

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Bioingenieurin (FH) Sabine Eschricht
aus Nauen

Tag der mündlichen Prüfung

**Die Rolle der Angiogenese in der pathologischen
und physiologischen Myokardhypertrophie**

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Angel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Johannes Backs

Heidelberg, 2013

Diese Arbeit ist von mir selbstständig angefertigt und verfasst. Es sind keine anderen als angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt worden.

Heidelberg

Sabine Eschricht

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
Zusammenfassung	12
1 Einleitung	14
1.1 Myokardhypertrophie als Bestandteil des kardialen <i>Remodeling</i>	14
1.1.1 Maladaptive (pathologische) Myokardhypertrophie.....	16
1.1.2 Adaptive (physiologische) Myokardhypertrophie.....	16
1.2 Wichtige Signalwege in der Myokardhypertrophie.....	17
1.2.1 Calcineurin-NFAT Signalweg.....	18
1.2.2 <i>Mitogen activated protein</i> Kinasen-Kaskade (MAPK-Kaskade)...	19
1.2.3 PI3K-Akt Signalweg.....	20
1.3 <i>Remodeling</i> und Angiogenese.....	22
1.3.1 Die Rolle der Angiogenese beim kardialen <i>Remodeling</i>	22
1.3.2 Transkriptionsfaktor <i>Hypoxia inducible factor-1α</i> (HIF-1 α).....	23
1.3.2.1 Sauerstoff-abhängige Regulierung.....	24
1.3.2.2 Sauerstoff-unabhängige Regulierung.....	24
2 Zielsetzung	26
3 Materialien und Methoden	27
3.1 Chemikalien.....	27
3.2 Spezielle Chemikalien und Reagenzien.....	27
3.3 Lösungen.....	28
3.3.1 Nährmedien und Lösungen für zellkulturtechnische Methoden...28	
3.3.2 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten.....	29
3.4 Oligonukleotide und <i>silencer</i> RNA.....	30
3.5 Antikörper.....	31
3.6 Adenoviren.....	32
3.7 Komplettsysteme.....	32
3.8 Verwendete Längenstandards.....	33
3.8.1 Protein-Gelelektrophorese.....	33
3.8.2 Nukleinsäure-Gelelektrophorese.....	33
3.9 Verwendete Zelllinien und Primäkulturen.....	33
3.10 Verwendete Versuchstiere.....	33
3.10.1 <i>Mus musculus</i>	33

3.10.2 <i>Rattus Norvegicus</i>	33
3.11 Verbrauchsmaterialien	33
3.12 Geräte	34
3.13 Zellkulturtechnische Methoden	35
3.13.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	35
3.13.2 Kultivierung und Kryokonservierung von HEK293A Zellen.....	35
3.13.3 Adenovirusproduktion.....	36
3.13.4 Aufreinigung der Adenoviren	37
3.13.5 Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten.....	38
3.13.6 Transfektion neonataler Rattenkardiomyocyten.....	39
3.13.6.1 Transfektion mittels Adenoviren	39
3.13.6.2 Inhibierung der Transkription von Proteinen mittels siRNA.....	39
3.14 Molekularbiologische Methoden.....	39
3.14.1 Isolierung von Nukleinsäuren	39
3.14.1.1 Isolierung totaler RNA.....	39
3.14.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Maus	40
3.14.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	40
3.14.2 cDNA Synthese	40
3.14.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	41
3.14.3.1 Genotypisierung der CnATg-Mauslinie.....	41
3.14.3.2 Quantitative PCR (qPCR)	41
3.14.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
3.15 Proteinbiochemische Methoden.....	43
3.15.1 Aufreinigung von Proteinen	43
3.15.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
3.15.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	43
3.15.4 Western Blot.....	44
3.15.5 Immunpräzipitation	45
3.16 Versuchstierkundliche Methoden	46
3.16.1 Haltung und Zucht	46
3.16.2 Transverse Aorten-Konstriktion	46
3.16.3 Physiologische Hypertrophie durch Ausdauertraining.....	47
3.16.4 Echokardiographie	47
3.16.5 Euthanasierung und Organentnahme.....	48
3.17 Behandlung der Mäuse mit VEGF-2R Inhibitoren und HSP90 Inhibitor	48
3.18 Histologische Methoden.....	49

3.18.1	Herstellung von Dünnschnittpräparaten aus Organen	49
3.18.2	Bestimmung der Kapillardichte im linken Ventrikel	49
3.18.3	Statistik.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Etablierung verschiedener <i>in vivo</i> -Modelle zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie	50
4.1.1.1	Physiologische Hypertrophie- Schwimmmodell	50
4.1.1.2	Pathologische Hypertrophie-transverse Aortenkonstriktion (TAC) 50	
4.1.1.3	Pathologische Hypertrophie- CalcineurinA transgenes Mausmodell (CnATg).....	51
4.1.2	Charakterisierung der Hypertrophie-Modelle auf molekularer Ebene 53	
4.1.2.1	Physiologische Hypertrophie- Schwimmmodell	53
4.1.2.2	Pathologische Myokardhypertrophie-TAC-Modell und CnATg.....	55
4.2	Effekte antiangiogener Therapie in der physiologischen Myokardhypertrophie <i>in vivo</i>	55
4.3	Effekte antiangiogener Therapie in der pathologischen Myokardhypertrophie <i>in vivo</i>	60
4.4	CalcineurinA transgene Mäuse weisen erhöhte Stabilisierung und Transkriptionsaktivität von HIF-1 α auf.....	62
4.5	CalcineurinA transgene Mäuse weisen verstärkte Expression angiogener Faktoren auf.....	65
4.6	Calcineurin A induziert die Stabilisierung HIF-1 α unabhängig von NFAT66	
4.7	Calcineurin A induziert die Stabilisierung von HIF-1 α über einen HSP90 abhängigen Mechanismus.....	68
4.8	Inhibierung von HSP90 in CnATg Mäusen reduziert HIF-1 α Proteinlevel und verschlechtert die LV-Funktion.....	72
5	Diskussion	75
5.1	Inhibierung der Angiogenese kann eine physiologische Hypertrophie nicht in eine pathologische Hypertrophie umwandeln	76
5.2	Einfluss der Calcineurin-NFAT-Signalkaskade auf die Regulierung der Angiogenese während der pathologischen Myokardhypertrophie	80
5.2.1	CalcineurinA transgene Mäuse weisen überraschenderweise eine transiente Aufrechterhaltung der Kapillardichte auf.....	80
5.3	CnA weist partiell protektive Effekte auf die Myokardhypertrophie auf ..	82
5.4	Die Rolle der Angiogenese in der Hypertrophie	85
6	Abkürzungen	86

7	Literaturverzeichnis	89
8	Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht Myokardhypertrophie.....	17
Abb. 2: Übersicht wichtiger Signalwege in der pathologischen und physiologischen Myokardhypertrophie.....	21
Abb. 3: Regulierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α	25
Abb. 4: Vergleich der linksventrikulären Hypertrophie und der fraktionellen Verkürzung in <i>in vivo</i> -Modellen der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie.	51
Abb. 5: Vergleich der Kapillardichte in physiologischen und pathologischen <i>in-vivo</i> Myokardhypertrophie Modellen.	52
Abb. 6: Vergleich der Expression des fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC im Schwimm-, TAC- und CnATg-Modell.....	53
Abb. 7: Ausdauertraining induzierte eine vermehrte Aktivierung der Akt-Kinase und des angiogenen Wachstumsfaktor VEGF-A.	54
Abb. 8: Behandlung mit VEGFR-2 Inhibitoren SU5416 und mAB VEGFR-2 Klon DC101 unterdrückte die Angiogenese in der physiologischen Myokardhypertrophie.	56
Abb. 9: Die Inhibierung der Angiogenese im Schwimm-Modell verhinderte die Ausbildung der Myokardhypertrophie ohne jedoch die kardiale Funktion zu beeinträchtigen.	57
Abb. 10: Inhibierung der Angiogenese übte keinen negativen Einfluss auf die Expression der fetalen Gene und der CalcineurinA-Aktivität aus.	58
Abb. 11: Inhibierung der Angiogenese induzierte eine vermehrte Phosphorylierung von Akt in der physiologischen Myokardhypertrophie.	59
Abb. 12: Inhibierung des VEGFR-2 führte zu einer verminderten Kapillardichte in der pathologischen Myokardhypertrophie.....	61
Abb. 13: Inhibierung der Angiogenese in der pathologischen Myokardhypertrophie führte zur Reduzierung der kardialen Funktion.	62
Abb. 14: CnATg Tiere weisen verbesserte Kapillardichte im linken Ventrikel auf.....	63
Abb. 15: CnATg Mäuse wiesen eine konstante HIF-1 α Stabilisierung auf... ..	64

Abb. 16: CnATg Mäuse wiesen vermehrte Expression HIF-1 α abhängiger Gene auf.....	65
Abb. 17: CnATg Mäuse wiesen eine erhöhte Expression proangiogener Faktoren auf.....	66
Abb. 18: CnA-Überexpression induzierte HIF-1 α Stabilisierung unabhängig von NFAT-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten.....	68
Abb. 19: Calcineurin A induziert die Expression von HSP90, einem Stabilisator von HIF-1 α	69
Abb. 20: Inhibierung von HSP90 verhindert die Calcineurin A induzierte HIF-1 α Stabilisierung.	70
Abb. 21: Inhibierung von HSP90 führt zu Reversion der Expression HIF-1 α abhängiger Gene.....	70
Abb. 22: Inhibierung von HSP90 führt zu Reversion der Expression HIF-1 α abhängiger Gene.....	71
Abb. 24: 17AAG inhibierte die Stabilisierung von HIF-1 α sowie die Expression der Zielgene.....	73
Abb. 25: Inhibierung von HSP90 in CnATg Mäusen führte zu einer Verringerung der Kapillardichte und verschlechterte die kardiale Funktion.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer.....	30
Tabelle 2: verwendete <i>silencer</i> RNA.....	31
Tabelle 3: verwendete Antikörper	31
Tabelle 4: Übersicht Zusammensetzung Trenngel für SDS-Polyacrylamidgel	44

Zusammenfassung

Als Myokardhypertrophie versteht man eine Zunahme der Wanddicke des Herzmuskels sowie eine Zunahme der Herzmuskelmasse im Rahmen einer Druck- und Volumenbelastung des Herzens oder im Rahmen einer regelmäßigen Trainingsbelastung. Man unterscheidet dabei grundsätzlich in physiologische und pathologische Myokardhypertrophie. Die physiologische Hypertrophie weist eine gleichbleibende oder verbesserte kardiale Funktion auf, wohingegen die pathologische Myokardhypertrophie zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion führt. Im Gegensatz zur physiologischen Myokardhypertrophie wird die pathologische Hypertrophie mit einer verringerten Kapillardichte im linken Ventrikel assoziiert, die zur Beeinträchtigung der Herzfunktion führt. Die genauen Mechanismen hierfür sind jedoch noch unklar. Daher sollte der Stellenwert der Angiogenese bei der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie eingehend betrachtet werden. Zum einen wurde untersucht, ob die Inhibierung der Angiogenese eine physiologische in eine pathologische Hypertrophie überführt und zum anderen sollte der Einfluss von CalcineurinA, einem wichtigen Mediator der pathologischen Myokardhypertrophie, auf die Regulation der Angiogenese untersucht werden.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Angiogenese in der physiologischen Hypertrophie weder die kardiale Funktion beeinträchtigt, noch die Reexpression des fetalen Genprogramms, typisches Kennzeichen der pathologischen Hypertrophie, induziert. Somit war es durch Inhibierung der Angiogenese nicht möglich, die physiologische Hypertrophie in eine pathologische zu überführen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass CalcineurinA den Transkriptionsfaktor HIF-1 α über einen HSP90 abhängigen Mechanismus stabilisiert und die Expression proangiogener Faktoren, wie z.B. VEGF-A, induziert. Dadurch konnte, trotz einer ausgeprägten pathologischen Hypertrophie, eine Verminderung der Kapillardichte verhindert werden. Es konnte also gezeigt werden, dass CalcineurinA einen partiell protektiven Effekt auf die pathologische Myokardhypertrophie ausübt.

Summary

Myocardial hypertrophy is defined as an increase in wall thickness of the heart as well as an increase in heart mass in response to pressure- or volume-overload or chronic exercise training. Generally, myocardial hypertrophy can be classified into adaptive (physiological) and maladaptive (pathological) hypertrophy. Whereas physiological hypertrophy is associated with normal or enhanced cardiac function, pathological hypertrophy leads to impaired cardiac function. Additionally, capillary-myocyte mismatch is another hallmark of pathological hypertrophy. However, the exact mechanism of capillary loss remains poorly understood.

Thus, the aim of this study was to investigate the importance of angiogenesis in physiological and pathological cardiac hypertrophy. On the one hand, the influence of angiogenesis inhibition was determined in the setting of physiological hypertrophy, in order to evaluate if it is possible to modify physiological into pathological hypertrophy. On the other hand, the regulation of angiogenesis in pathological hypertrophy through CalcineurinA, a central mediator of pathological hypertrophy, was investigated.

Within this work, it could be shown, that inhibition of angiogenesis in physiological hypertrophy neither has influence on cardiac function nor on the reexpression of fetal genes, both features of pathological hypertrophy. Therefore, altered angiogenesis was not able to modify physiological into pathological hypertrophy.

Furthermore, it could be demonstrated, that CalcineurinA stabilized the transcription factor HIF-1 α and induced expression of proangiogenic downstream targets, like VEGF-A. CalcineurinA thereby surprisingly prevented the decrease in capillary density despite massive cardiac hypertrophy.

Thus, CalcineurinA seems to have a partial protective effect in the setting of pathological myocardial hypertrophy, questioning our current understanding of the regulation of angiogenesis in pathological myocardial hypertrophy.

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie z.B. die koronare Herzerkrankung (KHK) oder die Herzinsuffizienz, stellen eine der Haupttodesursachen der westlichen Industrieländer dar [5]. Im Rahmen dieser Erkrankungen kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Myokards, die als kardiales *Remodeling* bezeichnet werden. Ein wichtiger Bestandteil dieser Veränderungen stellt die Myokardhypertrophie dar, also die Größenzunahme des Herzmuskels, die in den letzten Jahren als ein Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen identifiziert wurde.

1.1 Myokardhypertrophie als Bestandteil des kardialen *Remodeling*

Das Myokard besteht neben den Kardiomyozyten, die ca. 60-70% des Massenanteils des Myokards ausmachen, zusätzlich aus nichtmyozytären Bestandteilen. Hierzu gehört die extrazelluläre Matrix (EZM), die das Grundgerüst des Herzmuskels bildet. Sie besteht aus Kollagenen, die im Interstitium von den Fibroblasten gebildet werden. In der EZM sind noch zusätzlich Kapillaren eingebettet, die für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Herzmuskels zuständig sind.

Aufgrund vermehrter Wachstumsreize oder erhöhter Druck- oder Volumenbelastung des Herzmuskels finden strukturelle und zelluläre Umbauprozesse der Kardiomyozyten und des nichtmyozytären Anteils des Herzmuskels statt, die als *kardiales Remodeling* bezeichnet werden. Hierzu gehört die Ausbildung einer Kardiomyozytenhypertrophie, einer Größenzunahme der Kardiomyozyten, als auch Anpassungen der Mikrovaskularisierung und der EZM. Im Zuge des nichtmyozytären kardialen *Remodelings*, finden Umbauprozesse der extrazellulären Matrix statt, im Sinne einer zunehmenden Fibrosierung des Myokards, als auch Veränderungen im Kapillarbett, das eine adäquate Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten soll.

Nach traditionellem Verständnis versteht man unter der Myokardhypertrophie einen Anpassungsprozess des Herzens zur Kompensation

hämodynamischer Belastungen. Dies führt zu einer Volumenzunahme der Kardiomyozyten, die als Hypertrophie bezeichnet wird, da diese postnatal ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren und sich nicht mehr vermehren können [6, 7]. Die Hypertrophie unterscheidet sich in diesem Punkt von der Hyperplasie, die das Wachstum eines Organs aufgrund vermehrter Zellteilung beschreibt. In den Kardiomyozyten wird die vermehrte Expression kontraktile Einheiten, der Sarkomere, sowie eine gesteigerte Proteinsynthese verschiedener Proteine induziert, die für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität essentiell sind [8]. Je nach Art der Belastung kann das Wachstum des Myokards morphologisch in die konzentrische und exzentrische Hypertrophie unterschieden werden. Die konzentrische Hypertrophie entsteht in der Regel durch eine erhöhte Druckbelastung des Ventrikels, die sich in einer Zunahme der Ventrikelwand bei gleichbleibendem Ventrikelvolumen äußert. In den Kardiomyozyten führt dies zu einer parallelen Anordnung der Sarkomere und somit zu einer Vergrößerung der Zellbreite. Bei der exzentrischen Hypertrophie, meistens hervorgerufen durch eine erhöhte Volumenbelastung, werden die Sarkomere vermehrt in Reihe angeordnet, was zu einem Längenwachstum der Kardiomyozyten führt und eine Vergrößerung des Ventrikelvolumens mit moderater Zunahme der Ventrikelwandstärke verursacht [9].

In der kompensatorischen Phase sind diese Veränderungen noch partiell reversibel, jedoch führt eine chronische Belastung zu irreversiblen Veränderungen des Myokards mit resultierender kardialer Dysfunktion.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten der Hypertrophie. Die physiologische oder adaptive Hypertrophie wird bedingt durch postnatales Wachstum oder durch vermehrte körperliche Belastung, z.B. durch Sport. Die pathologische (maladaptive) Hypertrophie wird z.B. durch chronische Druck- oder Volumenbelastung (z.B. Hypertonie, Herzklappenfehler) oder Herzinfarkt induziert und stellt einen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar [10]. Beide Formen unterscheiden sich jedoch wesentlich in ihrem strukturellen und funktionellen *Remodeling*, das im Folgenden näher erläutert wird.

1.1.1 Maladaptive (pathologische) Myokardhypertrophie

Die pathologische, oder maladaptive Hypertrophie ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert und wird durch chronisch erhöhte Druck- oder Volumenbelastung, Herzinfarkt oder durch genetische Mutation hervorgerufen.

Volumenbelastungen, z.B. in Folge einer Mitralklappeninsuffizienz, führen zu einer exzentrischen Hypertrophie. Die konzentrische Hypertrophie wird hingegen durch eine chronische Druckbelastung, z.B. arterielle Hypertonie oder Aortenklappenstenose, induziert. Es kommt in diesem Fall zu einer verstärkten Wanddicke und gleichzeitiger Verringerung des Ventrikelvolumens.

Die pathologische Myokardhypertrophie ist nicht nur mit einer Kardiomyozytenhypertrophie assoziiert, sondern auch mit deren Nekrose und Apoptose. Des Weiteren führt die Proliferation der Fibroblasten in der extrazellulären Matrix zur Fibrose, welche folglich eine Wandversteifung des Myokards verursacht und somit die Pumpleistung des Myokards herabsetzt. Weiterhin führt eine verminderte Kapillardichte zur Ischämie. Diese strukturellen Veränderungen fördern den Übergang der Hypertrophie in eine Herzinsuffizienz [9, 11-13].

Auf zellulärer Ebene wird die Expression fetaler Gene, wie z.B. ANP, BNP, β -MHC induziert, als auch die verminderte Expression essentieller Proteine, die zur Regulierung des Kalziumshaushaltes beitragen (z.B. Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, Serca2a) [14, 15].

1.1.2 Adaptive (physiologische) Myokardhypertrophie

Die adaptive oder physiologische Hypertrophie beschreibt das postnatale Wachstum des Herzens. Hierzu gehören das Wachstum während der Schwangerschaft und die Anpassung des Myokards an erhöhte sportliche Leistung, wie sie in Hochleistungssportlern zu verzeichnen ist.

Je nach Art der körperlichen Belastung werden auch hier das konzentrische und das exzentrische Wachstum unterscheiden. So führt Ausdauertraining zur exzentrischen Hypertrophie mit einer Volumenvergrößerung des

Ventrikels und gleichzeitiger proportionaler Zunahme der Wanddicke. Konträr führt Krafttraining zu einer konzentrischen Hypertrophie [16].

Charakteristika der adaptiven Myokardhypertrophie sind normale oder verbesserte kardiale Kontraktilität der Herzmuskulatur mit einer verbesserten Kapillarisation und fehlender Fibrosebildung. Im Gegensatz zur pathologischen Myokardhypertrophie wird die Reexpression fetaler Gene, wie ANP, BNP und β -MHC, nicht induziert und die Expression der Kalzium-regulierender Proteine bleibt erhalten [17-19].

