2,82	4,56E-10		
M36411	Mpv17	-1,75	2,70E-15	-2,53	2,51E-04		
AF100171	myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 (Mlf1)	-1,65	1,80E-09	-2,39	2,38E-20		
AF026799	Lectin, galactose binding, soluble 6	-1,58	0,01	-2,71	8,41E-04		
Y09227	Small proline-rich protein 3	-1,54	0,37	-4,92	8,77E-03		
U17343	signal recognition particle receptor beta subunit	-1,44	0,3	-4,37	1,89E-03		
AF080580	CLK-1 (clk-1)	-1,17	5,71E-04	-2,05	2,90E-07		
X58196	H19	-1,06	0,68	-2,93	2,85E-04		
D83146	Sine oculis-related homeobox 5 homolog	1,61	0,72	-5,19	4,52E-03		
V00727	p55-v-fos transforming protein	1,91	0,07	-4,69	7,22E-06		
D85028	Mouse collapsin-1 (Semaphorin 3A [Precursor])	2,12	0,01	-4,35	3,86E-03		
X81581	Insulin-like growth factor binding protein 3	-4,89	0,02	-1,55	0,66		
<b>Zellzyklus</b>							
AF036893	circadian clock protein (Per2)	-2,47	2,28E-05	-1,54	549		

## in mit Phenylephrin behandelten neonatalen Kardiomyozyten induzierte Gene

GB Acc.	Gen	-fache Veränderung	p-Wert
<b>Strukturproteine</b>			
X82152	fibromodulin	5	9,47E-31
NM_017239	myosin heavy chain, polypeptide 6 (Myh6)	3,61	2,51E-33
XM_214499	actinin, alpha 2	3,58	2,87E-25
AF056034	F-actin binding protein b-Nexilin mRNA, complete cds	2,61	1,04E-11
X15939	beta cardiac myosin heavy chain	2,56	0
U82612	fibronectin (fn-1)	2,17	1,02E-18
<b>Signaltransduktion</b>			
Y00396	c-myc oncogene	N/A	N/A
X06769	c-fos mRNA	5,55	0,001
NM_053874	adenylyl cyclase-associated protein 2 (Cap2)	3,32	0,00000245
U48247	protein kinase C-binding protein Enigma	3	1,82E-21
BC061862	Jun-B oncogene	2,4	0,00924
AF013144	MAP-kinase phosphatase (cpq21) DUSP-5	2,2	0,02
L06433	c-HA-ras proto-oncogene mechanism sequence	2,16	5,85E-17
U33287	calsequestrin	2,02	4,71E-16
<b>Ionenkanäle/Transporter</b>			
NM_017290	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (Atp2a2)	3,16	0
D63834	monocarboxylate transporter	2,18	4,67E-09
<b>Rezeptoren</b>			
D38530	NOR-1; neuron derived orphan receptor; thyroid/steroid receptor superfamily.	15,12	0,00000154
X80187	bradykinin B2 receptor	9,3	0,05
U17254	NGFI-B = orphan nuclear receptor HMR	6,62	3,6E-30
X64052	angiotensin II receptor AT1B	5,9	0,02
L08595	nuclear receptor (RNR-1)	5,78	0,00473
AB018104	lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor	5,77	0,00475
AB005900	endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein	4,54	5,37E-17
M86912	angiotensin receptor (AT1)	2,18	7,12E-13
<b>Extrazelluläre Proteine</b>			
M26745	interleukin 6 (IL6)	20,27	0,0000247
X55183	schwannoma-derived growth factor (Amphiregulin)	7,25	3,34E-14
X67108	brain-derived neurotrophic factor	6,44	0,01
M64711	endothelin-1	3,53	0,00000121
XM_343192	Endoplasmic precursor	3,53	0,00000121
M55431	transforming growth factor-beta (TGF-beta) masking protein	3,15	0,00000281
X52498	transforming growth factor-beta 1	2,8	0,03
S49491	proenkephalin	2,77	1,01E-14
AF030358	chemokine CX3C	2,73	0,00383
U03491	transforming growth factor beta-3	2,4	0,0000525
M60921	NGF-inducible anti-proliferative putative secreted protein (PC3)	2,39	0,00975
M25297	brain natriuretic peptide (BNP)	2,17	3,36E-36
M23697	tissue-type plasminogen activator (t-PA)	1,98	1,65E-11
M24067	plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	1,87	0,0000162
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
S66024	transcriptional repressor CREM	20,89	0,02
X17163	c-jun oncogene	6,21	0,032
L05489	heparin-binding EGF-like growth factor	5,67	0,00000122
NM_053698	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (Cited2)	5,38	1,02E-19
S77528	C/EBP-related transcription factor	3,42	0,000166
U50736	cardiac adriamycin responsive protein (CARP)	3,05	0
U78102	EGR-2	2,84	0,00177
U04835	CREM delta C-G	2,79	0,00000375
U75397	early growth response 1 (Egr1)	2,25	0,00947
L25785	(TSC-22)	1,66	3,93E-11
X81193	muscle LIM protein	1,52	5,57E-09

