

Saskia Spaich  
Dr. med.

## **Charakterisierung der Funktion des Z-Scheiben-Proteins Affixin ( $\beta$ -parvin) im Herzen**

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. N. Frey

Das „Focal Adhesion“-Protein Affixin ( $\beta$ -parvin) ist in Herz- und Skelettmuskel exprimiert und bindet an die Z-Scheibe. Es ist bekannt, dass Affixin in Zellmigration und –adhäsion involviert ist, seine Rolle im Herzen ist jedoch noch weitgehend unklar. Ziel unserer Arbeit war es, durch die Identifizierung neuer Bindungspartner von Affixin die funktionelle Bedeutung von Affixin im Herzen zu untersuchen.

Hierzu wurde ein Yeast-two-hybrid-screen mit Affixin als „bait“ durchgeführt. Als bislang unbekanntes Bindungspartner von Affixin wurde der Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gefunden. Diese Bindung konnte mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Zur weiteren Charakterisierung dieser Bindung überexprimierten wir Affixin in der Zellkultur von Kardiomyozyten neonataler Ratten mithilfe eines adenoviralen Vektors. Die Auswirkungen einer adenoviral vermittelten Affixin-Überexpression in Kardiomyozyten wurden mittels Western Blot und Elektro Mobility Shift Assay (EMSA) analysiert. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte Phosphorylierung und transkriptionelle Aktivität von STAT3.

Um zu prüfen, ob es durch Überexpression bzw. Hemmung von Affixin in Kardiomyozyten zu einer Regulation STAT3-induzierter Gene kommt, wurden ferner Realtime-PCR-Experimente durchgeführt. Im Gegensatz zur bisherigen Literatur konnte in vitro weder auf Fibronectin- noch auf Kollagen-ausplattierten Zellen eine signifikante Regulation von ANF und  $\beta$ -MHC gezeigt werden. Jedoch konnte nach Überexpression von Affixin eine signifikante Veränderung STAT3-induzierter Gene, wie Hsp70 und Angiotensinogen, nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte auch eine Induktion STAT3-aktivierender Gene, wie IL-6 und Januskinase, beobachtet werden.

Eine potentiell prohypertrophische Wirkung von Affixin im Herzen konnte sowohl durch direkte Größenbestimmung der Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie als auch durch Messung der  $H_3$ -Leucin-Inkorporation nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Affixin zeigten eine schützende Wirkung von Affixin vor Doxorubicin-induzierter Apoptose: Während eine 24-stündige Doxorubicin-Inkubation zu einer Zunahme der Apoptoserate von 270% in Kontroll-Kardiomyozyten führte, zeigten Affixin-überexprimierende Zellen nur einen geringen Anstieg der Apoptoserate ( $p < 0,05$ ). Der Effekt von Affixin auf Doxorubicin-induzierte Apoptose wurde mittels eines DNA-Fragmentierungsassays untersucht. Außerdem führte eine Überexpression von Affixin in der RT-PCR zu einem signifikanten Anstieg der Mangansuperoxiddismutase (MnSOD), einem antioxidativen Enzym.

In weiteren funktionellen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass HUVE-Zellen, welche in Medium von Affixin-überexprimierenden Kardiomyozyten kultiviert wurden, als Hinweis auf eine proangiogenetische Wirkung Affixin-überexprimierender Kardiomyozyten eine Zunahme ihrer Tubuluslänge zeigten. Weiterhin konnte durch Überexpression von Affixin sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene eine gesteigerte Induktion des Wachstumsfaktors Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Affixin in Kardiomyozyten an STAT3 bindet, diesen Transkriptionsfaktor aktiviert und typische STAT3-abhängige Effekte, wie Hypertrophie, Apoptoseschutz und verstärkte Angiogenese, in Kardiomyozyten bewirkt. Dieser molekulare Mechanismus könnte ein neues Ziel zur Entwicklung kardioprotektiver Therapien darstellen. Um diesen Mechanismus noch genauer zu verstehen und die in dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse zu bestätigen, sollen die Befunde in vivo überprüft werden. Dazu wird derzeit eine transgene Maus generiert, die Affixin spezifisch im Herzen überexprimiert.