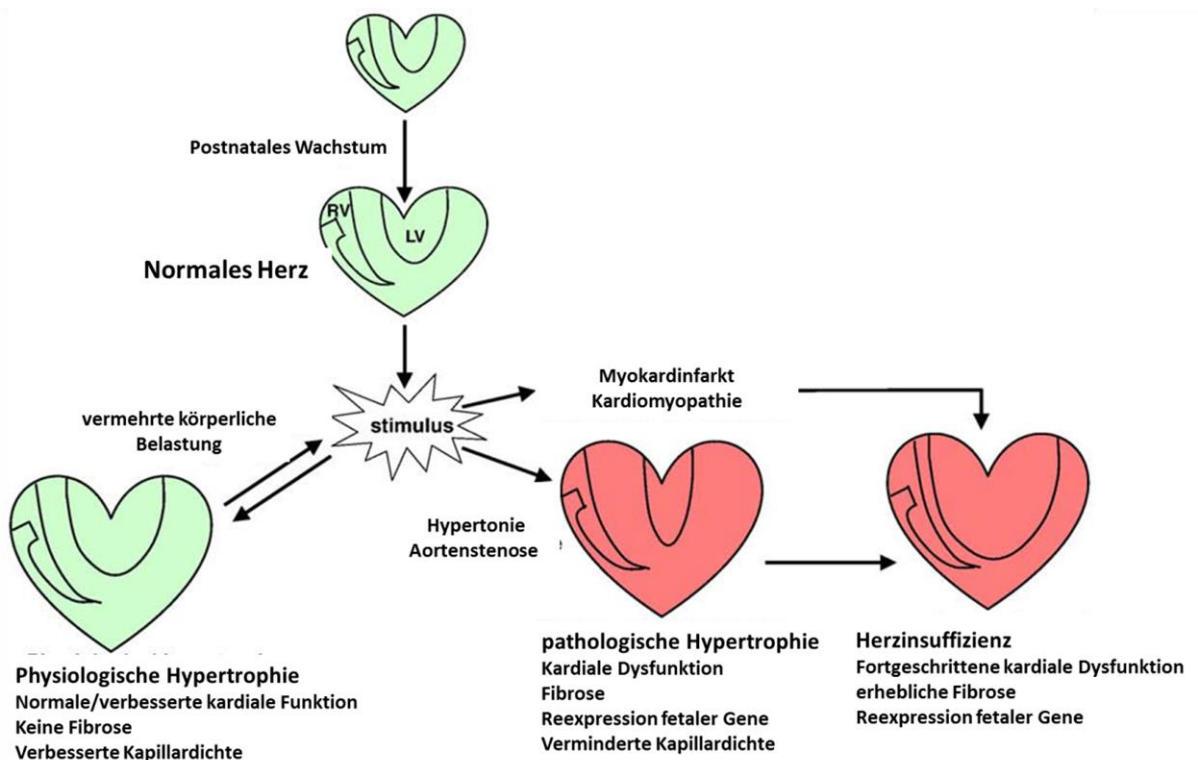


Abb. 1: Übersicht Myokardhypertrophie.

Die Myokardhypertrophie wird in physiologischer und pathologischer Hypertrophie unterschieden. Die physiologische Hypertrophie entsteht durch postnatales Wachstum, Schwangerschaft oder vermehrter körperlicher Belastung, z.B. Ausdauersport. Sie ist charakterisiert durch eine normale kardiale Funktion und Morphologie und einer adäquaten Kapillardichte. Demgegenüber steht die pathologische Hypertrophie, die durch eine verschlechterte kardiale Funktion, erheblicher Fibrose, der Reexpression der fetalen Gene (ANP, BNP und β -MHC) sowie einer verminderten Kapillardichte gekennzeichnet ist, die im weiteren Verlauf zu einer Herzinsuffizienz führt. (Modifiziert nach Bernardo et al., 2010) [1, 2]

1.2 Wichtige Signalwege in der Myokardhypertrophie

Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist eine zelluläre Antwort auf biomechanischen Stress, der durch endo- und parakrine Faktoren initiiert

wird. Diese Faktoren binden an spezifische membrangebundene Rezeptoren und aktivieren zahlreiche zytoplasmatische Signalwege, welche die Kardiomyozytenvergrößerung, eine veränderte und gesteigerte Proteinsynthese als auch eine vermehrte Organisation der Sarkomere bewirken.

Physiologische und pathologische Myokardhypertrophie unterscheiden sich nicht nur auf morphologischer Ebene, sondern auch auf molekularer Ebene. In der pathologischen Myokardhypertrophie binden neurohumorale Faktoren, z.B. Angiotensin II (Ang II), *Endothelin I* (Et-I), *Phenylephrin* (PE), *Cardiotrophin-1* (CT-I), oder Katecholamine hauptsächlich an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Die wohl bekanntesten aktivierten Signalwege sind hierbei die *mitogen activated protein* Kinasen-Kaskade (MAPK) und der Calcineurin-NFAT-Signalweg. Konträr werden die für die physiologische Myokardhypertrophie verantwortlichen Signalwege überwiegend durch Wachstumshormone wie Insulin oder *Insulin-like growth factor* (IGF-I) über Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert. Nach Stand der heutigen Forschung geht man davon aus, dass die PI3K/Akt Kaskade den wohl wichtigsten Signalweg zur Ausbildung einer physiologischen Myokardhypertrophie darstellt.

1.2.1 Calcineurin-NFAT Signalweg

Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die über einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel aktiviert wird. Das aktive Heterodimer besteht aus der katalytischen Untereinheit CalcineurinA (CnA), der regulatorischen Untereinheit CalcineurinB (CnB) und dem Calcium bindendem Protein Calmodulin. In Säugetieren gibt es drei CalcineurinA Gene (CnA α , β , γ), wobei nur CnA α und CnA β in Kardiomyozyten exprimiert werden.

Bei einem niedrigen intrazellulären Kalziumspiegel liegen CnA und Calmodulin getrennt voneinander vor und die katalytische Domäne des CnA wird durch die autoinhibitorische Domäne sterisch blockiert. Erst durch einen intrazellulären Anstieg an Kalzium und der damit verbundenen Bindung an Calmodulin, wird die Bindungsaktivität an CnA erhöht. Die Bindung von

Calmodulin an CnA bewirkt eine Konformationsänderung der autoinhibitorischen Domäne an der katalytischen Einheit [20].

Die Aktivierung von Calcineurin kann zum einen durch den erhöhten Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle erfolgen, als auch durch eine erhöhte Freisetzung von Kalzium aus dem intrazellulären Kalziumspeicher des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) verursacht durch $G_{\alpha q}$ Rezeptoraktivierung. Downstream dephosphoryliert aktives Calcineurin die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (*nuclear factor of activated t-cells*), die nach Translokation in den Nukleus mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagieren, z.B. GATA4, MEF2, und eine hypertrophe Genexpression induzieren [21-24]. Bislang sind fünf NFAT-Transkriptionsfaktoren charakterisiert, von denen vier, NFATc1-4, über CalcineurinA reguliert werden [23].

Die Überexpression einer aktiven Form des CalcineurinA führt in Mäusen zu einer massiven Hypertrophie, die, verglichen mit den Wildtypmäusen, bis zu einer zweifachen Zunahme des Herzgewichtes führen kann. Diese konzentrische Hypertrophie führt im Verlauf des Alters zu einer Dilatation. Des Weiteren weisen diese Tiere eine starke Fibrose auf als auch eine Hochregulierung der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC [24].

Dass Calcineurin eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Hypertrophie spielt, belegen zusätzlich auch Daten von de Windt et al. und Rothermel et al. die zeigten, dass die Inhibierung von Calcineurin die Myokardhypertrophie reduziert [25-27]. Ein wichtiger endogener Calcineurin- Inhibitor ist das *myocyte enriched calcineurin interacting protein*, MCIP [28, 29]. Interessanterweise besitzt der MCIP1-Promotor mehrere NFAT-Bindestellen und wird somit abhängig über die Calcineurin-Aktivität exprimiert. Die MCIP Expression stellt intrazellulär eine positive Rückkopplung zur Kompensierung der Hypertrophie dar und inhibiert kompetitiv oder nicht kompetitiv Calcineurin an verschiedenen Domänen [30, 31].

1.2.2 Mitogen activated protein Kinasen-Kaskade (MAPK-Kaskade)

Die MAPK-Signalwege spielen eine zentrale Rolle in der Ausbildung der pathologischen Myokardhypertrophie. Die Aktivierung der Kinasen erfolgt

über die Bindung von GPCR-Agonisten an ihren spezifischen Rezeptor, z.B. Endothelin Rezeptor, AT1-Rezeptor, α 1-adrenerger Rezeptor, und löst intrazellulär Phosphorylierungskaskaden von Kinasen aus. Final werden die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38-MAPK und *c-Jun amino-terminal kinase* (JNKs) phosphoryliert und aktiviert. Diese bewirken wiederum eine Aktivierung verschiedener intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, wodurch vermehrt Proteine exprimiert werden, die das Wachstum der Kardiomyozyten induzieren [32, 33].

1.2.3 PI3K-Akt Signalweg

Nach Stand der aktuellen Forschung wird davon ausgegangen, dass der PI3K-Akt Signalweg, der durch Wachstumshormone wie Insulin oder IGF-I aktiviert wird, die physiologische Myokardhypertrophie reguliert. Die Serine/Threonine Kinase Akt oder Protein Kinase B (PKB) besitzt eine zentrale Rolle in der Regulierung verschiedener Signalwege im Myokard, die für das Herzwachstum, die kardiale Kontraktilität als auch die Angiogenese verantwortlich sind. In Säugern gibt es 3 Isoformen des Akt-Proteins, Akt1-3, wobei nur Akt1 und Akt2 im Myokard exprimiert werden [34-36]. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF1 oder Insulin, an Rezeptor-Thyrosin-Kinasen erfolgt die Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase alpha p100 α (PI3Kp100 α) der Klasse 1 α . PI3Kp100 α konvertiert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) zu Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3). Sowohl Akt als auch PDK-1 (phosphoinositide-dependent protein-kinase 1) werden durch PIP3 an die Zellmembran rekrutiert. Erst durch diese Nähe beider Moleküle findet eine Phosphorylierung von Akt durch konstitutiv aktiviertes PDK-1 am Threonin308 (Thr308) und am Serin473 (Ser473) über die mTOR-Aktivität (*mammalian Target of Rapamycin*) statt [37, 38]. Durch die vollständige Phosphorylierung von Akt kann es von der Membran dissoziieren und seine Substrate phosphorylieren, die unter anderem Einfluss auf das Zellwachstum, die Kontraktilität als auch die Angiogenese besitzen [39, 40]. Eine Überexpression des IGF-I-Rezeptors oder einer aktivierten Form von AKT als auch eine gesteigerte IGF-I/PI3Kp110 α -Signaltransduktion induzieren in Mäusen eine Myokardhypertrophie [40-42].

Umgekehrt zeigen Mäuse, die einem körperlichen Training ausgesetzt sind und bei denen der IGF-1/PI3K/AKT-Signalweg unterdrückt wird, keine Hypertrophie [41, 43]. Diese Daten belegen, dass die Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges über Wachstumshormone essentiell für die Ausbildung einer physiologischen Myokardhypertrophie ist.

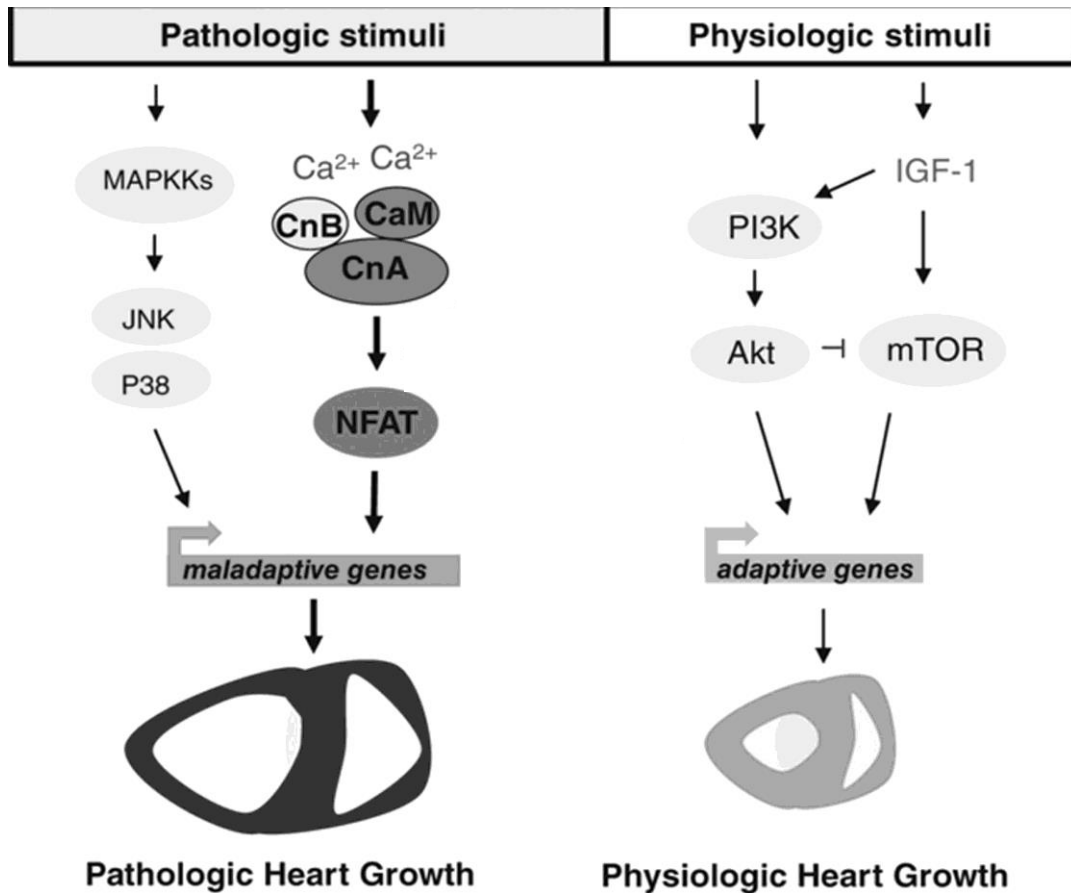


Abb. 2: Übersicht wichtiger Signalwege in der pathologischen und physiologischen Myokardhypertrophie.

Die physiologische Hypertrophie wird weitgehend über die Aktivierung der Akt-Kinase reguliert. Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (RTK), durch Wachstumshormone (z.B. Insulin-Growth-Factor-1) aktivieren Phosphoinositol-3-Kinase alpha p110 α (PI3Kp110 α), die wiederum zur Interaktion von Phosphoinositide-Dependent protein-Kinase 1 (PDK-1) und Akt führt. Die Phosphorylierung von Akt durch PDK-1 induziert downstream das Wachstum und Angiogenese. Ein wichtiges Schlüsselmolekül in der pathologischen Hypertrophie stellt die Phosphatase Calcineurin dar. Aktiviert durch einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel, dephosphoryliert Calcineurin den *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), der im Nukleus die prohypertrophe Genexpression induziert. (modifiziert nach [41])

1.3 *Remodeling* und Angiogenese

1.3.1 Die Rolle der Angiogenese beim kardialen *Remodeling*

Im Rahmen des kardialen *Remodeling* kommt es auch zu Veränderungen der Kapillarisation im Myokard. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten geht mit einem vermehrten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf einher, zum anderen entstehen durch die Volumenzunahme der Kardiomyozyten verlängerte Diffusionsstrecken, die das Angebot an Sauerstoff limitieren [44]. Die daraus resultierende Hypoxie als auch hypertrophe Stimuli führen in den Kardiomyozyten zunächst zu einer vermehrten Expression pro-angiogener Wachstumsproteine, wie z.B. dem *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) und induzieren das Wachstum bzw. die Neubildung von Kapillaren [45-48].

Hierbei wird grundsätzlich bei der Bildung neuer Gefäße zwischen Angiogenese und Vaskulogenese unterschieden. Bei der Vaskulogenese entstehen neue Blutgefäße aus endothelialen Progenitorzellen (EPZ), die eher in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt. Mittlerweile konnten Arbeiten zeigen, dass in der akuten Phase nach Myokardinfarkt oder durch Ischämie vermehrt EPZs zur Neovaskularisierung mobilisiert werden [49, 50]. Der für die Hypertrophie wohl entscheidendere Prozess ist die Angiogenese, bei der neue Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen durch Sprossung- und Spaltvorgängen entstehen.

Den wichtigsten pro-angiogenen Faktor stellt mit Sicherheit *Vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) dar. Durch die Bindung von VEGF-A an seine Rezeptoren Flt-1 (VEGF-Rezeptor 1, VEGFR-1) und vor allem Flk-1 (VEGF-Rezeptor 2, VEGFR-2) auf den Endothelzellen wird die Angiogenese verstärkt stimuliert [51, 52]. Die Expression von VEGF-A kann in den Kardiomyozyten über verschiedene Signalwege reguliert werden. Durch Hypoxie wird der *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) stabilisiert und induziert die VEGF-A Expression [53]. Zum anderen führt eine vermehrte Aktivität des PI3K-Akt-Signalweges mit folgender Phosphorylierung des *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) zu erhöhten VEGF-A Spiegeln [54]. Die Aktivierung des mTOR-Komplexes begünstigt auch eine Stabilisierung von

HIF-1 [55]. Zusätzlich kann VEGF-A Hypoxie-unabhängig über den Transkriptionsfaktor GATA4 reguliert werden, der durch hypertrophe Stimuli, die den ERK1/2-Signalweg induzieren, aktiviert werden [46, 56].

Welche Schlüsselrolle VEGF-A in der koordinierten Angiogenese und Myokardhypertrophie spielt, konnte in einigen *in vivo* Modellen aufgezeigt werden. Homo- oder Heterozygote VEGF-A Knock-out-Modelle weisen eine embryonale oder sehr frühe postnatale Letalität auf [57, 58]. Wird jedoch VEGF-A konditionell nur in Kardiomyozyten deletiert, weisen postnatale Mäuse eine Dilatation und basal kardiale Dysfunktion auf [59]. Eine Inhibierung des VEGF-A *Signalings* in der Hypertrophie durch die Inhibierung des VEGFR-2 (Flk-1), welcher hauptsächlich die Angiogenese induziert, führt zu einer Verringerung der Kapillardichte und zu kardialer Dysfunktion [47, 54]. Umgekehrt verbessert die Induktion der Angiogenese in der pathologischen Myokardhypertrophie die kardiale Funktion [60, 61]. All diese Daten zeigen auf, dass VEGF-A und die damit verbundene Angiogenese einen erheblichen Einfluss auf die pathologische Myokardhypertrophie ausübt.

Im Gegensatz zur physiologischen Hypertrophie, bei der keine Reduktion der Kapillardichte stattfindet, scheint in der pathologischen Hypertrophie genau dieses Gleichgewicht zwischen Kardiomyozytenwachstum und Angiogenese gestört zu sein [13, 62].

1.3.2 Transkriptionsfaktor *Hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α)

Der *Hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) ist ein heterodimerer Komplex, der ubiquitär im Gewebe exprimiert wird und den wichtigsten proangiogenen Transkriptionsfaktor in der Hypoxie darstellt [63]. Die katalytische α -Untereinheit und die konstitutiv exprimierte regulatorische β -Untereinheit gehören zur Proteinfamilie der Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS). Diese Domänen sind essentiell für die Heterodimerisierung beider Untereinheiten und zur Bindung an der *Hypoxia response element* (HRE) Promotorsequenz der DNA. HIF-1 α besitzt im N-Terminus zwei transkriptionale Aktivierungsdomänen N-TAD und C-TAD; wobei die C-TAD mit Koaktivatoren, wie z.B. CBP/p300, interagiert. Eine Sauerstoff abhängige

Degradationsdomäne, die ODDD (*oxygen dependent degradation domain*) reguliert die Sauerstoff-abhängige Stabilisierung des Proteins [3].