## in mit Phenylephrin behandelten neonatalen Kardiomyozyten induzierte Gene

GB Acc.	Gen	-fache Veränderung	p-Wert
<b>Enzyme</b>			
E03424	GTP cyclohydrolase I	7	0,00118
L25925	cyclooxygenase-2	6,57	0,05
S67722	cyclooxygenase isoform COX-2	3,52	0,00000018
J04563	cAMP phosphodiesterase (PDE3)	2,72	0,04
U42627	dual-specificity protein tyrosine phosphatase (rVH6)	2,59	0,000000269
BC063175	Cathepsin L	2,54	0,0000231
M29249	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	2,5	0,042
M58364	GTP cyclohydrolase I	2,48	0,00000209
M25350	cAMP phosphodiesterase (PDE4)	2,47	0,000000124
Z22867	adipocyte hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase	1,98	0,01
X51529	platelet phospholipase A2	1,86	3,88E-13

**Unbekannte Funktion**

U38481	RhoA-binding kinase ROK-alpha	8,94	0,00554
X94185	dual specificity phosphatase 6, MKP-3	7,13	0,00295
D50436	adrenodoxin	6,12	0,0000274
X07266	Mitogen-inducible gene 6 protein homolog	3,99	0,00528
M65251	angiotensinogen gene-inducible enhancer-binding protein 1	3,7	0,000125
U49062	heat sle antigen CD24	2,87	0,03
AF026505	SH3-containing protein p4015	2,76	2,59E-23
NM_019371	Rattus norvegicus EGL nine homolog 3 (C. elegans) (Egln3),	2,12	0,0000529
D85183	Protein-tyrosine phosphatase precursor SHPS-1	N/A	N/A
A1137331	Rho-associated kinase beta (Rock1)	N/A	N/A
AA859648	heat shock protein 40	N/A	N/A

genes regulated in both models

acc. No.	gene description	neonatal Cardiomyocytes	
		fold changes	p-value
AF013144	Dual specificity phosphatase 5 (cpg21)	2,2	0,02
X64052	angiotensin II receptor AT1B	5,9	0,02
M26745	interleukin 6 (IL6)	20,27	0,0000247
U75397	early growth response 1 (Egr1)	2,25	0,00947
NM_175760	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3 (Cyp4a3),	-2,4	0,64

## in mit Phenylephrin behandelten neonatalen Kardiomyozyten unterdrückte Gene

GB Acc.	Gen	-fache Veränderung	p-Wert
<b>Rezeptoren</b>			
J03024	beta-adrenergic receptor	-7,34	0,0000484
AF071014	alpha-1D adrenergic receptor	-2,22	0,00275
<b>Extrazelluläre Proteine</b>			
D15069	adrenomedullin	-2,46	0,00194
<b>Enzyme</b>			
U73503	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	-10,49	0,00054
<b>Unbekannte Funktion</b>			
NM_175760	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3 (Cyp4a3),	-2,4	0,64

## Promotoranalyse auf mögliche Bindungsstellen für Forkhead-Transkriptionsfaktoren für die im Tiermodell regulierten Gene.

Hier aufgeführt findet sich nur die Anzahl möglicher Forkhead-Bindungsstellen, da deren Zahl die möglichen Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren bei weitem überwog.

Unterdrückte Gene	FoxA2	FoxA2a	FoxA4a	FOXC1	FOXD1	FOXD3	FOXF1	FOXF2	FOX11	Foxl1a	FOXL1	FOXQ1	FKHRL-1	Total
Vesicle-associated membrane protein 5 (VAMP-5)					1									1
Prostaglandine D Synthase					1									1
Carboxypeptidase X2								1						1
Sulfonylurea Receptor 2					1							1		2
Phenylalanine Hydroxylase								1						1
Chemokine orphan receptor 1								1					1	2
Notch gene homolog					1									1
PPARa														0
IGFBP-3								1						1
mPKBα								1						1
mPKBβ2		1			1			2						4