1.3.2.1 Sauerstoff-abhängige Regulierung

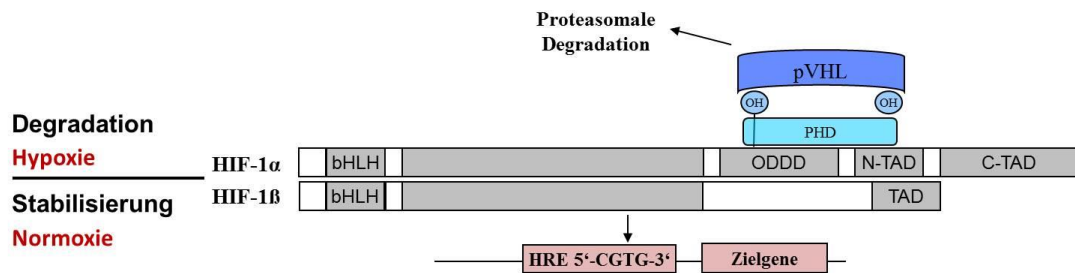
Unter normalen Sauerstoffbedingungen besitzt HIF-1 α eine sehr kurze Halbwertszeit. Die ODDD besitzt zwei Prolyl-Reste, Pro 406 und Pro564, die durch *Prolyl hydroxylase domain* (PHD) Enzyme hydroxyliert werden, was zu einer Interaktion mit dem von Hippel-Landau Tumor Suppressor Protein (pVHL) führt. pVHL ist ein Proteinkomplex der E3 Ubiquitin-Ligase und fördert die proteasomale Degradation von HIF-1 α [64, 65]. Des Weiteren führt eine Hydroxylierung des Asparaginrestes Asn803 in der C-TAD durch den *factor inhibiting HIF* (FIH) zur Inhibierung von HIF-1 α mittels des Koaktivator CBP/p300 und hemmt folglich die Transkriptionsaktivität [66, 67]. Unter hypoxischen Bedingungen dimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β im Nukleus, rekrutiert den Koaktivator CBP/p300 und bindet am HRE der DNA [68].

1.3.2.2 Sauerstoff-unabhängige Regulierung

Mittlerweile sind zwei Proteine bekannt, die HIF-1 α unabhängig von der Sauerstoffkonzentration regulieren. RACK-1 (*recetor for activated C-kinase-1*) und HSP90 (*heat shock protein 90*) kompetieren um ihre Bindestelle am HIF-1 α in der PAS-Domäne.

Die Bindung von RACK-1 an HIF-1 α induziert die proteasomale Degradation von HIF-1 α durch die Rekrutierung der E3 Ubiquitin Ligase, die jedoch unabhängig vom pVHL als auch von PHDs ist. Im Gegensatz dazu, stabilisiert HSP90 HIF-1 α . HSP90 ist ein Chaperone, das durch seine ATPase Aktivität neusynthetisierte Proteine vor Degradation schützt und zur richtigen Faltung behilft [69]. Eine weitere interessante Interaktion zeigt CalcineurinA mit RACK1 in einer humanen Krebszellline, die eine proteasomale Degradation von HIF-1 α inhibieren soll.[70]

➤ O₂-abhängig



➤ O₂ unabhängig

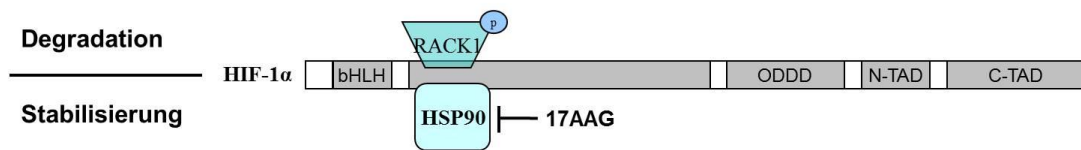


Abb. 3: Regulierung des Transkriptionsfaktors HIF-1α.

Der *Hypoxia inducible factor* (HIF) wird unter normalen Sauerstoff-Bedingungen über *Prolyl hydroxylase domain* (PHD) Enzyme hydroxyliert, die zu einer Bindung des Hippel-Landau Tumor Supressor Protein (pVHL) führt, dessen Bindung die proteasomale Degradation von HIF-1α induziert. Unter hypoxischen Bedingungen dimerisieren die HIF-1α und 1β Untereinheit und initiieren die Expression *Hypoxia response element* (HRE) abhängiger Gene. Sauerstoffunabhängig konkurrieren das *Heat shock protein 90* (HSP90) und die *Recetor for activated C-kinase-1* (RACK-1) um die Bindung an HIF-1α. RACK-1 begünstigt die Degradation, wohingegen HSP90 die Stabilisierung von HIF-1α auf Proteinebene induziert. Die Bindung von HSP90 wird durch 17-allylaminogeldanamycin (17AAG) inhibiert [2, 3].

2 Zielsetzung

Die Angiogenese scheint ein essentieller Bestandteil des kardialen *Remodelings* zu sein. Daher war das Ziel dieser Arbeit den Einfluss der Angiogenese im kardialen *Remodeling* bei der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie näher zu untersuchen.

Hierfür sollen drei *in vivo* Modelle der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie in Bezug auf die Angiogenese charakterisiert werden, um Aufschluss über folgende Fragestellungen zu erhalten

- (1) Welchen Stellenwert besitzt die Angiogenese in Bezug auf die Art der entstehenden Myokardhypertrophie und kann durch einer Inhibierung der Angiogenese eine physiologische in eine pathologische Hypertrophie überführt werden?
- (2) Wenn es im Rahmen der pathologischen Myokardhypertrophie zu einer Regulationsstörung der Angiogenese kommt, welchen Einfluss hat dann die hauptsächlich involvierte Calcineurin-NFAT-Signalkaskade?
- (3) Falls es eine Interaktion zwischen CnA und HIF-1 α gibt und CnA eher der pathologischen Hypertrophie zugeordnet wird, welchen Einfluss besitzt dann CnA auf HIF-1 α im Rahmen der Myokardhypertrophie?

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in höchsten Reinheitsmaß (pro analysis) folgender Firmen verwendet

Braun

AppliChem

Carl-Roth

Fluka

JT Baker

Merck

SERVA

Sigma-Aldrich

VWR

3.2 Spezielle Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
APS	Sigma-Aldrich
BIORAD Protein Assay	Biorad
Bouins Solution	Sigma-Aldrich
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer
Collagen A (1mg/ml)	Biochrom
Collagenase Typ 2, 250U/mg	Wothington
DMEM high Glucose	Gibco
Eukitt®	O. Kindle GmbH & Co
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom
Hämatoxylin QS	Vector Laboratories
Isofluran CP®	CP-Pharma
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Lipofektamin RNAiMAX	Invitrogen

Reagenz	Hersteller
APS	Sigma-Aldrich
BIORAD Protein Assay	Biorad
New Born Calf Serum (NBCS)	Gibco
Opti-Mem	Gibco
Percoll	GE Healthcare
Phenylephrin	Sigma Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Tablette	Roche
Pimonidazol	Tocris
Rotiphorese® Gel30 (37,5:1)	Carl-Roth
Penicillin (5000U/ml)/Streptomycin (5000µg/ml)	Gibco
TEMED	Sigma-Aldrich
TRIzol® Reagent	Ambion
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich
Trypsin 0,25%	Gibco

3.3 Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden in Reinstwasser angesetzt und anschließend steril filtriert oder autoklaviert, sofern nicht anders angegeben.

3.3.1 Nährmedien und Lösungen für zellkulturtechnische Methoden

DMEM <i>complete</i>	88% (v/v)	DMEM
	10% (v/v)	Fetales Kälberserum
	1% (v/v)	L-Glutamin
	1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin
DMEM serumfrei	98% (v/v)	DMEM
	1% (v/v)	L-Glutamin
	1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium	90% (v/v) 10% (v/v)	Fetales Kälberserum DMSO
10x ADS-Puffer pH 7,4	1163,6 mM 197,2 mM 94,2 mM 55,5 mM 53,6 mM 8,3 mM	NaCl HEPES NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O Glucose KCl MgSO ₄ x7H ₂ O
Verdau-Lösung	0,6 mg/ml 0,5 mg/ml In 1x ADS-Puffer	Pankreatin Collagenase Typ II
Stock-Lösung	90% (v/v) 10% (v/v)	Percoll 10x ADS Puffer
TOP-Phase	55% (v/v) 45% (v/v)	1x ADS Puffer+Phenolrot Stock-Lösung
Bottom-Phase	65% (v/v) 35% (v/v)	Stock-Lösung 1x ADS

3.3.2 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten

BSA-Standard		
6x DNA Ladepuffer	15% (m/v) 15% (m/v) 50 mM 0,5% (m/v)	Bromphenolblau Ficoll Typ 400 EDTA pH 8% SDS
4x Protein Ladepuffer	8% (m/v) 30% (v/v) 0,2 M 400 mM 0, 8% (m/v)	SDS Glycerol TRIS pH6,8 DTT Bromphenolblau
10x Laufpuffer	1,5% (m/v) 1% (m/v) 15% (m/v)	TRIS SDS Glycin
RIPA	10 mM 15 mM	TRIS pH 7,5 EDTA

	0,01% (v/v)	NP40
	0,5% (m/v)	Na-Deoxycholat
	0,1% (m/v)	SDS
50x TAE, pH 7,8	2 M	TRIS
	0,05 M	EDTA
10X TBS, pH 7,4	2,4% (m/v)	TRIS
	8,5% (m/v)	NaCl
10x Transferpuffer	14,42% (m/v)	Glycin
	3,3% (m/v)	TRIS

3.4 Olgonukleotide und *silencer*RNA

Oligonukleotide

Die folgenden Primer wurden von MWG Operon synthetisiert

Tabelle 1: Verwendete Primer

Verwendung	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
Genotypisierung	CnA-5'	GTCTATTCGGGAACCAAGCTGGAGTG
	CnA-3'	ACAGGCATCTACTGATGTGACCCAAC
Referenzgen	18S_F	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG
	18S_R	GGACATCTAAGGGCATCAC
Hypertrophie- marker Maus und Ratte	mr_BNP_F	CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT
	mr_BNP_R	CCTTGGTCCTTCAAGAGCTG
	mr_β-MHC_F	GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC
	mr_β-MHC_R	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC
	mr_ANP_F	TGC CGG TAG AAG ATG AGG TC
	mr_ANP_R	TGC TTT TCA AGA GGG CAG AT
Amplifizierung HIF-1alpha Zielgene für Maus	m_VEGFA_F	CAGGCTGCTGTAACGATGAA
	m_VEGFA_R	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA
	m_PGK-1_F	TGGCCAAGCTACTGTGGCCTCT
	m_PGK-1_R	TCGACCCACAGCCTCGGCAT
	m_LDHA_F	AGGCTCCCCAGAACAAGATT
	m_LDHA_R	TCTCGCCCTTGAGTTTGTCT

Verwendung	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
	m_BNIP3_F	CTGGGAGCGAGGTGGGCTGTC
	m_BNIP3_R	ACCATGTTCGCAGAGCGGGGA
	m_GLUT-1_F	GCTGTGCTTATGGGCTTCTC
	m_GLUT-1_R	CACATACATGGGCACAAAAGC
Amplifizierung HIF-1alpha Zielgene für Ratte	r_VEGFA_F	GTGTTGGGATTCGGCTTG
	r_VEGFA_R	GCAGAAGTCGCTGTGTGGT
	r_PGK-1_F	CGTGAAGGGGAAGCGGGTTCG
	r_PGK-1_R	GGACGGCCCAGGTGGCTCATA
	r_BNIP3_F	TGCGGAGCCACCATGTCGCA
	r_BNIP3_R	TCTGGGAGCGAGGTGGGCTGTC
	r_GLUT-1_F	TCCGGCGGGAGACGCATAGT
	r_GLUT-1_R	GGCGGCCCGTCACCTTCTTG

silencerRNA (siRNA)

Alle siRNA's wurden von Ambion als *Silencer*®Select Pre-designed siRNA verwendet.

Tabelle 2: verwendete silencerRNA

Gen		Sequenz 5'-3'
HSP90	sense	AGUCAUCCGCAAAAACAUUt
	antisense	AAUGUUUUUGCGGAUGACUtt

3.5 Antikörper

Tabelle 3: verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper für Western Blot		
Akt	1:1000	Cellsignalling
Phospho-Akt Ser473 (587F11)	1:1000	Cellsignalling
Angiopoietin-2	1:1000	Cellsignalling
Flk-1 (C-1158)	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Flt-1 (C17)	1:500	Santa Cruz Biotechnology
HIF-1α	1:500	Abcam
HSP90	1:1000	Cellsignalling
p53 (1C12)	1:1000	Cellsignalling

V5	1:2000	Invitrogen
α -Tubulin	1:2000	Sigma-Aldrich
VEGF-A	1:250	Millipore
VEGF-B	1:500	Abcam
2. Antikörper für Western Blot		
donkey anti-rabbit IgG-HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG-HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology
1. Antikörper für Immunfluoreszenz		
Actinin	1:200	Sigma Aldrich
Fluoreszein-Isolectin B4	1:100	Vectorshield

3.6 Adenoviren

AdCnA	Überexpression einer murinen aktiven Form von CnA α Aminosäuren 1-398, das mit einem V5-Anhang gekoppelt ist, Regulierung über CMV-Promotor [71]
AdNFAT-GFP	Überexpression einer konstitutiven nuklearen Form des NFATc1, Regulierung über einen CMV-Promotor
AdLacZ	Expression LacZ, Regulierung über CMV-Promotor
AdGFP	Expression GFP, Regulierung über CMV-Promotor

3.7 Komplettsysteme

System	Hersteller
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
SYBR GreenER qPCR Supermix	Invitrogen
Type it Mutation Kit	Quiagen

3.8 Verwendete Längenstandards

3.8.1 Protein-Gelelektrophorese

PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific

3.8.2 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

GeneRuler DNA Ladder Mix Thermo Scientific

3.9 Verwendete Zelllinien und Primäkulturen

HEK293A *human embryonal kidney*; Stabil transfiziert mit dem SV40 Large T-Antigen

3.10 Verwendete Versuchstiere

3.10.1 *Mus musculus*

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund

CnATg CalcineurinA Überexpression transgene Mäuse im C57BL/6-Hintergrund [24]

3.10.2 *Rattus Norvegicus*

CrI:WI Wistar-Ratte

3.11 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Aspirationspipette 2 ml	Greiner Bio-one
BioMax MR Film	Kodak
Bottle Top-Filter 0,22 µm	Millipore
Chromatographie Papier	Whatman™

Material	Hersteller
Deckgläser	Mariefeld
Einbetttschälchen	Polysciences
Filter (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Gewebekulturflaschen (T-25;T-75; T-175)	Sarstedt, Nürnberg
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
ImmEdge Pen	Vector Laboratories
Kanülen, 27G, 30G	BD Microlane
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one
Optically Clear Adhesive Seal Sheets	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten (5; 10; 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen (10 µl – 1000 µl)	Steinbrenner, Wiesbaden
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, RNase und DNase frei (1,5 ml; 2,0 ml)	Nunc
Röhrchen (15 ml; 50ml)	Sarstedt;Nürnberg
Skalpell	Braun, Melsungen
Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Adhäsionsobjektträger	
Thermo-Fast 96 Detection Plate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Transfermembran WestranS 0,2 µm	Whatman™
Zählkammer nach Neubauer	Hecht Assistent
Zellkulturschalen, 6 cm	Nunc
Zellkulturschalen, 15 cm	Greiner Bio-one
Zellschaber	Greiner Bio-one

3.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer Mini Protean	BioRad
Elektrophoresekammer Nukleinsäure	BioRad
Feinwaage	Mettler Toledo
Filmkassette	Agfa
iCycler PCR Maschine	Biorad
ChemiDoc™ MP System	Biorad

Gerät	Hersteller
Microfuge®22R Centrifuge	Beckman Coulter
Microfuge®18 Centrifuge	Beckman Coulter
Mikroskop Olympus SZX16	Olympus
MiniVent Ventilator for Mice	Harvard Apparatus
Kamerasystem Olympus XC30	Olympus
Kleintier-Anästhesie Isofluran Vaporizer	Artisan Technology Group
Kryotom	Shandon
MyIQ qPCR Maschine	Biorad
Power Pac 200	Biorad
Power Pac Basic	Biorad
Tecan Spectra Mini	Tecan
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultra Turrax 25	Janke&Kunkel
Wärmeplatte für Kleintiere	Omnilab

3.13 Zellkulturtechnische Methoden

3.13.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die verwendete Zelllinie, sowie die isolierten neonatalen Rattenkardiomyocyten (NRVCM) wachsen adhärent und wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen oder Multiwell-Platten bei 37°C, 5% CO₂-Anteil und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Verwendete Lösungen oder Medien wurden vor der Benutzung auf 37°C erwärmt. Für zellkulturtechnische Arbeiten wurden ausschließlich sterile Lösungen, Medien sowie Verbrauchsmaterialien verwendet.

3.13.2 Kultivierung und Kryokonservierung von HEK293A Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete HEK293A Zelllinie (*human embryonal kidney*) exprimiert stabil das SV40 Large T-Antigen und wurde ausschließlich zur Adenovirus-Produktion verwendet. Im Vergleich zu der HEK293T Zelllinie, weist die A-Zelllinie eine bessere Adhärenz auf.

Zur Inkulturnahme der Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37°C schnellst möglichst aufgetaut, in DMEM *complete* verdünnt und anschließend bei 1200 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem der Zellkulturflasche entsprechendem Volumen an DMEM *complete* resuspendiert und in die Kulturflasche überführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreichten, mussten Sie im Verhältnis zwischen 1:5 bis 1:10 geteilt werden. Hierzu wurde das Medium in der Flasche abgesaugt und die Zellen vorsichtig einmal mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) gewaschen. Mit einer der Kulturfläche entsprechenden Menge an Trypsin wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen von der Oberfläche abgelöst haben.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von DMEM *complete*, in dem die Zellen dann gleichzeitig resuspendiert wurden, um sie anschließend im gewünschten Verhältnis in den neuen Kulturgefäßen zu verdünnen.

Zur langfristigen Konservierung von Zellen wurden diese bei -196 °C in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs gelagert. Das Einfriermedium besteht zu 90 % aus FCS und 10 % DMSO, das die Eiskristallbildung inner- und außerhalb der Zelle verhindert.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturfläche abgelöst, in Medium aufgenommen und bei 1200 rpm für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im benötigten Volumen an Einfriermedium aufgenommen. Pro Kryoröhrchen wurden 1,5 ml Zellsuspension abgefüllt. Die Lagerung der Zellen erfolgte zuerst über Nacht bei -80 °C und anschließend bei -196°C im Stickstofftank.

3.13.3 Adenovirusproduktion

Für die Adenovirusproduktion wurde die HEK293A-Zelllinie verwendet und gehandhabt, wie unter 3.12.2 beschrieben.

Zuerst wurden HEK293A Zellen in eine T175 Kulturflasche ausgesäht und bei einer Konfluenz von 80-90% mit einem Volumen zwischen 2-5µl von dem Stammaliquot des Adenovirus infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald die Lyse der HEK293A Zellen eintrat, wurden die Zellen von der Kulturoberfläche abgespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1200

rpm für 5 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml verworfen und die Zellen in dem restlichen Medium resuspendiert. Nach dreimaligem Frier-Tau Zyklus, sollten die Zellen überwiegend aufgeschlossen sein und der produzierte Adenovirus freigesetzt sein. Der ungewollte Zellschrott wurde bei 4.500 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Großproduktion des Adenovirus wurden im Voraus 20 Kulturschalen mit HEK293A Zellen ausgesäht und ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Der eben gewonnen Überstand mit den Adenoviruspartikeln wurde gleichmäßig auf 19 Kulturschalen verteilt, eine Kulturschale diente als Negativkontrolle. Die Ernte aller infizierten Schalen erfolgte genauso, wie oben beschrieben. Die Zellen wurden wieder ab zentrifugiert, die Viruspartikel durch Frier-Tau Zyklen freigesetzt und der Zellschrott abzentrifugiert. Der Überstand mit den Adenoviruspartikeln wurde bei -80°C gelagert.

3.13.4 Aufreinigung der Adenoviren

Um weitere Zelltrümmer aus der Adenovirus-Suspension zu entfernen, die durch Zentrifugation nicht abgetrennt werden konnten, wurde diese über einen Cäsiumchlorid (CsCl)-Gradienten aufgereinigt. Hierfür wurden zuerst Zentrifugenröhrchen mit 3 ml der leichten CsCl Phase, Dichte 1,2 mg/cm³, befüllt und mit 3 ml der schweren CsCl-Phase, Dichte 1,4 mg/cm³ unterschichtet. Von der Adenovirus-Suspension werden 2-3 ml auf die CsCl-Phase gegeben und bei 220.000xg für 4h bei 4°C zentrifugiert. Die Bande mit den Adenoviruspartikeln wurde mit einer Kanüle abgezogen und nochmals über einen CsCl-Gradienten über Nacht zentrifugiert und die Adenoviruspartikel eluiert. Die CsCl-Reste wurden per Dialyse mit einer Slight-a Lyzermembran und PBS als Dialysepuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Virus aus der Dialysekassette gezogen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.13.5 Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Aus 1-3 Tage alten Ratten wurden die Herzen entnommen und auf Eis in 1x ADS-Puffer gesammelt. Anschließend wurden die Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel geviertelt. Die Kardiomyozyten wurden in mehreren Verdauschritten vom Gewebe abgelöst. Hierfür wurden die zerkleinerten Herzen in ca. 25 ml Verdaulösung aufgenommen und bei 37°C für 20 min unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Nach dem ersten Verdauschritt wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Nach jedem anderen Verdau wurde die Verdaulösung mit den Kardiomyozyten durch ein Sieb (Porengröße 0,2 µm) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt um die Zellen zu vereinzeln. Es wurden 5 ml NCBS hinzugegeben und die Zellen für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml NCBS vorsichtig resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Diese Schritte wurden so lange wiederholt (4-5 Mal) bis nur noch weißes Kollagengerüst vorhanden war.

Die Zellen aus den einzelnen Verdauschritten wurden gepoolt, auf 50 ml mit NCBS aufgefüllt und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde der Percollgradient vorbereitet. Hierfür wurden pro Gradient in ein 15 ml Reaktionsgefäß 4 ml von der oberen Phase vorgelegt und anschließend mit 3 ml der unteren Phase unterschichtet.

Anschließend wurde der Überstand von den zentrifugierten Zellen verworfen und das Pellet in 2 ml 1x ADS pro Gradient resuspendiert. Der Percollgradient wurde mit der Zellsuspension überschichtet und für 30 min bei 2500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Phase mit den Kardiomyozyten wurde abpipettiert und von allen Gradienten in ein Reaktionsgefäß gesammelt, mit 1xADS auf 50 ml aufgefüllt und für 5 min bei 1200 rpm bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen nochmals mit 1xADS resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit DMEM *complete* resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und in die benötigten Kulturgefäße ausplattiert.

Für RNA-Analysen wurden 5×10^5 Zellen pro Loch in eine 12-Loch-Platten, für Protein-Analysen 3×10^6 Zellen pro 6 cm-Schale verwendet. Nach 48h wurde das Medium gewechselt und auf serumfreies DMEM umgestellt.

3.13.6 Transfektion neonataler Rattenkardiomyocyten

Für alle Versuche wurden die Zellen 12h vor Versuchsbeginn auf serumfreies Medium umgestellt.

3.13.6.1 Transfektion mittels Adenoviren

Die Zellen wurden mit einer MOI (*multiply of infection*) von 50 transfiziert und für 24-48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24-48h wurden entweder die Proteine oder die RNA isoliert.

3.13.6.2 Inhibierung der Transkription von Proteinen mittels siRNA

Durch das Einbringen von siRNA wurde gezielt die Transkription definierter Proteine inhibiert. Die Transfektion der Zellen mit 30nM siRNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Lipofectmine®RNAiMAX-Kit (Invitrogen) 24h vor Infektion mit Adenoviren.

3.14 Molekularbiologische Methoden

3.14.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.14.1.1 Isolierung totaler RNA

Die Isolierung von RNA aus Gewebe und aus Zellen erfolgte nach der Methodik von Chomczynski und Sacchi [72]. Hierfür wird das Reagenz TRIzol (Invitrogen) verwendet, das Guanidiniumthiocyanat enthält, welches die Zellen lysiert und RNasen inaktiviert.

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wurde dieses in 1 ml TRIzol mittels Ultra Turrax homogenisiert, für 5 min auf Eis inkubiert und in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und

mehrfachem Invertieren werden die Phasen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 14.000 rpm getrennt. Die obere klare Phase, in der die RNA gelöst ist, wird in neues RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl wurde die RNA für 15 min auf Eis präzipitiert und anschließend 15 min bei 4°C, 14.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet 2x mit 75%igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 21 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden diese mit 1 ml TRIzol von der Kulturoberfläche abgelöst und in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt und wie eben beschrieben aufgereinigt.

3.14.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Maus

Für die Genotypisierung von Mäusen wurden Schwanzbiopsien im Alter von ca. zwei Wochen genommen und in 650 µl 50mM NaOH gegeben und bei 98°C für 15 min stark geschüttelt. Nachdem die Ansätze abgekühlt waren, wurden 50 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) zur Neutralisierung hinzugegeben und für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Im Überstand ist nun die genomische DNA enthalten und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.14.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des Nanodrop (Pqlab) und wurde nach Herstellerangaben benutzt. Alle RNA und DNA-Proben wurden unverdünnt gemessen.

3.14.2 cDNA Synthese

Zur Analyse der Genexpression mittels qPCR-Methode muss die Isolierte RNA in sogenannte cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Hierfür werden entweder Teilabschnitte oder die komplette RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in den komplementären Strang umgeschrieben. Zur Transkription der kompletten RNA werden Random-

Hexamer-Primer (6 zufällig zusammengesetzte Nukleotide) verwendet. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR System (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transkribiert. Anschließend wurde die cDNA 1:200 verdünnt.

3.14.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.14.3.1 Genotypisierung der CnATg-Mauslinie

Für die Genotypisierung der CnATg-Mauslinie wurde DNA aus der Schwanzspitze isoliert und anschließend die Überexpression von CalcineurinA über eine PCR typisiert.

PCR-Ansatz	5,0 µl	H ₂ O
	10,0µl	2x PCR Mix Type it Quiagen
	2 µl	Primer CnA 5'
	2 µl	Primer CnA 3'
	1 µl	genomische DNA

PCR-Programm:	<u>95°C</u>	<u>2 min</u>	} 30 Wiederholungen
	95°C	30 sec	
	57°C	30 sec	
	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>	
	72°C	7 min	
	4°C	∞	

3.14.3.2 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur Bestimmung der relativen Expression von Genen. Hierbei wird während der PCR noch zusätzlich die Menge an cDNA durch fluoreszierende Farbstoffe, z.B. SYBR Green, quantifiziert. SYBR Green bindet an doppelsträngiger DNA bzw. an den doppelsträngigen PCR-Produkten und absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{max} = 521$ nm. Diese Fluoreszenz wird während der Elongation bei jedem Zyklus quantifiziert. Der Zeitpunkt, an dem dieses Signal das Hintergrundleuchten überschreitet wird als Ct-Wert (Cycle-Treshold) bezeichnet, mit dem dann die

relative Expression über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Für die q-RT-PCR wurde das SYBR GreenER™ qPCR SuperMix universal (Invitrogen) wie folgt verwendet:

PCR-Ansatz	6,8 μ l	H ₂ O
	15 μ l	2x PCR Mix Type it Quiagen
	0,6 μ l	Primer CnA 5'
	0,6 μ l	Primer CnA 3'
	6 μ l	cDNA

qPCR-Programm:	50°C	2 min	
	95°C	10 min	
	95°C	30 sec	} 40 Wiederholungen
	57°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
	55-90°C	7 min	
	4°C	∞	

Am Ende des qPCR Programms wurde standardmäßig ein Temperaturgradient von 55-90°C hinzugefügt, um auszuschließen, dass mehrere Produkte amplifiziert wurden. In diesem Schritt wurde schrittweise die Temperatur um 0,5°C erhöht und die Fluoreszenz gemessen.

3.14.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden Gele mit 1-2% Agarose in 1x TAE Puffer hergestellt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid ins Gel kann später die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde noch ein Längenstandard von 100-10.000 bp aufgetragen. Durch eine an das Gel angelegte Spannung von 10V/cm wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Unter UV-Licht wurde das Bandenmuster sichtbar und wurde mit dem ChemiDOC™ MP System detektiert.

3.15 Proteinbiochemische Methoden

3.15.1 Aufreinigung von Proteinen

Für die Isolierung von Proteinen aus Zellen wurden diese in 80 µl RIPA komplett abgeschabt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert, um eine vollständige Lyse aller Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 14.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei der Isolierung von Proteinen aus Gewebe wurde dieses mit dem Ultra Turrax im entsprechenden Volumen an RIPA komplett homogenisiert und anschließend die Gewebereste in der Zentrifuge für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die isolierten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

3.15.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Proteinbestimmung wurde das Protein Assay Dye Reagent Kit (BioRad) nach Herstellerangaben benutzt. Die isolierten Proteine aus Zellen wurden 1:5, die aus Gewebe 1:10 vorverdünnt und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration quantifiziert werden.

3.15.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Proteingemische können im SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die Zugabe von SDS werden alle Proteine mit einer negativen Ladung ummantelt und wandern somit im elektrischen Feld zur Anode. Je nach Molekülgröße wurden Gele zwischen 7,5% und 12,5% verwendet. Mit Hilfe einer BioRAD-Gelgießvorrichtung wurde zuerst das Trenngel hergestellt und auspolymerisieren lassen bevor es mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4 nachzulesen. Parallel wurden 150 µg Proteinlösung mit

4x Proteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C degradiert. Die Proben und ein Längenstandard wurden bei 200V ca. 60 min im Gel aufgetrennt.

Tabelle 4: Übersicht Zusammensetzung Trenngel für SDS-Polyacrylamidgel

Trenngel	8%	10%	12,5%
H ₂ O	9,1 ml	7,8 ml	6,1 ml
TRIS 1,5 M pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
Acrylamid	5,4 ml	6,6 ml	8,4 ml
10% SDS	400 µl	400 µl	400 µl
10% APS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	16 µl	16 µl	16 µl
Sammelgel			
H ₂ O	5,64 ml		
TRIS 0,5 M pH 6,8	2,5 ml		
Acrylamid	1,5 ml		
10% SDS	200 µl		
10% APS	150 µl		
TEMED	8,5 µl		

3.15.4 Western Blot

Nach dem Auftrennen der Proteine wurden diese zur weiteren Immunodetektion auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurden der Reihenfolge nach ein Schwamm, 2 Lagen Whatmann-Papier, das SDS-Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran, 2 Lagen Whatmann-Papier und ein Schwamm übereinander gelagert. Die PVDF-Membran musste zuvor in Methanol aktiviert werden und alle anderen Materialien in 1x Transferpuffer getränkt werden. Dieses Schichtsystem wurde in eine Halterung gesteckt anschließend senkrecht in eine Transferkammer gesteckt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 100V. Anschließend wurde die Membran für 2 h in Blocklösung, 5% Milchpulver in TBS-T 0,1% oder PBS-T 0,1%, geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Der Primärantikörper (siehe 3.5) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x 5 min Waschen in TBS-T

0,1% oder PBS-T0,1% wurde der Sekundärantikörper für 1h bei RT inkubiert und anschließend wieder für 3x für 5 min von der Membran gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran für 2 min in ECL inkubiert und das Signal auf einen Röntgenfilm übertragen, der mit dem Hyper Processor (Amersham) entwickelt wurde.

3.15.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, bei der ein Antigen mit seinen Interaktionspartner mittels eines spezifischen Antikörpers aus einem Homogenat aufgereinigt und aufkonzentriert werden kann, um Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen.

Für die Immunpräzipitation wurden 1 mg Gewebe- oder Zelllysate (siehe 3.15.1) mit 1µg Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Dynabeads® Protein G hinzugegeben und für weitere 2h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. An diesen magnetischen Kügelchen ist das Protein G kovalent gekoppelt, das am C-Terminus Bindungsdomänen aufweist, die eine hohe Affinität zur Fc-Region des IgG aufweist. Es kommt somit zu einer Komplexbildung mit den Antikörpern und ihrem Antigen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben auf einen Magnetständer gesetzt. Im Bereich des Magnetes sammelte sich nun dieser Komplex und der restliche Überstand konnte abgenommen werden. Die Präzipitate wurden 3x mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend mit 50 µl 1x Ladepuffer versetzt. Durch 5 minütiges Aufkochen der Proben bei 95°C wurde sowohl die Bindung von dem Präzipitat und der Dynabeads® Protein G als auch die Bindung der Interaktionspartner von dem präzipitierten Protein aufgelöst. Anschließend wurden die Dynabeads® Protein G aus der Probe abgetrennt und der Überstand per Western Blot für weitere Analysen aufgetrennt.

3.16 Versuchstierkundliche Methoden

3.16.1 Haltung und Zucht

Die verwendeten Mäuse und Ratten wurden in der Interfalkultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg untergebracht. Die Tiere hatten ad libitum Zugriff zu standardisiertem Trockenfutter und Trinkwasser. Die Zucht- und Experimentalräume besaßen eine Temperatur von 22-24°C und der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12 Stunden.

3.16.2 Transverse Aorten-Konstriktion

Für die Untersuchungen der pathologischen Myokardhypertrophie wurde in Mäusen eine erhöhte Druckbelastung durch eine Aortenstenose im linken Ventrikel induziert. Die operative transverse Aortenkonstriktion wurde von Herrn Kai Jarr (AG Chorianopoulos, Uniklinik Heidelberg) vorgenommen. Hierfür wurden acht Wochen alte C57Bl/6- Mäuse mit Medetomidin (500 µg/kg Körpergewicht) sediert und anschließend mit einer Endotrachealkanüle intubiert und mit Isofluran 1,5% v/v beatmet, um eine ausreichende Sedierung aufrechtzuhalten. Die Sedierung wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Die Maus wurde auf eine 37°C warme Wärmeplatte fixiert, der Brustkorb rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde zunächst die Haut, danach die darunterliegenden Muskelschichten scharf durchtrennt, sodass ein Zugang zur Aorta und den aortalen Gefäßabgängen durch den zweiten linken Interkostalraum geschaffen wurde. Die Konstriktion der Aorta erfolgte zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und dem Abgang der Aorta carotis. Hierfür wurde eine 27 G Nadel auf die Aorta platziert, mit Hilfe eines Prolene 8-0-Fadens eine Ligatur gesetzt und die Nadel wieder entfernt. Anschließend wurden die Rippen, danach die Muskulatur und die Haut mit Einzelknopfnähten genäht. Nach Abschluss der Operation wurde die Maus mit intraperitonealer Atipamezol-Applikation (750 µg/kg Körpergewicht) antagonisiert und erhielt eine perioperative subkutane

Schmerztherapiebehandlung mit Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht). Die scheinoperierten Mäuse unterlagen einer identischen Prozedur, jedoch ohne Konstriktion der Aorta.

3.16.3 Physiologische Hypertrophie durch Ausdauertraining

Die physiologische Myokardhypertrophie sollte mittels Ausdauertraining durch konditionelles Schwimmtraining induziert werden. Männliche acht Wochen alte C57Bl/6- Mäuse wurden einem zwei bis vier-wöchigem Schwimmtraining unterzogen. Hierfür wurde ein Schwimmbecken konstruiert mit 10 gleichgroßen Kammern. Das Wasser wurde auf 31°C temperiert, einer Temperatur ähnlich der Körpertemperatur der Mäuse. Des Weiteren wurde im Becken ein Luftblasenstrudel erzeugt, um ein einfaches Treibenlassen der Mäuse an der Wasseroberfläche zu verhindern. Das Training erfolgte zweimal täglich mit einer vierstündigen Pause. Die Schwimmdauer betrug am ersten Tag 10 min und wurde täglich um weitere 10 min verlängert bis nach neun Tagen die maximale Trainingsdauer von 90 min erreicht wurde. Nach dem Training wurden die Mäuse abgetrocknet und auf eine Wärmedecke gestellt, um eine starke Absenkung der Körpertemperatur zu vermindern.

3.16.4 Echokardiographie

Um die Herzen echokardiographisch zu untersuchen, wurden die Tiere kurzfristig mit Isofluran sediert und der Brustkorb rasiert. Die Echokardiographie wurde mit einem Vevo® 2100 System von Visualsonics mit einem 10 MHz-Schallkopf durchgeführt. Die Messungen erfolgten verblindet durch Herrn Dr. med. E. Chorianopoulos, der pro Tier drei unabhängige Messungen durchführte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Herzfrequenz der zu untersuchenden Tiere zwischen 450-600 Schläge/pro Minute lag. Mit Hilfe des M-Mode wurde die Fraktionelle Verkürzung (*FS-fractional shortening*) anhand folgender Formel berechnet:

$$FS=(LVEDD-LVEDS)/LVEDD*100$$

(LVEDD-enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels, LVESD-Endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels)

3.16.5 Euthanasierung und Organentnahme

Die Mäuse wurde durch zerebrale Dislokation getötet und ihr Körpergewicht gemessen. Anschließend wurden die gewünschten Organe, vor allem das Herz, entnommen, in PBS gespült und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Untersuchungen am linken Ventrikel wurde der rechte Ventrikel entfernt und der linke Ventrikel sagittal durchtrennt, die eine Hälfte wurde in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C für histologische Untersuchungen, gelagert. Die andere Hälfte des linken Ventrikels wurde nochmals durchtrennt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.17 Behandlung der Mäuse mit VEGF-2R Inhibitoren und HSP90 Inhibitor

Die Inhibierung der Angiogenese erfolgte mit zwei unterschiedlichen VEGFR-2 Inhibitoren, SU5416 und mAB VEGFR-2, Klon DC101 (DC101). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von vier Wochen behandelt und anschließend exekutiert. SU5416 wurde zweimal wöchentlich mit einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Als Kontrollinjektionslösung wurde eine adäquate Menge DMSO verabreicht. Von dem neutralisierenden Antikörper DC101, bzw. NaCl als Kontrolle, wurden dreitägig 400 µg i.p. verabreicht.

Die Inhibition des *Heat shock protein 90* (HSP90) erfolgte mit Geldanamycin-Analogen 17AAG jeden zweiten Tag mit 25 mg/kg Körpergewicht i.p. Als Kontrollsubstanz wurde DMSO verwendet.

3.18 Histologische Methoden

3.18.1 Herstellung von Dünnschnittpräparaten aus Organen

Für histologische Färbungen wurden 4 µm dicke Dünnschnittpräparate mit einem Kryotom von Shandon angefertigt und bei -80°C gelagert.

3.18.2 Bestimmung der Kapillardichte im linken Ventrikel

Für die Bestimmung der Kapillardichte wurden Dünnschnittpräparate in 4% PFA+PBS für 10 min bei 4°C fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend wurden mit 5% BSA+TBS-T 0,1% unspezifische Bindungsstellen geblockt. Die Anfärbung der Kapillaren erfolgte mit fluoreszein-gekoppeltem Isolektin (1:50 in 5% BSA+TBS-T 0,1%) über Nacht bei 4°C.

3.18.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (Version 5.0). Alle Werte werden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler) angezeigt. Die Berechnung der Signifikanzen wurde beim Vergleich von 2 Gruppen mittels nichtparametrischem t-test nach Mann-Whitney berechnet. Für mehr als 2 Gruppen wurde die Signifikanz mit dem One-Way-ANOVA und anschließendem t-test nach Mann-Whitney errechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung verschiedener *in vivo*-Modelle zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie

4.1.1.1 Physiologische Hypertrophie- Schwimmmodell

Die physiologische Myokardhypertrophie sollte in Mäusen durch ein spezielles zwei bis vier wöchiges Schwimm-Ausdauertraining induziert werden (siehe 3.16.3). Verglichen mit den Kontrollmäusen, die sich keinem körperlichen Training unterziehen mussten, konnte bereits nach 2 Wochen eine Zunahme des LV/Tibia-Verhältnisses von $18\% \pm 3\%$ in den trainierten Mäusen erzielt werden, das sich noch bis Ende der Trainingsdauer von vier Wochen auf $25\% \pm 4\%$ vergrößerte. Zu diesem Zeitpunkt war die linksventrikuläre Funktion, gemessen als *fractional shortening* (FS), vergleichbar mit derjenigen untrainierter Tiere (Abb. 4A).