Induzierte Gene	FoxA2	FoxA2a	FoxA4a	FOXC1	FOXD1	FOXD3	FOXF1	FOXF2	FOX11	Foxl1a	FOXL1	FOXQ1	FKHRL-1	Total
Uteroglobin	1	2	1		2			1						7
Adrenomedullin													1	1
Ryanodine Receptor 1				1										1
Myostatin (GDF-8)	1				2			2		1		1	1	8
Matrix Metalloproteinase 3		1						2					1	4
Potassium Channel KV 1.7	1		1						1		1			4
Hyperpolarization activated potassium channel 2							1							1
BNP														0
ATPase, Ca++ transporting, cardiac, fast twitch														0
ANF	1							2				1		4
Angiotensinogen										1				1
TNF-beta	1		1									1		3
Prostaglandine E Receptor ER4								2					1	3
Neural-Visinin-like Protein 2													1	1
Calcium transporting ATPase (atp2a1)														0
CD 72					1									1
Neuropeptide Y Receptor 1		3						2						5
mVGEF-D			1					1		1		1		4
mIGFBP-5														0
mSOD3	1	1						1	1					4
mPDK3					1							1	1	3

## Promotoranalyse auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der im Modell $\alpha_1$ -adrenerg stimulierter neonataler Kardiomyozyten.

Hier aufgeführt findet sich die Anzahl möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der CREB- und EGR-Famile, sowie deren Kofaktoren, da deren Zahl die möglichen Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren bei weitem überwog.

Gen	E4BP4	ATF	HLF	CEBPB	CEBP	CREB	TAX	CREBBP-1	CREBBP-1/c-Jun	v-Jun	EGR-1	EGR-2	EGR-3	NGFI-Pc	WTS	total
Cyclooxygenase II	1	2	1	1	1									1	3	10
Interleukin-6	2			1	1		1	2	2						4	13
NOR-1		1			1	3	1	2			1	1	1		1	12
ROCK						1					1		2		1	5
NGF-1b		1		3	2	3							1		5	15
LDL-Receptor	1	1		2			1	2		2						9
TGF- $\beta$				1							4				4	9
Endothelin-1				2		2								2	5	11
EGR-1		2	1	1		1		1			1				6	13
DUSP-6				1										1	1	3
DUSP-5		1					2	2			1	1			1	8
c-Jun		2		1						2					2	7
c-Fos		1		1		3									2	7
AT-1b								1								1
CYP4A3	1							1								2
CARP	1	1	1	1	1		1									6
$\beta$ -Adrenoreceptor		2			1						2	1		1	1	8
Bradykinin-2 Receptor	1										1	1	1		1	5
Bd-neurotrophic factor	1	1	2		2			1		1				1		9
Amphiregulin									2					1		3

## Promotoranalyse der ersten 3000 Basenpaare des ANF-Promotors

Family/matrix	Further Information	Opt.	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to				
<a href="#">V\$FKHD/XFD3.01</a>	Xenopus fork head domain factor 3 (FoxA2a)	0.82	409 - 425	(-)	0.782	0.835	attaagttAAAaagaa
<a href="#">V\$FKHD/HFH3.01</a>	HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOX11, Freac-6)	0.97	796 - 812	(-)	1.000	0.973	aacaaacAAACaaaaaa
<a href="#">V\$FKHD/HFH3.01</a>	HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOX11, Freac-6)	0.97	800 - 816	(-)	1.000	0.973	aacaaacAAACaaacaa
<a href="#">V\$FKHD/HFH3.01</a>	HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOX11, Freac-6)	0.97	804 - 820	(-)	1.000	0.973	cccaaacAAACaaacaa
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	2235 - 2251	(+)	1.000	0.843	aggcagTAAAaataaac
<a href="#">V\$FKHD/HFH1.01</a>	HNF-3/Fkh Homolog 1 (FOXQ1)	0.85	2241 - 2257	(+)	1.000	0.908	taaaaatAAACtttaga
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	2281 - 2297	(-)	1.000	0.955	cacgtgTAAAcaccaag
<a href="#">V\$FKHD/HNF3B.01</a>	Hepatocyte Nuclear Factor 3beta (FOXA2)	0.95	2354 - 2370	(+)	1.000	0.965	aaaaaaaaAATAatagc