Neben der Hypertrophie des linken Ventrikels war auch eine signifikante Verbesserung der Kapillardichte bereits nach 2 Wochen von $11\% \pm 2\%$ zu beobachten, die nach vier Wochen Training leicht auf $13\% \pm 1\%$ ansteigt. (Abb. 5A)

4.1.1.2 Pathologische Hypertrophie-transverse Aortenkonstriktion (TAC)

Im TAC-Modell wurde durch operativen Eingriff der Aortenbogen zwischen dem *Truncus brachiocephalicus* und der linken *Aorta carotis* durch Ligatur verengt, was zu einer erhöhten Druckbelastung im linken Ventrikel führte (siehe 3.16.2). Nach zwei bzw. vier Wochen post-OP konnte eine LV-Massenzunahme von $30\% \pm 3\%$ bzw. $50\% \pm 5\%$ erzielt werden, sowie eine Verschlechterung des FS um $-20\% \pm 4\%$ im Vergleich zu den Scheinoperierten Tieren (sham). (Abb. 4B)

Des Weiteren ist nach vier Wochen postoperativ eine deutliche Verminderung der Kapillardichte von $-9\% \pm 3\%$ im linken Ventrikel nachweisbar. (Abb. 5B)

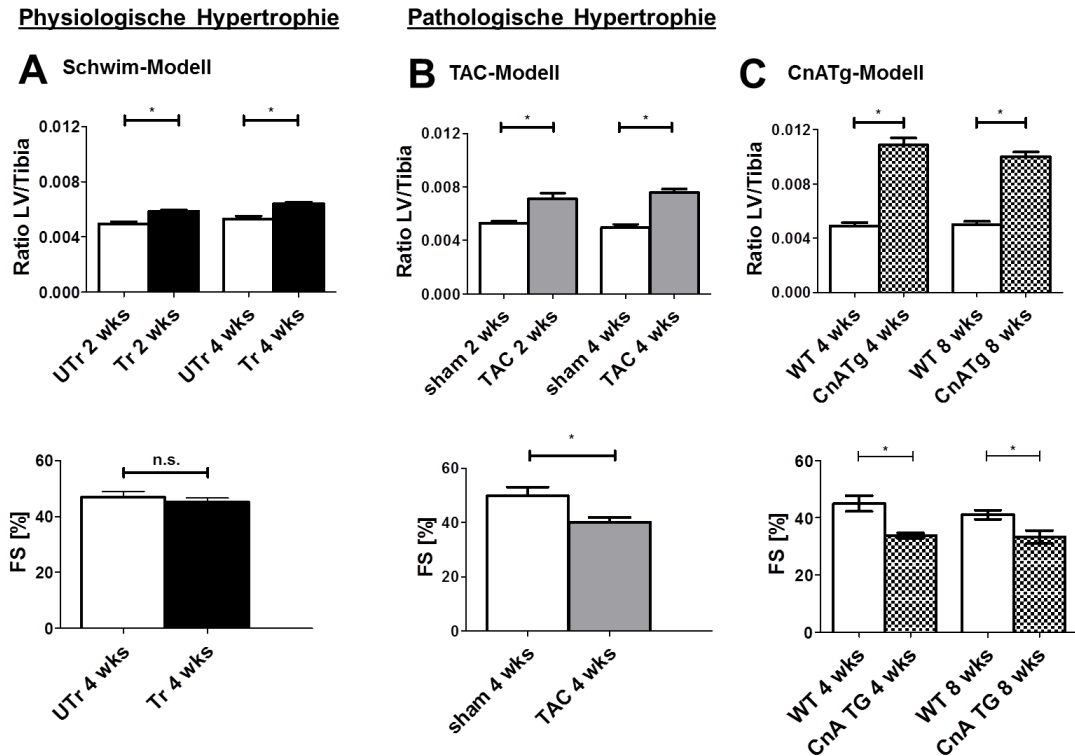


Abb. 4: Vergleich der linksventrikulären Hypertrophie und der fraktionellen Verkürzung in *in vivo*-Modellen der physiologischen und pathologischen Myokardhypertrophie.

(A) Männliche acht Wochen alte Mäuse wurden einem kontinuierlichem Schwimmtraining für zwei oder vier Wochen unterzogen. Nach zwei Wochen konnte schon eine eindeutige Zunahme des LV/Tibia Verhältnisses gemessen werden, welches sich nach vier Wochen Training nochmals gering vergrößerte. Zum Endpunkt des Trainings war kein Unterschied in der kardialen Funktion der trainierten Mäuse im Gegensatz zu den nicht trainierten Mäusen messbar (UTr-untrainierte Mäuse, n=5, Tr trainierte Mäuse, n=10). (B) Durch eine transverse Aortenkonstriktion (TAC) in männlichen Mäusen konnte nach vier Wochen post-op eine Vergrößerung des linken Ventrikels von ca. $50\% \pm 5\%$ induziert werden. Zusätzlich konnte eine Verschlechterung des FS von $-20\% \pm 4\%$ gemessen werden (2 Wochen: sham-scheinoperiert, n=5, TAC-transverse Aortenkonstriktion, n=8; 4 Wochen: sham n=4, TAC n=6). (C) Calcineurin transgene Mäuse (CnATg) überexprimieren eine aktive Form des CalcineurinA, das schon im jungen Alter von vier Wochen einen stark vergrößerten linken Ventrikel induzierte, das Verhältnis von der Masse des LV zur Tibia blieb zu späteren Zeitpunkten konstant (4 Wochen: WT- Wildtyp, n=4; CnATg- Überexpression CnA, n=4; 8 Wochen: WT- n=5; CnATg n=5).

* $p < 0,05$; n.s.- nicht signifikant

4.1.1.3 Pathologische Hypertrophie- CalcineurinA transgenes Mausmodell (CnATg)

Das CnATg-Mausmodell überexprimierte eine aktive Form des CalcineurinA im Myokard und induzierte schon im jungen Alter der Mäuse von 4 Wochen einen bis zu 2,2 fach vergrößerten linken Ventrikel, verglichen mit den

jeweiligen Widtypen (WT). Dieses Verhältnis zwischen LV/Tibia blieb auch zu späteren Zeitpunkten konstant. Bei den CnATg-Mäusen war bereits im Alter von 4 Wochen das FS signifikant verschlechtert (Abb. 4C)

Interessanterweise wiesen die CnATg-Mäuse eine unveränderte Kapillardichte im Alter von vier Wochen auf, verglichen mit den WT-Mäusen. Im Alter von 8 Wochen war jedoch die Kapillardichte um $-11\% \pm 2\%$ reduziert (Abb. 5C).

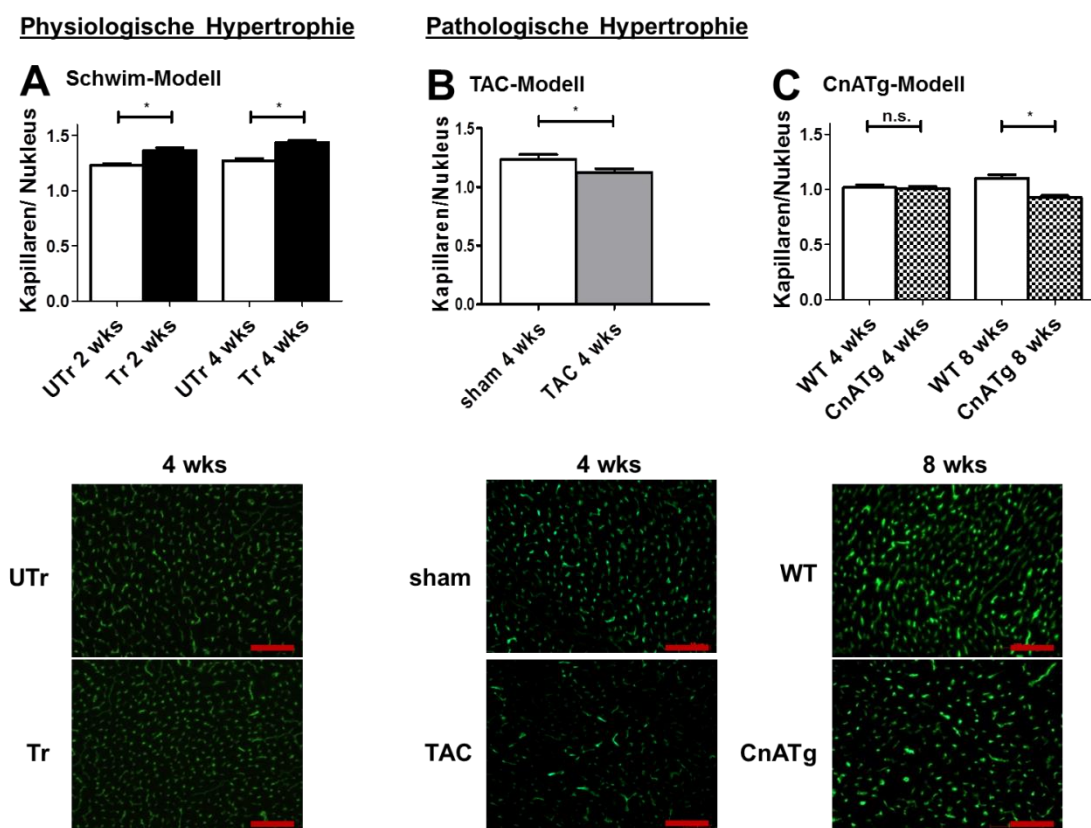


Abb. 5: Vergleich der Kapillardichte in physiologischen und pathologischen *in-vivo* Myokardhypertrophie Modellen.

Kryoschnitte des linken Ventrikels wurden mittels Fluoreszein-gekoppeltem Isolectin angefärbt. In sechs unterschiedlichen Bereichen wurde das Verhältnis der Kapillaren zu den Nuclei bestimmt. (A) Im Schwimm-Modell war nach 2 und 4 Wochen eine deutliche Verbesserung der Kapillardichte von $11\% \pm 2\%$ und $13\% \pm 1\%$ zu beobachten (je Gruppe $n=5$). (B) Nach 4 Wochen induzierter TAC war eine signifikante Reduzierung der Kapillardichte von $-9\% \pm 3\%$ ersichtlich (je Gruppe $n=5$), wohingegen im (C) CnATg-Mausmodell eine transiente Aufrechterhaltung der Kapillarisation vorlag und erst im Alter von 8 Wochen eine verminderte Kapillardichte von $-11\% \pm 2\%$ nachgewiesen werden konnte (je Gruppe $n=5$).

* $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant

4.1.2 Charakterisierung der Hypertrophie-Modelle auf molekularer Ebene

4.1.2.1 Physiologische Hypertrophie- Schwimmmodell

Ein weiterer Unterschied zwischen der pathologischen und physiologischen Hypertrophie besteht in der Regulierung des fetalen Genprogramms, deshalb wurde über qPCR die Expression der Gene ANP, BNP und β -MHC untersucht. Durch das Schwimmtraining induzierte Hypertrophie aktivierte keine signifikante Reexpression der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC (Abb. 6A).

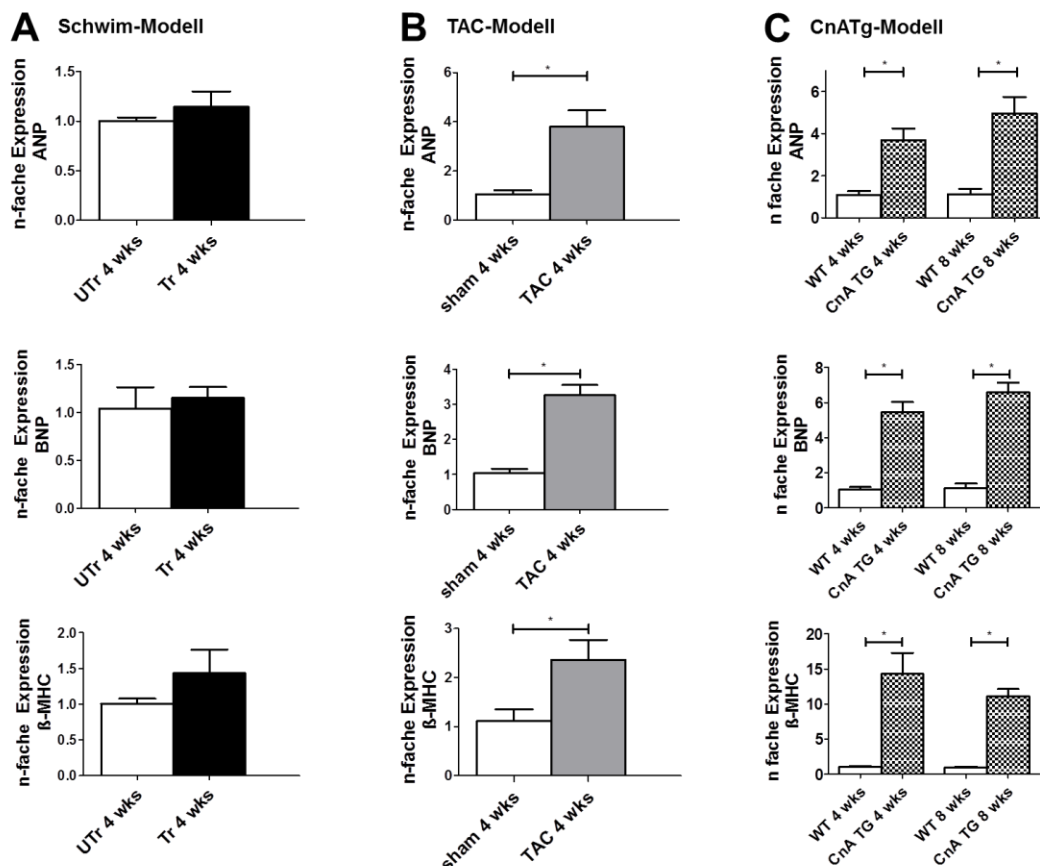


Abb. 6: Vergleich der Expression des fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC im Schwimm-, TAC- und CnATg-Modell.

(A) Nach vier Wochen kontinuierlichem Schwimmtraining konnte durch qPCR Analysen keine Regulierung der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC nachgewiesen werden (UTr n=5; Tr n=6), (B) im Gegensatz zum TAC-Modell, das vier Wochen postoperativ eine signifikante Hochregulierung dieser pathologischen Hypertrophie-Marker aufwies (je Gruppe n=5). (C) Auch eine CalcineurinA Überexpression induzierte die Reexpression des fetalen Genprogramms sowohl in 4 und 8 Wochen alten transgenen Tieren, verglichen zu den Wildtypmäusen (WT 4 wks n=6, CnATg 4 wks n=4, WT 8 wks n=4, CnATg 8 wks n=6).

* p<0,05

In der physiologischen Hypertrophie wird das Wachstum der Kardiomyozyten hauptsächlich durch die Aktivierung der AKT/PKB-Signalkaskade durch Thyrosine-Kinase Rezeptoren aktiviert, die zu einer vermehrten Phosphorylierung der Akt-Kinase führt (1.2.2). Im verwendeten Schwimmmodell war eine erhöhte Phosphorylierung von Akt am Serin473 nach zwei Wochen Trainingsdauer signifikant zu beobachten, jedoch nahm diese Phosphorylierung bis zum Endzeitpunkt des Trainings von vier Wochen wieder ab. Die Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A, das u.a. über die Aktivität der AKT reguliert werden kann, wies auch eine signifikant vermehrte Expression nach 2 Wochen auf, die jedoch nach 4 Wochen auf das Expressionsniveau der untrainierten Tiere abschwächte (Abb. 7).

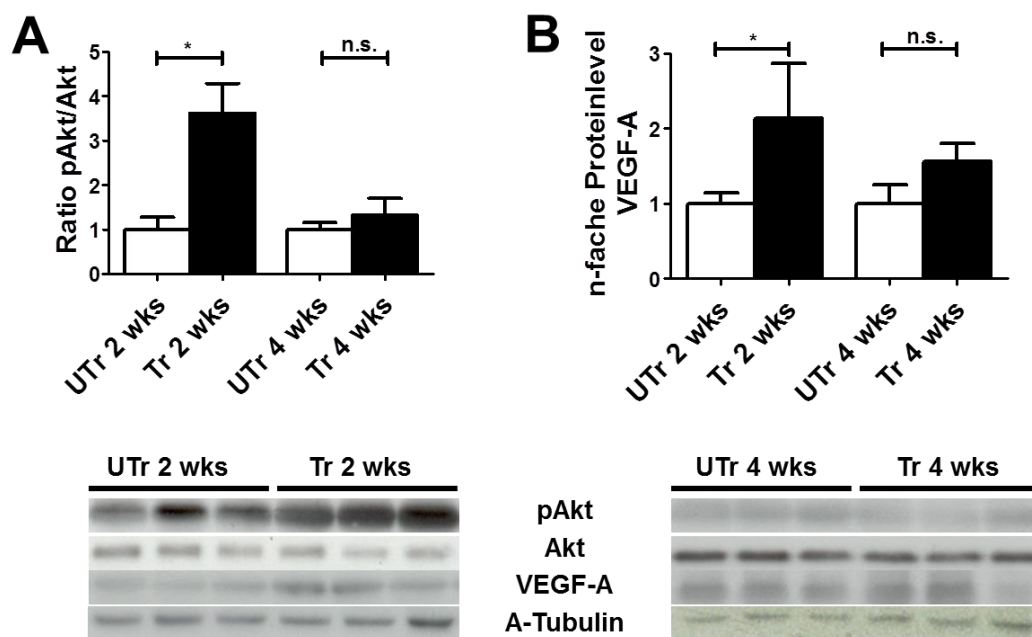


Abb. 7: Ausdauertraining induzierte eine vermehrte Aktivierung der Akt-Kinase und des angiogenen Wachstumsfaktor VEGF-A.

(A) Im Vergleich zu den nicht trainierten Mäusen konnte nach zwei Wochen Ausdauertraining eine signifikant verstärkte Phosphorylierung der Akt-Kinase am Serin473 nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung war jedoch nach vier Wochen in den trainierten Mäusen wieder abgeschwächt und unterschied sich nicht mehr von den untrainierten Mäusen (UTr n=4; Tr n=5). (B) Vergleichbares war auch in der Expression vom proangiogenen Faktor VEGF-A nachzuweisen, dessen Expression durch die Aktivierung Akt induziert wird. Nach zwei Wochen Training wurde VEGF-A vermehrt exprimiert, verglichen zu den nicht trainierten Mäusen. Zum Endzeitpunkt des Schwimmtrainings nach vier Wochen waren die Proteinlevel von VEGF-A in den trainierten Mäusen gleich der Proteinlevel, wie sie in den untrainierten Mäusen vorlagen (UTr n=4; Tr n=5).

* $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant

4.1.2.2 Pathologische Myokardhypertrophie-TAC-Modell und CnATg

Konträr zum Modell zur physiologischen Myokardhypertrophie, wurde in Mäusen mit einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) die Reexpression der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC signifikant induziert (Abb. 6B). Ebenfalls wurden in CnATg Tieren, verglichen mit den Wildtypnachkommen, die fetalen Gene signifikant vermehrt exprimiert (Abb. 6C).

4.2 Effekte antiangiogener Therapie in der physiologischen Myokardhypertrophie *in vivo*

Die Ergebnisse unter Kapitel 4.1 weisen darauf hin, dass durch kontinuierliches Schwimmtraining in Mäusen eine physiologische Hypertrophie induziert werden konnte. Shiojima et al. konnte zeigen, dass durch eine Inhibierung der Angiogenese in Akt transgenen Mäusen die physiologischen in eine pathologische Hypertrophie modifiziert werden kann [54]. Aufgrund dieser Daten, stellte sich nun die Frage, ob dies auch im verwendeten Modell der physiologischen Myokardhypertrophie, induziert durch Schwimm-Training, reproduziert werden kann, das der realen Entstehung der physiologischen Hypertrophie am nächsten kommt. Die Angiogenese wird hauptsächlich durch die Aktivierung des VEGFR-2 induziert. Folglich sollte durch die Behandlung mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416, als auch mit dem neutralisierenden Antikörper mAB VEGFR-2, Klon DC101 (im folgenden DC101) parallel zum Training die Angiogenese inhibiert werden. In der einen Kohorte wurde SU5416 zwei Mal wöchentlich mit einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht i.p. verabreicht und in der anderen Kohorte wurden die Mäuse mit 400 μ g DC101 alle zwei Tage behandelt. Die Bestimmung der Kapillardichte nach zwei und vier Wochen Schwimmtraining zeigte, dass durch die Behandlung mit den VEGFR-2-Inhibitoren die Kapillardichte unverändert blieb, verglichen zu den trainierten Mäusen, die eine verbesserte Kapillardichte aufwiesen (Abb. 8).

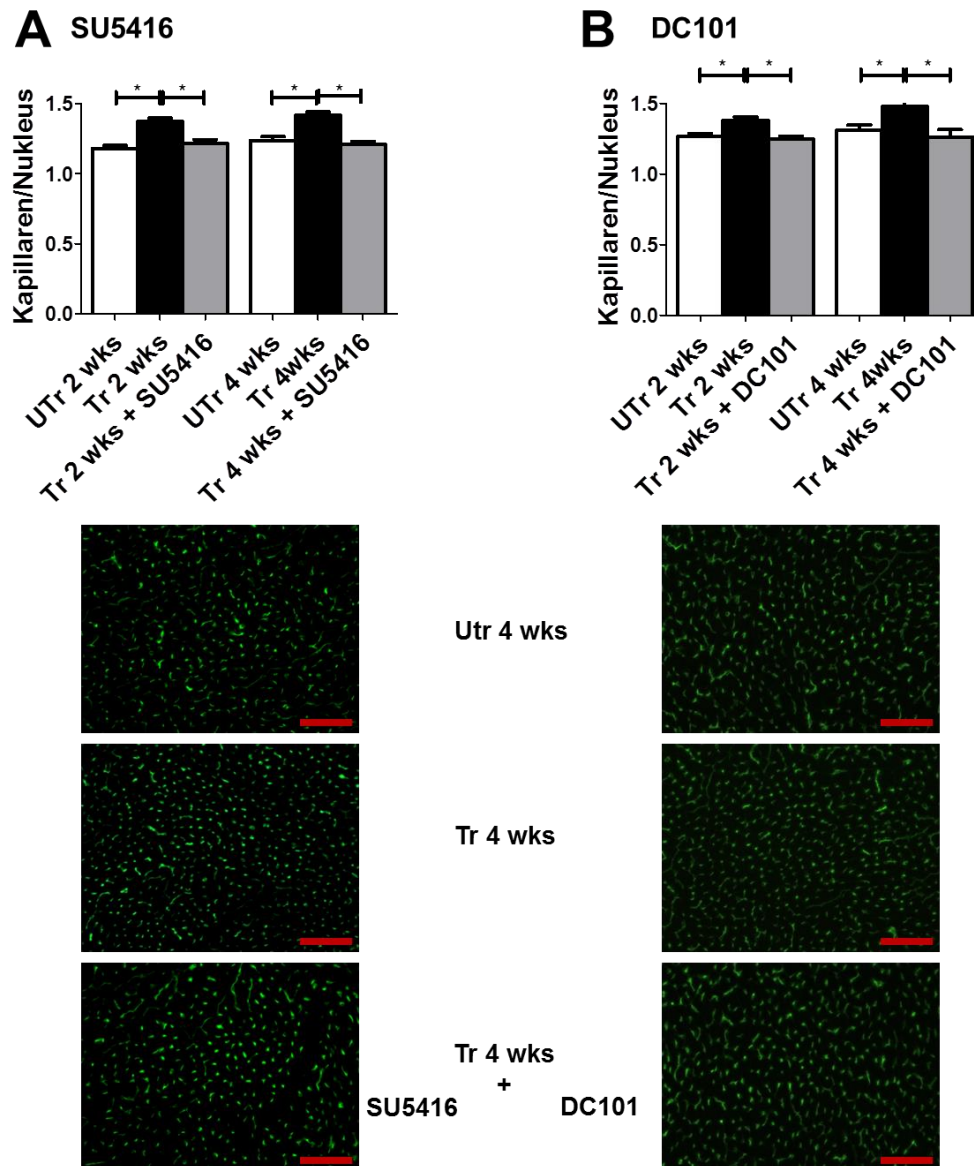


Abb. 8: Behandlung mit VEGFR-2 Inhibitoren SU5416 und mAB VEGFR-2 Klon DC101 unterdrückte die Angiogenese in der physiologischen Myokardhypertrophie.

Die Angiogenese sollte in den trainierten Mäusen während des Schwimmtrainings inhibiert werden. Hierfür wurde der VEGFR-2, dessen Aktivierung hauptsächlich die Angiogenese induziert, über den gesamten Zeitraum der Trainingsphase mittels SU5416, einem Thyrosin-Kinase Inhibitor oder einem neutralisierenden Antikörper gegen den VEGFR-2, mAB VEGFR-2, Klon DC101 (DC101) inhibiert.

Sowohl die Behandlung mit (A) SU5416 (je Gruppe n=5) und (B) mAB VEGFR2 DC101 (je Gruppe n=5) wiesen nach zwei und vier Wochen keine erhöhte Kapillardichte im Vergleich zu den nichttrainierten Mäusen auf, bzw. eine geringere Kapillardichte verglichen zu den trainierten Mäusen.

* p<0,05

Interessanterweise, wurde durch die antiangiogene Behandlung das Wachstum des linken Ventrikels gehemmt und es bildete sich eine nur geringe bis keine Vergrößerung des linken Ventrikels in den trainierten Mäusen aus. Bei diesen Mäusen konnte auch keine Verschlechterung der kardialen Funktion nachgewiesen werden, verglichen mit den trainierten Mäusen ohne Angiogenesehemmer (Abb. 9).

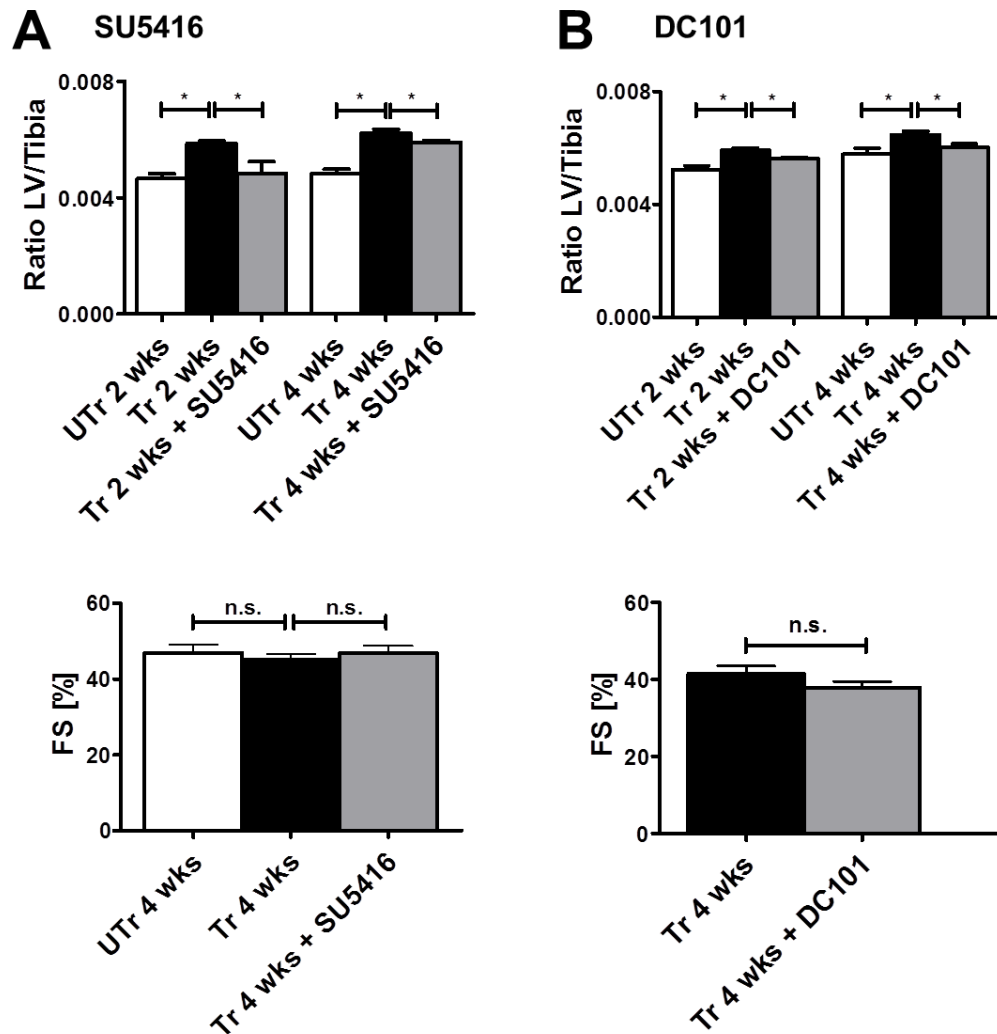


Abb. 9: Die Inhibierung der Angiogenese im Schwimm-Modell verhinderte die Ausbildung der Myokardhypertrophie ohne jedoch die kardiale Funktion zu beeinträchtigen.

Die Angiogenese wurde während des Schwimm-Trainings mit unterschiedlichen VEGFR-2 Inhibitoren unterdrückt, (A) SU5416 (je Gruppe n=5) und (B) mAB VEGFR2 DC101 (je Gruppe n=5). Verglichen mit den trainierten Mäusen, führte sowohl die Behandlung mit DC101 als auch mit SU5416 zu einer verminderten Myokardhypertrophie in den trainierten Mäusen. Des Weiteren konnte bei den antiangiogenen behandelten Tieren mit SU5416 und DC101 keine Verschlechterung der kardialen Funktion gemessen werden.

* $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant

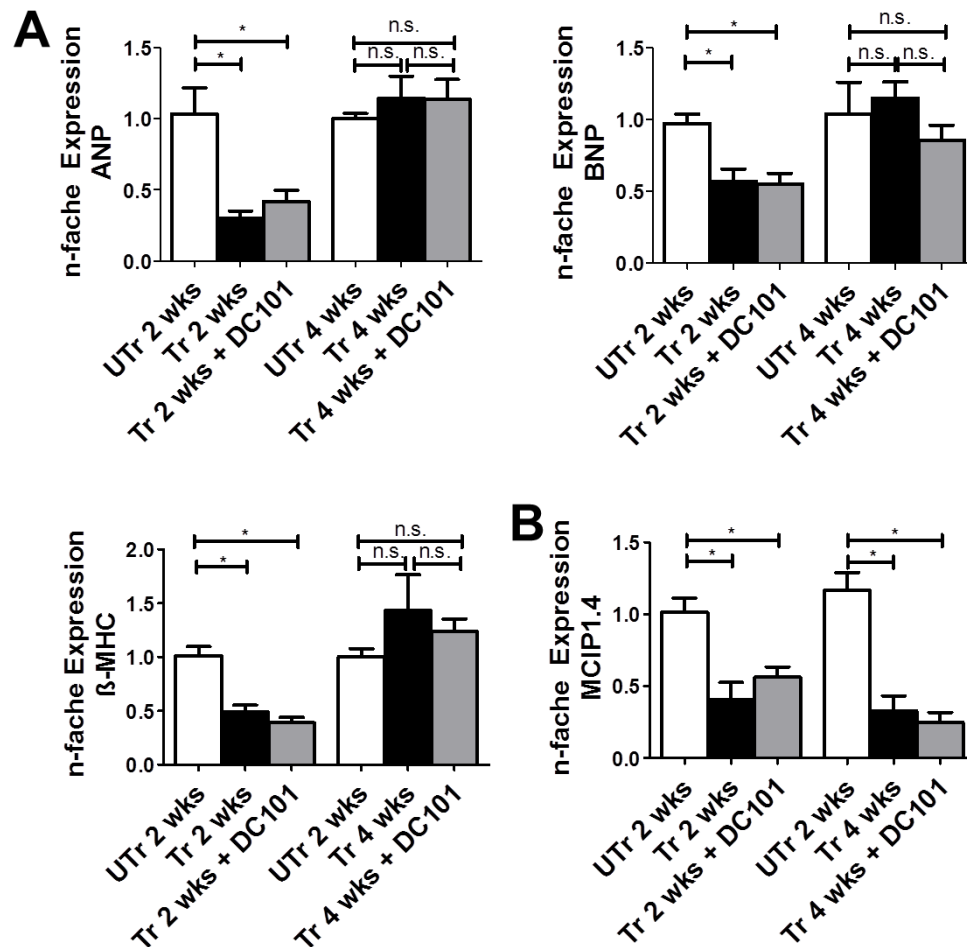


Abb. 10: Inhibierung der Angiogenese übte keinen negativen Einfluss auf die Expression der fetalen Gene und der CalcineurinA-Aktivität aus.

Trainierte Mäuse wurden während des Trainings mit dem VEGFR-2 Inhibitor mAB VEGFR-2 Klon DC101 behandelt und anschließend die Expression der (A) fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC per qPCR ermittelt. Nach 2 Wochen Training wiesen sowohl die trainierten als auch jene mit antiangiogener Behandlung eine signifikant verminderte Expression dieser Gene auf, verglichen mit den untrainierten Mäusen. Dieser Unterschied in der Expression war jedoch nach 4 Wochen Training nicht mehr zu beobachten und die Expressionslevel von ANP, BNP und β -MHC zeigten keinen Unterschied in den drei verschiedenen Gruppen auf.

(B) Über die Expression der MCIP1.4-mRNA sollte die Calcineurin/NFAT-Aktivität analysiert werden. MCIP1.4 besitzt in seiner Promotorregion Bindestellen des NFAT-Transkriptionsfaktors. Sowohl nach 2 und 4 Wochen Schwimmtraining konnte eine verminderte MCIP1.4-mRNA Expression in den trainierten Mäusen mit und den trainierten Mäusen mit Angiogenesehemmer gemessen werden (UTr n= 5; Tr n=6; UTr n=6).

* $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant

Die Expression der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC waren nach 2 Wochen in den trainierten Mäusen ohne und mit VEGFR-2-Inhibitor eindeutig runterreguliert, wiesen aber nach vier Wochen wieder das Expressionsniveau der Kontrollmäuse auf. Zu beiden Zeitpunkten waren in den beiden Kohorten

jedoch keine Unterschiede zwischen den trainierten Mäusen ohne und mit VEGFR-2 Inhibitoren messbar. Des Weiteren wurde noch die Calcineurin-Aktivität über die Expression der mRNA des Proteins MCIP1.4 gemessen, die zu beiden Zeitpunkten in den trainierten Mäusen signifikant niedriger war, als in den Kontrollmäusen. Auch die Inhibierung der Angiogenese wies keinen Einfluss auf die MCIP1.4 Expression auf (Abb. 10).

Eine vermehrte Phosphorylierung der Akt-Kinase konnte auch in diesen Kohorten in den trainierten Mäusen festgestellt werden. Interessanterweise zeigen die antiangiogen behandelten Mäuse, sowohl die SU5416 als auch die DC101 Kohorte, eine noch verstärkte Phosphorylierung von Akt auf (Abb. 11).

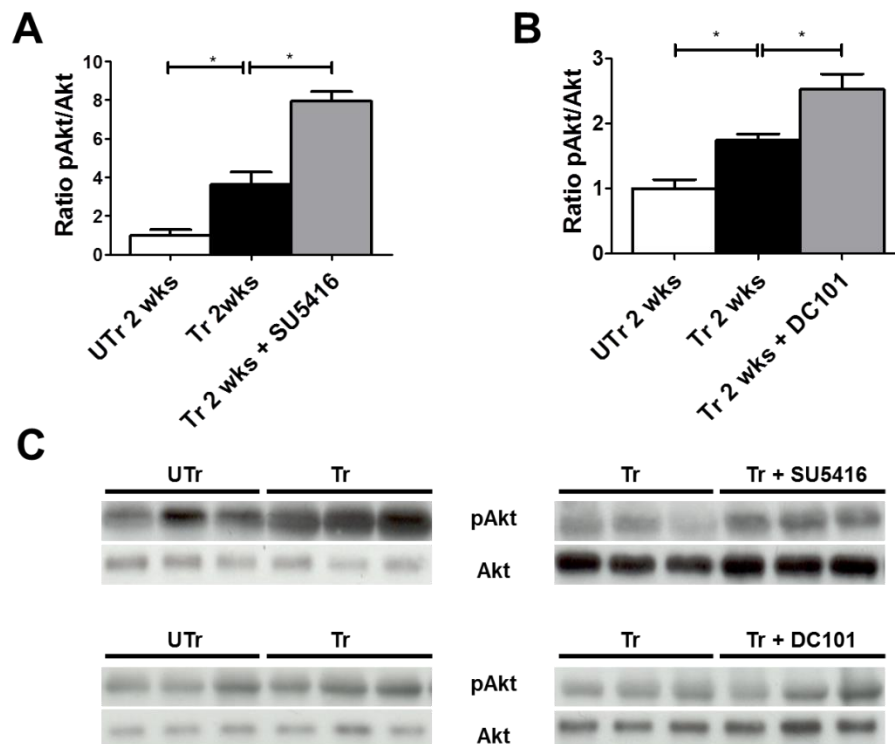


Abb. 11: Inhibierung der Angiogenese induzierte eine vermehrte Phosphorylierung von Akt in der physiologischen Myokardhypertrophie.

Die Inhibierung des VEGFR-2 mit **(A)** SU5416 und **(B)** mAB VEGFR-2 Klon DC101 während des Ausdauertrainings induzierte eine vermehrte Phosphorylierung der Akt-Kinase am Serin473, verglichen mit den nicht behandelten trainierten Mäusen. **(C)** Representative Western Blots (UTr n=4; Tr n=5; Tr+SU5416 bzw. DC101 n=5)

* p<0,05

4.3 Effekte antiangiogener Therapie in der pathologischen Myokardhypertrophie *in vivo*

Die Angiogenese sollte auch in den pathologischen Myokardhypertrophie Modellen inhibiert werden, um den Einfluss der Angiogenese auf die Myokardhypertrophie und die linksventrikuläre Funktion zu untersuchen. In den Mäusen mit einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) als auch in CnATg wurde der VEGFR-2 mit dem Inhibitor SU5416 ebenso für einen Zeitraum vier Wochen blockiert (siehe 4.2). Im TAC-Modell begann die erste Injektion 2-3 Tage post-op und bei den CnATg-Mäusen im Alter von 4 Wochen. In beiden Modellen konnte dadurch die Kapillardichte im LV nochmals signifikant verringert werden im Vergleich zu den TAC bzw. CnATg Mäusen und den Schein-operierten bzw. WT-Mäusen (Abb. 12).

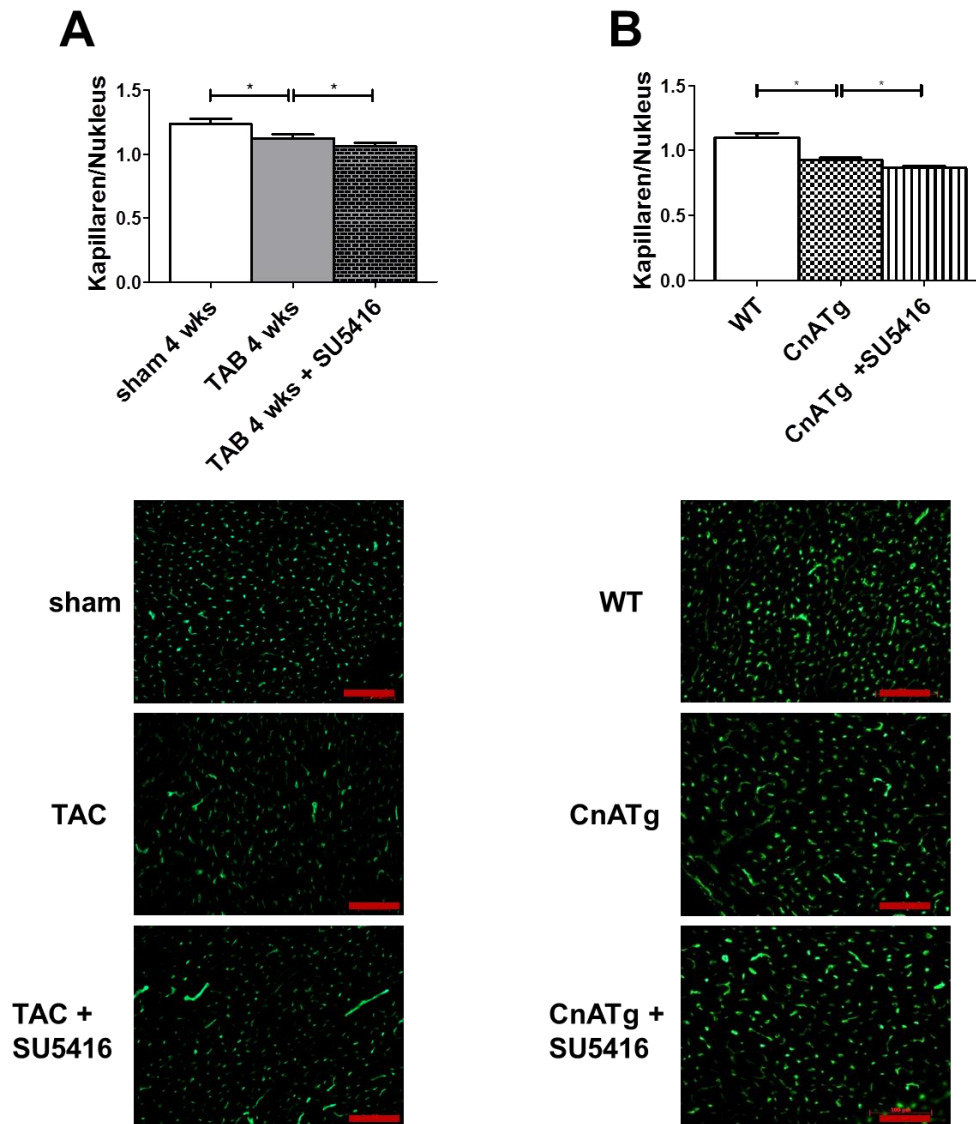


Abb. 12: Inhibierung des VEGFR-2 führte zu einer verminderten Kapillardichte in der pathologischen Myokardhypertrophie.