## Promotoranalyse der ersten 3000 Basenpaare des BNP-Promotors

Family/matrix	Further Information	Opt.	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to				
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	191 - 207	(+)	1.000	0.880	gattttTAAAcacagtc
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	405 - 421	(+)	1.000	0.903	ctgtttTAAAcacatgga
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	936 - 952	(+)	1.000	0.881	gtccgtTAAAcagagca
<a href="#">V\$FKHD/FREAC2.01</a>	Fork head related activator-2 (FOXF2)	0.84	1697 - 1713	(+)	1.000	0.909	ctctccTAAAcacattgc
<a href="#">V\$FKHD/FREAC4.01</a>	Fork head related activator-4 (FOXD1)	0.78	1724 - 1740	(-)	1.000	0.814	ccaagggaAACAcacac
<a href="#">V\$FKHD/FREAC4.01</a>	Fork head related activator-4 (FOXD1)	0.78	1756 - 1772	(+)	1.000	0.824	ctcatgcaAACAtgggt

## Veröffentlichungen

### Originalveröffentlichungen

Taniyama Y, Ito M, Sato K, Kuester C, Veit K, Liao R, Colucci WS, Ivashchenko Y, Walsh K, Shiojima I

PKBy1 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. Akzeptiert im Dezember 2004

Kuester C, Klaembt K, Wohlfart, P, Dedio J, Ivashchenko Y

cDNA-array analysis of  $\alpha$ -adrenergic-dependent heart hypertrophy. *Physiol Genomics*. Eingereicht im Oktober 2004

Löhn M, Veit K, Kramer F, Kuester C, Busch AE, Ritzeler O, Ruetten H, Dedio J, Ivashchenko Y

NF- $\kappa$ B inhibition by a small molecular IKKB kinase inhibitor AVE 1627 potentiates TRAIL-mediated cell death. *Oncogene* Eingereicht im Dezember 2004

Kuester C, Veit K, Tremp G, Touchet N, Dedio J, Ivashchenko Y

Transcriptional Effects of Chronic Protein Kinase B GAMMA1 Activation in the Heart. *Circ Res* in Vorbereitung

### Kongreßbeiträge

Küster C, Veit K, Tremp G, Touchet N, Rütten H, Gehring D, Dedio J, Ivashchenko Y (2004) Severe Heart Hypertrophy Induced by Overexpression of the Protein Kinase B GAMMA1. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim



## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas E. Busch angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt:

Dres. Yuri Ivashchenko und Dedio für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und ausdauernde fachliche Betreuung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch für das Bereitstellen des Themas, des wissenschaftlichen Umfeldes sowie für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, durch welche die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht wurde.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus den Laboren Ivashchenko und Dedio für eine freundliche Aufnahme, angenehme Zusammenarbeit und das Schätzen meiner Back- und Kochkünste.

Insbesondere danke ich Herrn Matthias Ozog für unerschöpflichen Rat rund um die Arbeitstechniken qRT-PCR und Chiphybridisierung.

M.C. LaPointe PhD für die zur Verfügungstellung des 1818BNP-Luc-Vektors.

Dr. Pearly Lee, Dr. Petra Arndt, Dr. Constanze Scherer, Kerstin Steioff, Sonja Schoeltzke und Dr. Martin Weiser für hilfsbereite Unterstützung in allen Lebenslagen, ein stets offenes Ohr, sowie viele interessante Diskussionen und Gespräche.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die erfahrene, großartige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Andrea Jäckel und Hans Brenner, die meinen Kopf im letzten halben Jahr über Wasser gehalten haben.

Vicky und meiner Familie, die trotz aller Fährnisse an mich geglaubt und mir stets voller Geduld und Liebe zur Seite gestanden haben.

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

Vor- und Zuname	Christoph Küster
Wohnort	Bad Homburg v. d. H.
Geburtsdatum	25. November 1972
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch

**Ausbildung**

1979-1983	Grundschule in Karben
1983-1992	Augustinergymnasium in Friedberg
1992-1995	Ausbildung zum Chemielaboranten in der Hoechst AG, Frankfurt am Main
1995-2000	Pharmaziestudium an der J.-W. Goethe-Universität Frankfurt a.M.
Juni 2001	Approbation zum Apotheker
2001-2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der DG Cardiovascular Diseases der Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. E. Busch und Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler

**Praktische Tätigkeiten**

Mai bis November 2000	Pharmaziepraktikum in der Schwanen –Apotheke am Markt in Offenbach am Main
November 2000 bis April 2001	Pharmaziepraktikum in der DG Cardiovascular Diseases der der Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Christoph Küster, geboren am 25.11.1972 in Frankfurt am Main, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „*Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Entstehung von Herzhypertrophie*“ selbständig angefertigt und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 05.01.2005