Die Inhibierung des VEGFR-2 erfolgte über vier Wochen durch SU5416 im (A) TAC-Modell und (B) im CnATg-Modell. Im Vergleich zu den Schein-operierten (sham) bzw. Wildtypmäusen (WT), konnte in den TAC-operierten Mäusen als auch in den CnATg Tieren eine verminderte Kapillardichte gemessen werden. Durch antiangiogene Therapie mit SU5416 konnte in beiden Modellen der pathologischen Myokardhypertrophie die Kapillardichte nochmals verringert werden. (je Gruppe n=5)

* p<0,05

In beiden Modellen wurde eine signifikant verschlechterte fraktionelle Verkürzung gemessen, jedoch wurde das Verhältnis der LV-Masse zur Tibia nicht verändert. (Abb. 13)

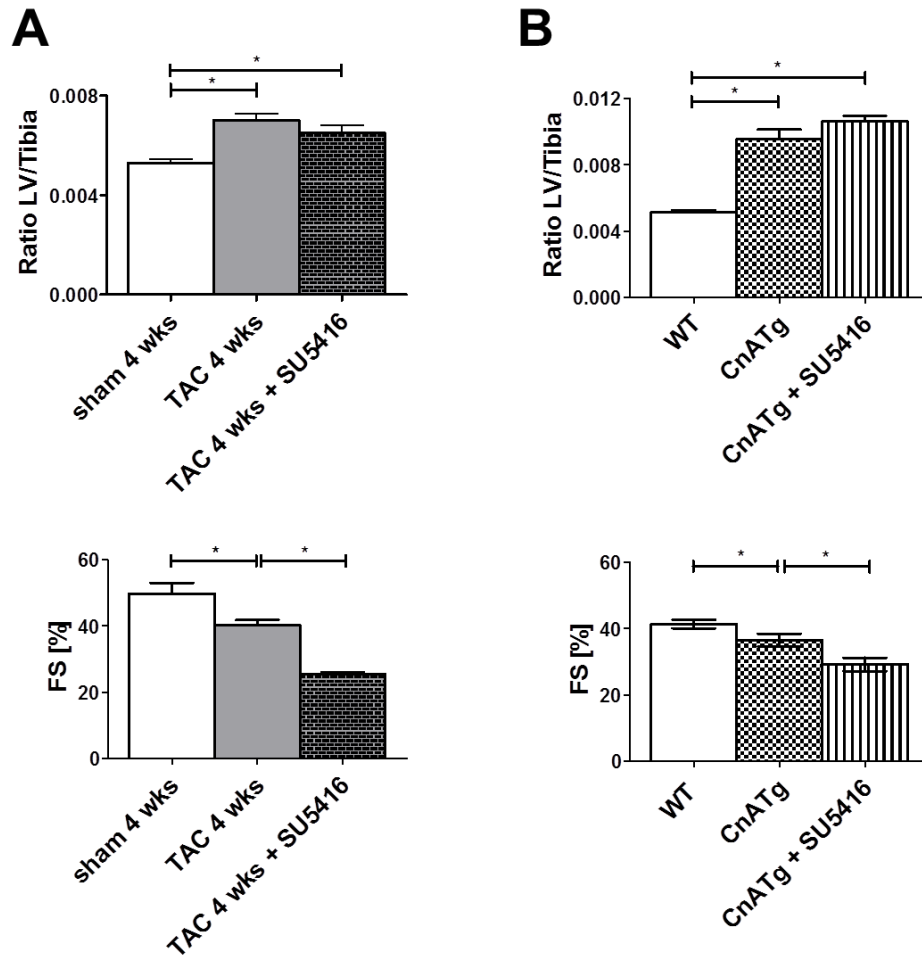


Abb. 13: Inhibierung der Angiogenese in der pathologischen Myokardhypertrophie führte zur Reduzierung der kardialen Funktion.

Die Behandlung mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 von (A) TAC-Mäuse und (B) CnATg hatte keinen Einfluss auf den Grad der Myokardhypertrophie, jedoch führte diese zu einer weiteren Verschlechterung der kardialen Funktion. (sham n= 5, TAC n=8, TAC+SU5416 n=7; WT n=5, CnATg n=9, CnATg+SU5416 n=10)

*p<0,05

4.4 CalcineurinA transgene Mäuse weisen erhöhte Stabilisierung und Transkriptionsaktivität von HIF-1 α auf

Bei der Ausbildung der pathologischen Myokardhypertrophie kommt zu einem Missverhältnis der Kapillardichte im linken Ventrikel, so wie es auch in unseren TAC- und CnATg-Modellen (Kapitel 3.1) aufgezeigt wurde. Bisher ist noch weitgehend unklar, welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen. Der Tumorsuppressor p53 zeigt einen negativen Einfluss auf die Stabilität des proangiogenen Transkriptionsfaktors HIF-1 α auf und stellt somit einen

möglichen Mechanismus dar, der zu einem Missverhältnis zwischen Kapillaren und Kardiomyozyten führt [47]. CalcineurinA, ein zentraler Mediator der pathologischen Myokardhypertrophie, scheint auch in Tumorzellen einen indirekten Einfluss auf die Regulierung von HIF-1 α zu besitzen. Aus diesem Grund war es auch Ziel dieser Arbeit, diesen Zusammenhang im CnATg-Mausmodell näher zu untersuchen.

Unter 4.2 konnte gezeigt werden, dass sowohl die TAC-Tiere als auch die CnATg-Tiere eine Reduzierung der Kapillardichte aufwiesen. Die Kapillardichte wurde in beiden Modellen genauer betrachtet und diese zu einem Zeitpunkt, an dem der Grad der Hypertrophie als auch die zeitliche Ausbildung die Hypertrophie ähnlich ist, miteinander verglichen. Hierfür wurde die Kapillardichte der vier Wochen alten CnATg- und der TAC-Mäuse vier Wochen postoperativ ins Verhältnis mit der Kapillardichte der jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt und gegen den Grad der Hypertrophie graphisch dargestellt (Abb. 14). Aus dieser ist eindeutig ersichtlich, dass die CnATg-Mäuse trotz einer stärker ausgeprägten Myokardhypertrophie eine wesentlich bessere Kapillardichte im Gegensatz zu den TAC-Mäusen, aufwiesen.

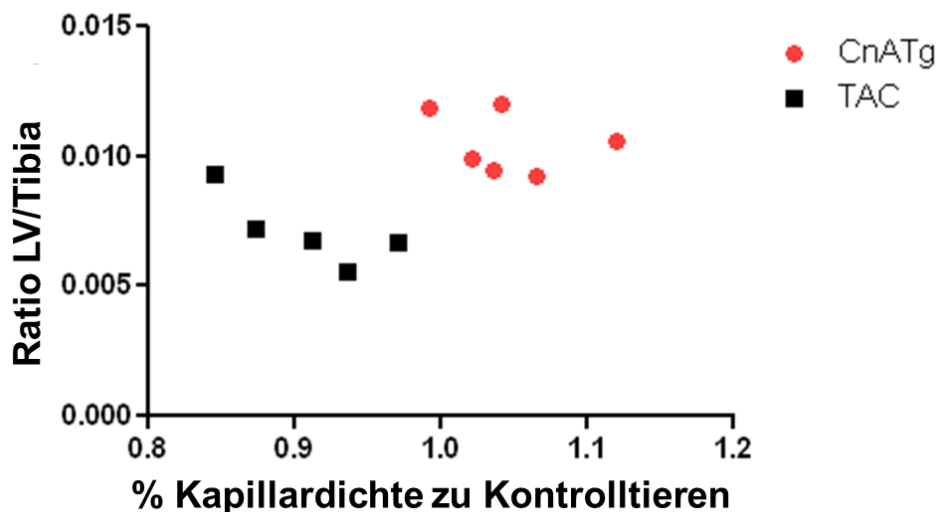


Abb. 14: CnATg Tiere weisen verbesserte Kapillardichte im linken Ventrikel auf.

Die Kapillardichte vier Wochen alter CnATg Tiere und der TAC Tiere (vier Wochen post-op) wurden gegen ihren Grad der Hypertrophie aufgetragen, um die Kapillardichte genauer vergleichen zu können. CnATg Tiere wiesen, trotz einer massiven ausgebildeten Myokardhypertrophie, eine signifikant erhöhte Kapillardichte auf, verglichen zu den TAC-Tieren. (TAC n=5, CnATg n=6)

Des Weiteren zeigten Western Blot-Analysen, dass der proangiogene Transkriptionsfaktor HIF-1 α in den vier und acht Wochen alten CnATg Tieren auf Proteinebene konstant stabilisiert war und die Expression von p53 jedoch unverändert blieb. Im Gegensatz hierzu zeigten die TAC-Tiere nach zwei Wochen noch eine erhöhte Stabilisierung von HIF-1 α , die nach vier Wochen wiederum abnahm und das Protein p53 vermehrt vorlag (Abb. 15).

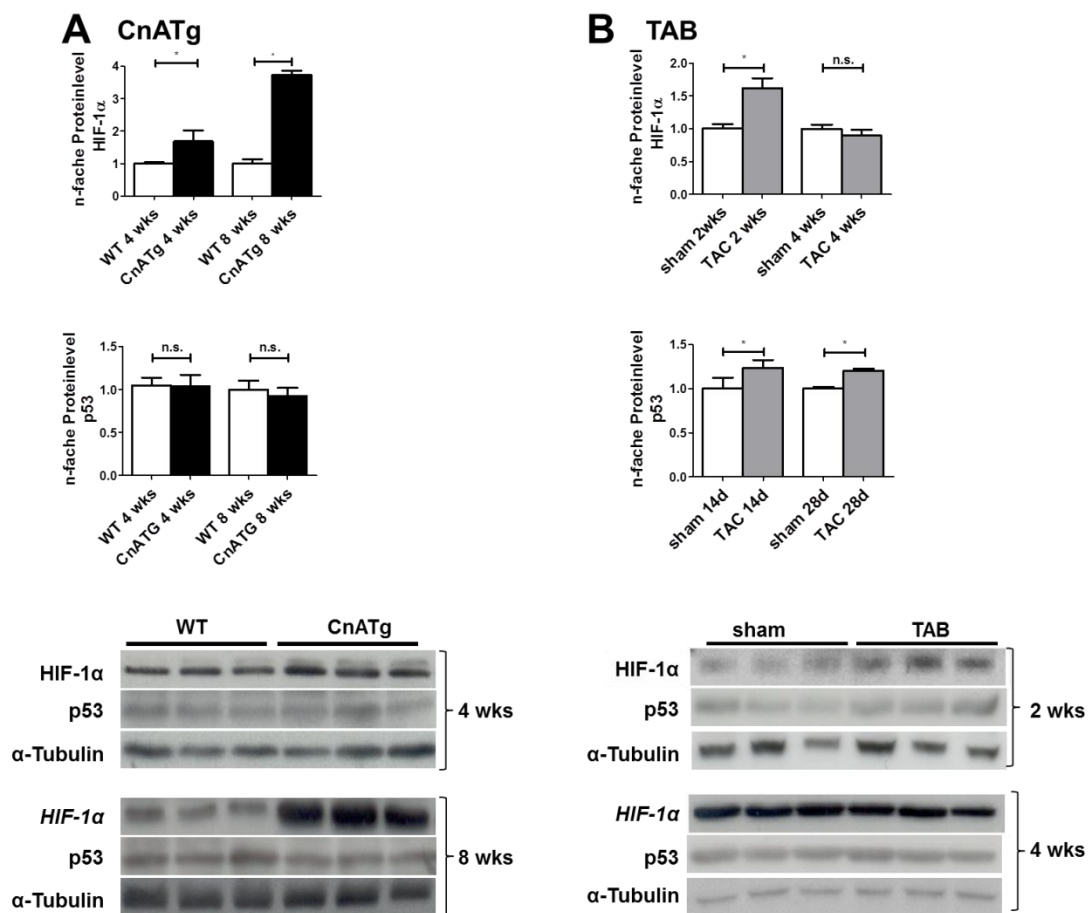


Abb. 15: CnATg Mäuse wiesen eine konstante HIF-1 α Stabilisierung auf.

(A) CnATg Mäuse wiesen eine Stabilisierung des proangiogenen Transkriptionsfaktors HIF-1 α auf und die p53 Proteinlevel waren im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Alter von 4 und 8 Wochen unverändert (WT n=4, CnATg n=5). (B) In den Mäusen mit TAC fand zu einem frühen Zeitpunkt der Hypertrophie eine Stabilisierung von HIF-1 α statt. Der Tumorsuppressors p53 lag zu beiden Zeitpunkten vermehrt exprimiert vor. (sham n=4, TAC n=5); * p<0,05

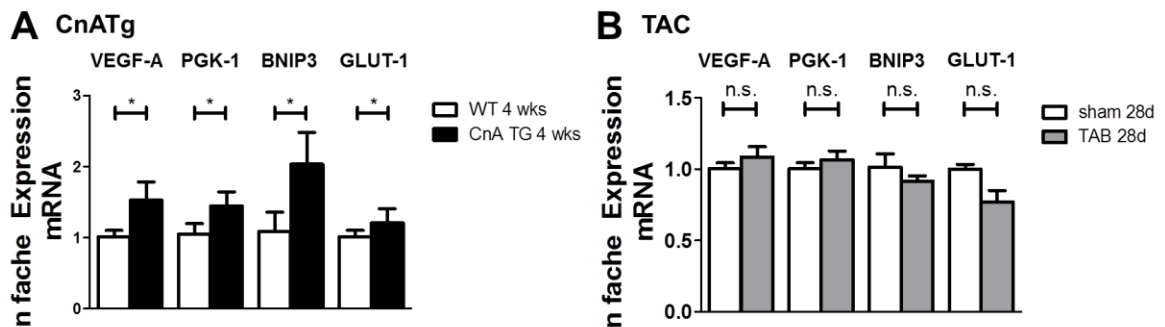


Abb. 16: CnATg Mäuse wiesen vermehrte Expression HIF-1 α abhängiger Gene auf.

Die Transkriptionsaktivität des HIF-1 α wurde über die Expression der HIF-1 α abhängigen Gene VEGF-A, PGK-1, BNIP3 und GLUT-1 per qPCR analysiert. **(A)** CnATg Mäuse wiesen eine erhöhte Expression dieser Gene auf, verglichen zu den Wildtypmäusen. **(B)** In den TAC-operierten war jedoch keine Regulierung der HIF-1 α -abhängigen Gene nachweisbar. (je Gruppe n=5)

* p<0,05, n.s.- nicht signifikant

Weiterhin konnte in CnATg-Mäusen auch eine vermehrte Expression der HIF-1 α abhängigen Gene VEGF-A, PGK-1, BNIP3 und GLUT-1 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Mäusen mit transverser Aortenkonstriktion (TAC), die keine Regulierung dieser Gene aufwiesen, im Vergleich zu den Schein-operierten Mäusen (Abb. 16).

4.5 CalcineurinA transgene Mäuse weisen verstärkte Expression angiogener Faktoren auf

Auch auf Proteinebene war in der Expression von VEGF-A in vier Wochen alten CnATg-Mäusen ein eindeutiger Trend einer erhöhten Proteinkonzentration nachzuweisen, die im Alter von acht Wochen signifikant war. Im Gegensatz zu VEGF-A war die Expression von VEGF-B schon im frühen Alter verstärkt und schwächte dann im weiteren Verlauf wieder ab. Ihre Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1 (VEGFR-2) waren ebenfalls im Alter von acht Wochen in den CnATg-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 17).

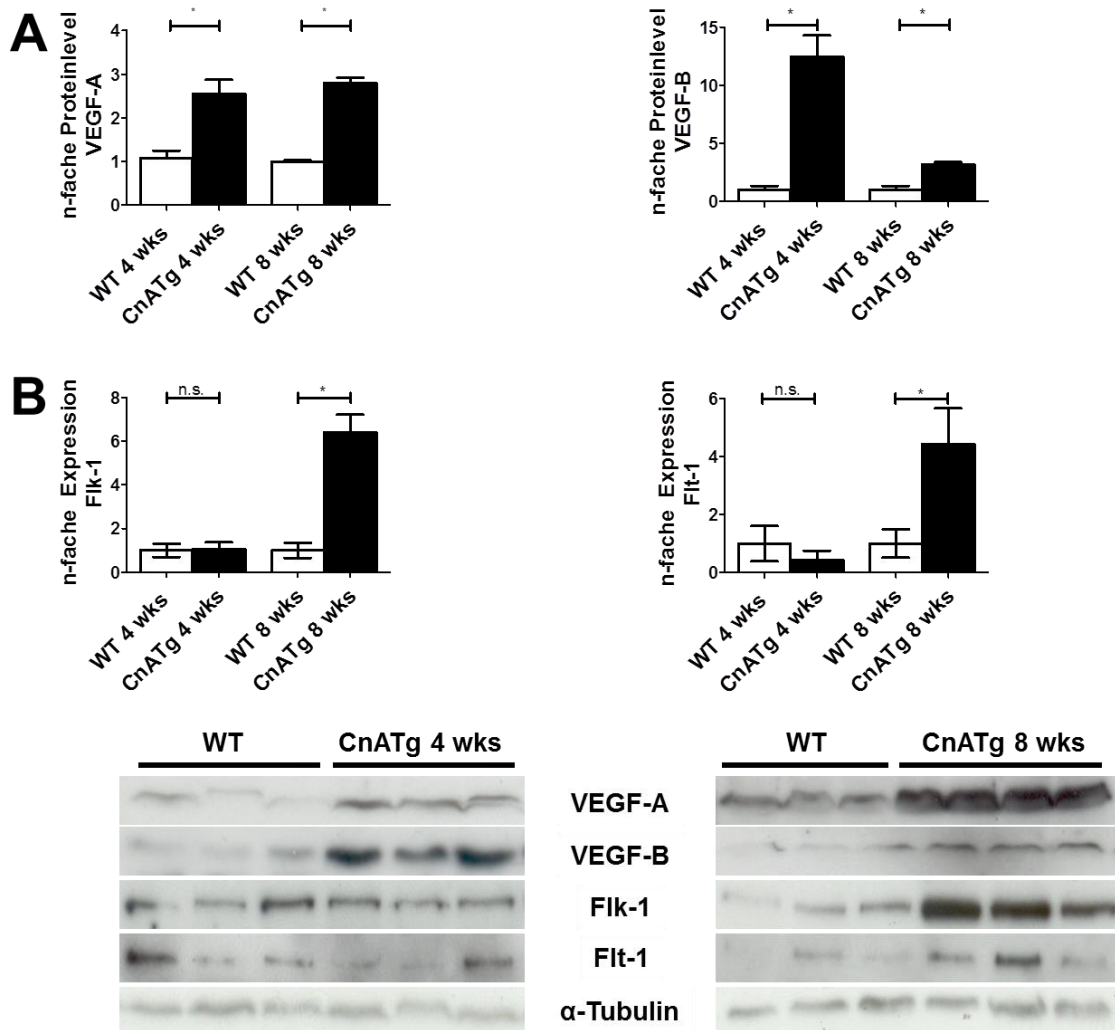


Abb. 17: CnATg Mäuse wiesen eine erhöhte Expression proangiogener Faktoren auf.

Mittels Western Blot Analysen war ersichtlich, dass proangiogene Faktoren, wie (A) VEGF-A in CnATg Tieren sowohl im Alter von 4 Wochen als auch 8 Wochen signifikant vermehrt exprimiert wurden. VEGF-B war jedoch im Alter von 4 Wochen in den transgenen Tieren hochreguliert, jedoch schwächte diese bis zum Alter von 8 Wochen wieder ab. (B) Die Expression des VEGF-R1 bzw. Flt-1 und des VEGFR2 bzw. Flk-1 war im Alter von 4 Wochen unverändert in den CnATg Mäusen auf im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Jedoch waren diese in den CnATg im Alter von 8 Wochen stark hochreguliert. (WT n=4 und CnATg n=5)

* $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant

4.6 Calcineurin A induziert die Stabilisierung HIF-1 α unabhängig von NFAT

Um den Mechanismus aufklären zu können, durch den HIF-1 α im Myokard stabilisiert wird, trotz massiver Myokardhypertrophie und eingeschränktem *fractional shortening*, wurden *in vitro* Versuche an isolierten neonatalen Kardiomyozyten (NRVCM) aus ein bis drei Tage alten Ratten durchgeführt.

Diese wurden mit einem Adenovirus, der eine aktive Form des CnA mit einem V5-Anhang (AdCnA) oder dem Kontrollvektor LacZ (AdLacZ) enthält, transfiziert und unter normalen Bedingungen für 24-30h kultiviert. Der Expressionsnachweis des AdCnA erfolgte über den Nachweis von V5 mittels Western Blot-Analysen, die Funktionalität des Adenovirus wurde über die vermehrte Expression von MCIP1.4 mittels qPCR überprüft, da NFAT in der Promotorregion von MCIP1.4 Bindestellen aufweist.

AdCnA infizierte NRVCN zeigten im Western Blot eine deutliche Expression des Proteins V5 auf, sowie eine signifikante erhöhte MCIP1.4 mRNA Expression, im Gegensatz zu den AdLacZ transfizierten Zellen. Auch in den NRVCN induzierte CnA-Expression bewirkte eine vermehrte Stabilisierung von HIF-1 α . Die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α wurde wieder über die Expression der Zielgene VEGF-A, PGK-1, BNIP3 und GLUT-1 ermittelt, deren mRNA in den AdCnA transfizierten Zellen signifikant vermehrt exprimiert wurde (Abb. 21). Als nächstes sollte untersucht werden, ob CnA ein Mediator für die Stabilisierung von HIF-1 α darstellte oder ob diese durch die CalcineurinA induzierte vermehrte NFAT-Aktivität abhängig war. Hierzu wurden die NRVCN mit einem Adenovirus, der NFAT-GFP (AdNFAT-GFP) oder GFP (AdGFP) enthält, transfiziert und ebenfalls für 24-30h unter normalen Bedingungen kultiviert. Die Aktivität von NFAT konnte über eine erhöhte Expression von MCIP1.4 nachgewiesen werden, jedoch waren die HIF-1 α Proteinlevel unverändert gegenüber der GFP-transfizierten Zellen (Abb. 18).

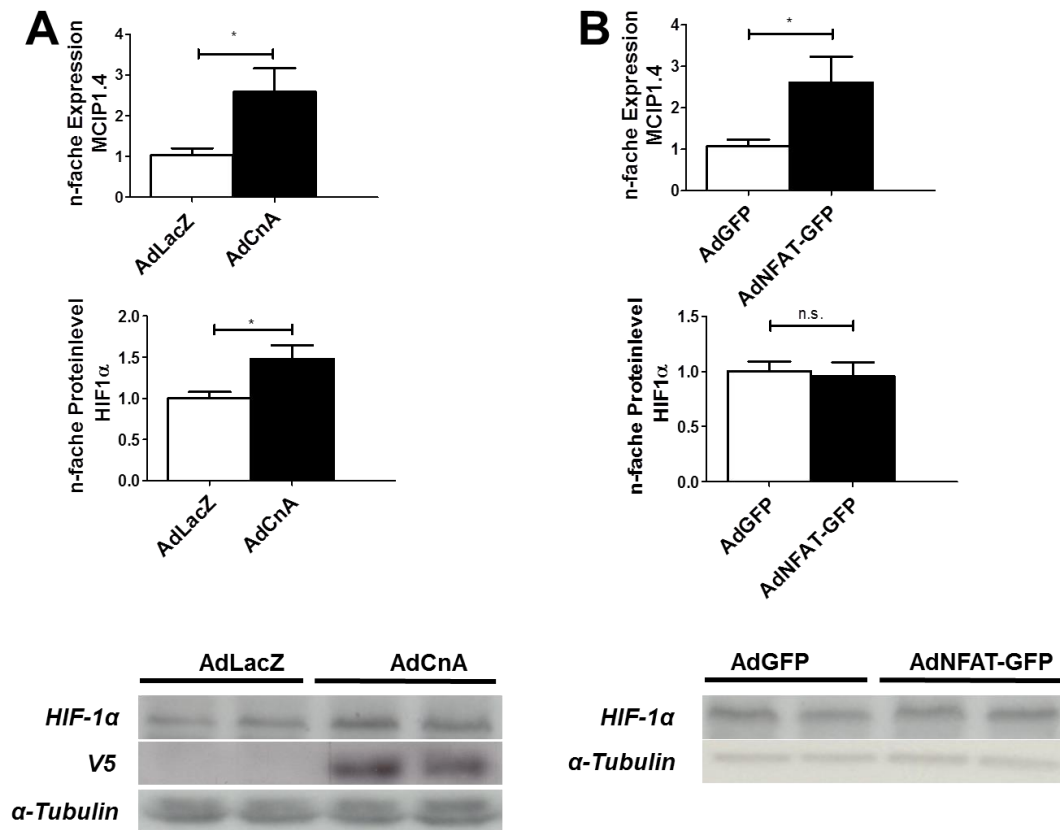


Abb. 18: CnA-Überexpression induzierte HIF-1 α Stabilisierung unabhängig von NFAT-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten.

Neonatale Kardiomyozyten (NRVCM), aus Ratten isoliert, wurden mit einem (A) Adenovirus AdCnA mit V5-Anhang oder einem AdLacZ transfiziert. AdCnA-Transfektion induzierte die MCIP1.4 mRNA Expression, einem Indikator der NFAT-Transkriptionsaktivität. Auf Proteinebene ist der V5-Anhang eindeutig nachzuweisen. Die Überexpression von CnA in den NRVCM führte ebenfalls zu einer erhöhten Stabilisierung von HIF-1 α (n=4). (B) Um zu untersuchen, ob die Stabilisierung von HIF-1 α von der NFAT-Transkriptionsaktivität abhängig war, wurden NRVCM mit einem AdNFAT-GFP bzw. AdGFP transfiziert. Die Transfektion mit AdNFAT-GFP induzierte ebenfalls auf mRNA-Ebene eine vermehrte Expression von MCIP1.4, jedoch war kein Unterschied in der HIF-1 α Stabilisierung zu verzeichnen, im Vergleich zu den NRVCM, die mit dem Kontrollvektor AdGFP transfiziert wurden (n=4).

* $p < 0.05$

4.7 Calcineurin A induziert die Stabilisierung von HIF-1 α über einen HSP90 abhängigen Mechanismus

HSP90 ist ein bekanntes Chaperon, das HIF-1 α unter normalen Sauerstoffbedingungen stabilisiert. AdCnA transfizierte Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression von HSP90 (Abb. 19).

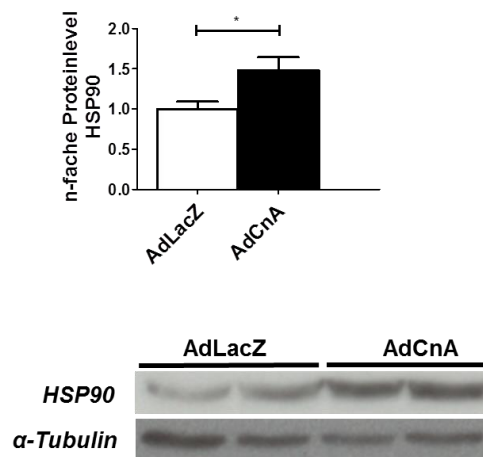


Abb. 19: Calcineuin A induziert die Expression von HSP90, einem Stabilisator von HIF-1 α .

AdCnA transfizierte NRVCN wiesen auf Proteinebene eine vermehrte Expression von HSP90 auf, einem HIF-1 α stabilisierenden Interaktionsprotein.

* $p < 0,05$

Folglich wurde die Expression von HSP90 inhibiert, um den Einfluss von HSP90 auf HIF-1 α zu untersuchen. NRVCN wurden 24h vor der Transfektion mit den Adenoviren zusätzlich mit einer siRNA gegen HSP90 (siHSP90) bzw. einer Kontroll-siRNA (scrsiRNA) transfiziert. So konnte in den Zellen eine 50%ige Inhibierung der HSP90-Expression erreicht werden.

Die verminderte Expression von HSP90 führte zu einer Aufhebung der Stabilisierung von HIF-1 α , im Vergleich zu AdCnA transfizierten Zellen, die mit scrsiRNA vorbehandelt wurden. Die Inhibierung der HSP90-Aktivität mittels des Geldanamycin-Analogen 17AAG in AdCnA transfizierten Zellen hemmte ebenfalls eine Stabilisierung von HIF-1 α (Abb. 20).

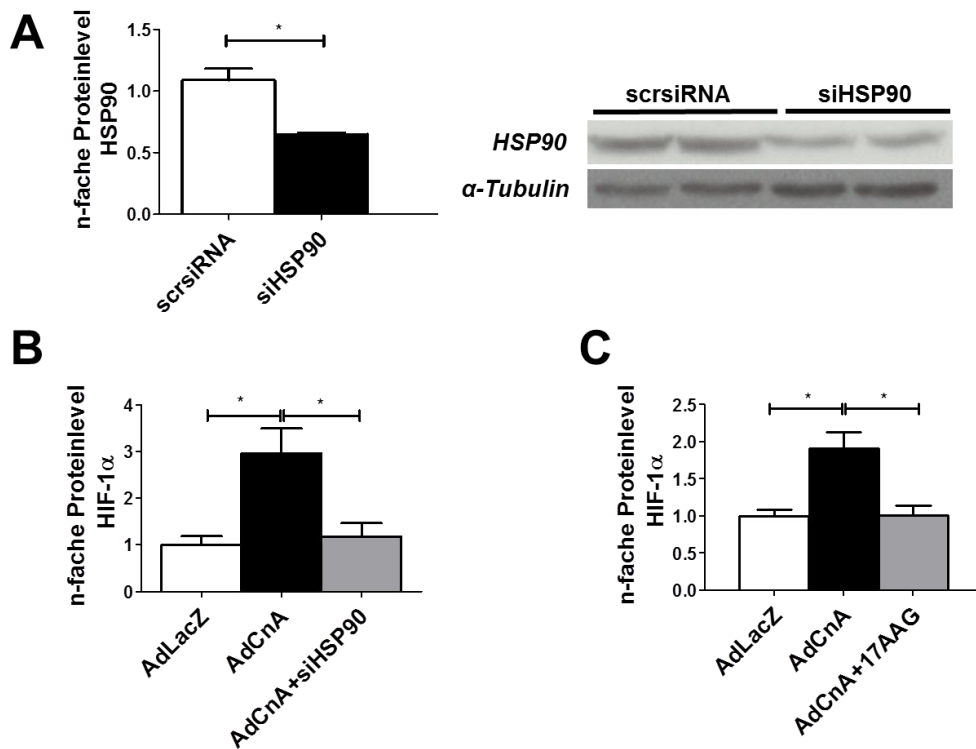


Abb. 20: Inhibition von HSP90 verhindert die Calcineurin A induzierte HIF-1 α Stabilisierung.

(A) Durch die Vorbehandlung von NRVCN mit siRNA gegen HSP90 (siHSP90) konnte eine Inhibition von der Expression von 50% induziert werden, im Vergleich zu den Zellen, die mit der Kontroll-siRNA (scrsiRNA) transfiziert wurden (n=4). (B) Die Inhibition der Expression von HSP90 in AdCnA transfizierten Zellen verhinderte die Stabilisierung von HIF-1 α (n=4). (C) Ein gleicher Effekt wurde auch in AdCnA transfizierten Zellen induziert, in denen die HSP90-Aktivität mittels 17AAG gehemmt wurde (n=4).

* p<0,05

Derselbe Effekt beider Inhibitoren konnte auch auf mRNA-Ebene in der Expression der HIF-1 α abhängigen Gene beobachtet werden. Die Transfektion mit AdCnA führte zu einer vermehrten mRNA-Expression der Gene VEGF-A, PGK-1, BNIP3 und GLUT-1, die durch die Inhibition der HSP90-Expression bzw. der Hemmung der HSP90-Aktivität komplett rückgängig gemacht wurde (Abb. 21).

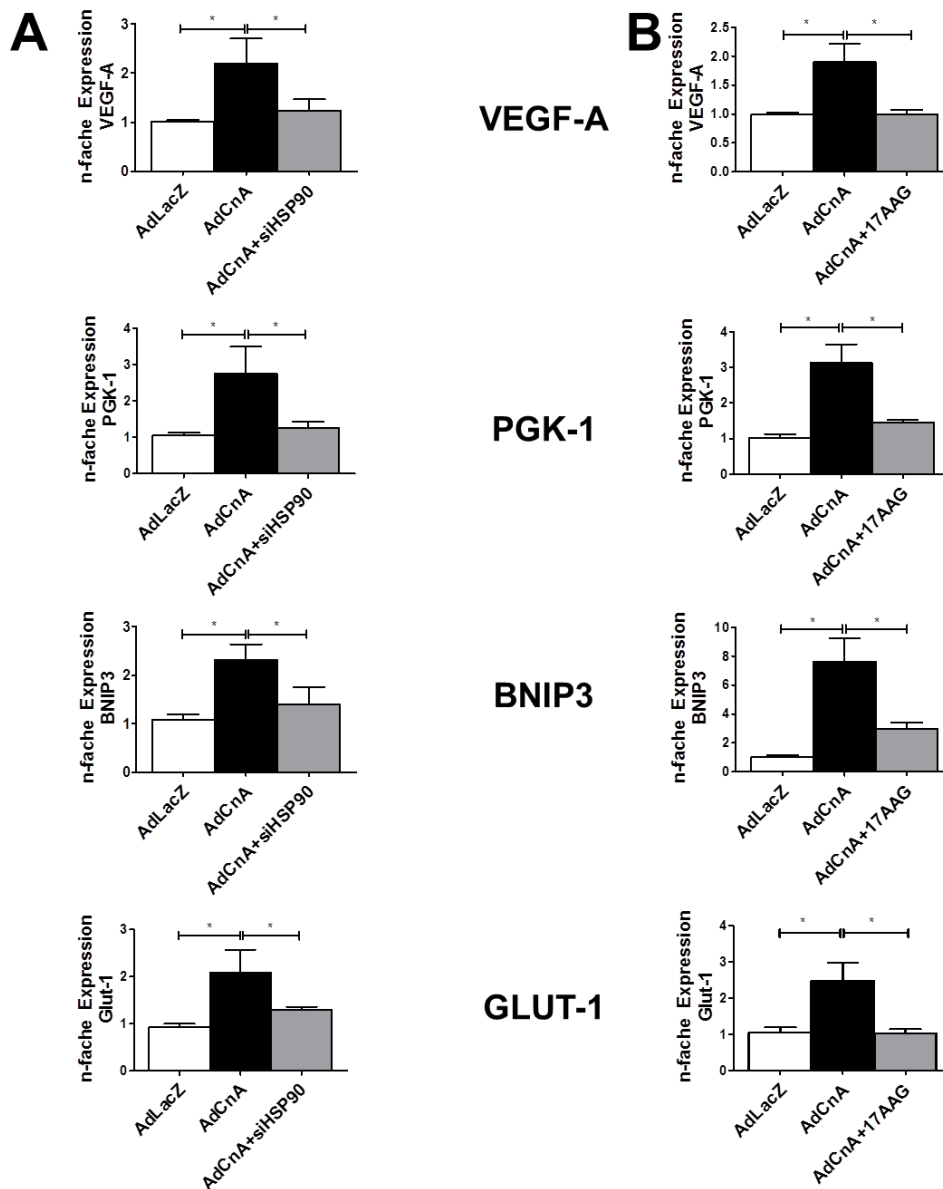


Abb. 22: Inhibierung von HSP90 führte zu Reversion der Expression HIF-1 α abhängiger Gene.

In AdCnA transfizierten Zellen wurde **(A)** die Expression von HSP90 mittels siRNA oder **(B)** die HSP90-Aktivität durch 17AAG inhibiert. Die dadurch resultierende Destabilisierung von HIF-1 α spiegelte sich auch in der Expression der HIF-1 α abhängigen Gene wieder. NRVCN mit CnA Überexpression wiesen eine erhöhte Expression der HIF-1 α abhängigen Gene VEGF-A, PGK-1, BNIP3 und GLUT-1 auf, dessen Expression durch die Destabilisierung von HIF-1 α aufgrund der Inhibierung von HSP90 wieder reduziert wurde. (n=4)

* p<0,05

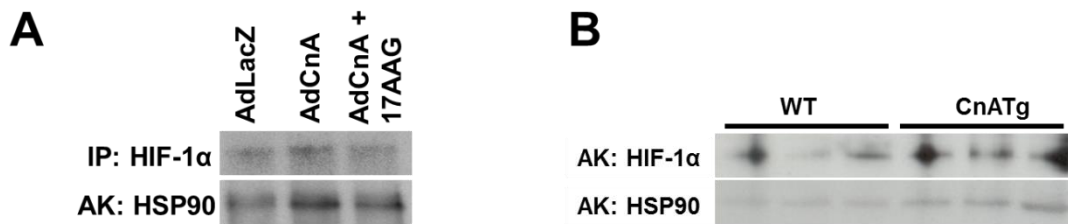


Abb. 23: HSP90 interagiert mit HIF-1α.

(A) Durch Immunpräzipitation von HIF-1α aus Zelllysaten der NRVCM transfiziert mit AdLacZ, AdCnA und AdCnA+17AAG konnte gezeigt werden, dass in AdCnA transfizierten Zellen eine erhöhte Bindung von HSP90 an HIF-1α vorlag, diese jedoch durch 17AAG inhibiert wurde. (n=2). (B) Eine verstärkte Interaktion von HIF-1α und HSP90 zeigten auch CnATg-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen (n=3).

Durch Co-Immunopräzipitation von HIF-1 α und anschließender Detektion von HSP90 konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von HSP90 an HIF-1α *in vitro* in den AdCnA transfizierten Zellen verstärkt vorlag und zusätzlich durch Inhibition von HSP90 mit 17AAG wieder inhibiert werden konnte. In den CnATg-Tieren war ebenfalls eine vermehrte Bindung von HSP90 an HIF-1α nachzuweisen (Abb. 23).

4.8 Inhibierung von HSP90 in CnATg Mäusen reduziert HIF-1α Proteinlevel und verschlechtert die LV-Funktion

Um den genauen Einfluss des stabilisierten HIF-1α auf die Angiogenese in CnATg Mäusen zu untersuchen, wurden diese im Alter von vier Wochen über einen Zeitraum von vier Wochen mit dem HSP90 Inhibitor 17AAG behandelt. Jeden zweiten Tag wurden die Tiere entweder mit 17AAG (25mg/kg Körpergewicht) oder derselben Menge an DMSO i.p. behandelt. Die Inhibierung der HSP90-Aktivität mit 17AAG resultierte in einer signifikanten Destabilisierung der Proteinlevel von HIF-1α um ca. 60% in den CnATg Mäusen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Mäusen. Dies spiegelte sich auch in der Expression der HIF-1α abhängigen Gene VEGF-A, PGK-1 und BNIP3 wieder, dessen mRNA-Expression in den 17AAG-behandelten Mäusen inhibiert wurde (Abb. 24)

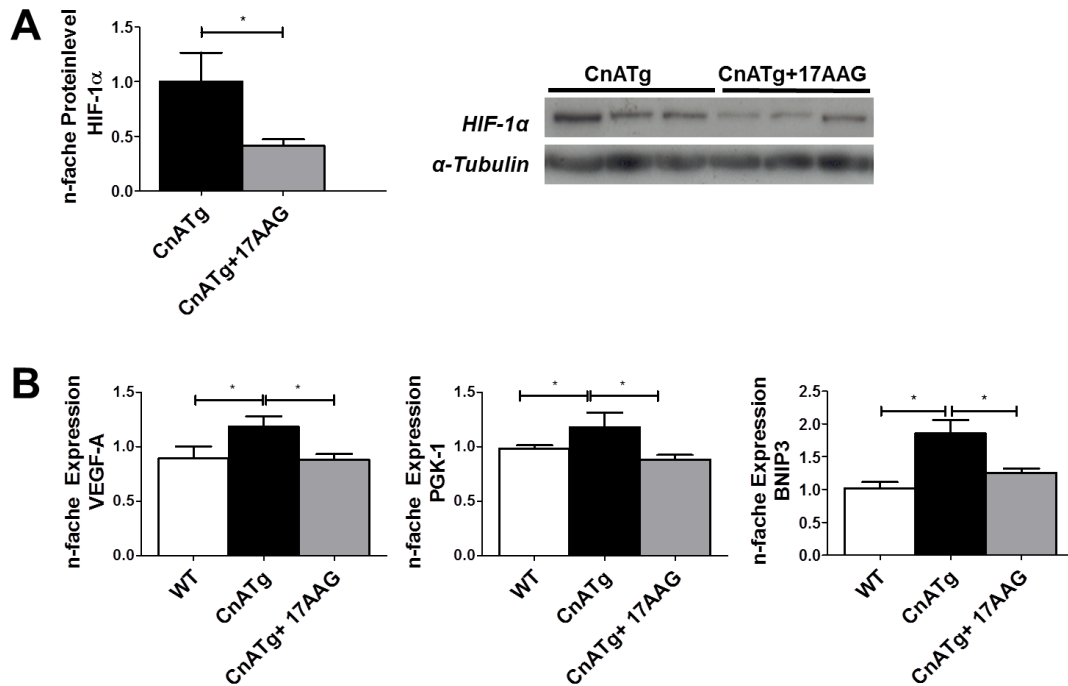


Abb. 24: 17AAG inhibierte die Stabilisierung von HIF-1 α sowie die Expression der Zielgene.

Vier Wochen alte CnATg Mäuse wurden mit 17AAG (25 mg/g Körpergewicht) alle 2 Tage i.p. über einen Zeitraum von vier Wochen behandelt. (**A**) Über Western Blot Analyse war eine signifikante Reduzierung der HIF-1 α Stabilisierung nachzuweisen (CnATg n=4, CnATg+17AAG n=5) und auch (**B**) die Expression der HIF-1 α abhängigen Gene VEGF-A, PGK-1 und BNIP3 wurde durch 17AAG inhibiert (WT n=5, CnATg n=6, CnATg+17AAG n=9) * p<0,05

Des Weiteren führte die Destabilisierung von HIF-1 α zu einer signifikant verminderten Kapillardichte und einer weiteren Verminderung der kardialen Funktion, verglichen zu den DMSO- behandelten CnATg-Mäusen.

In den beiden Gruppen der CnATg Mäuse konnte kein Unterschied in der Ausbildung der Myokardhypertrophie beobachtet werden (Abb. 25).

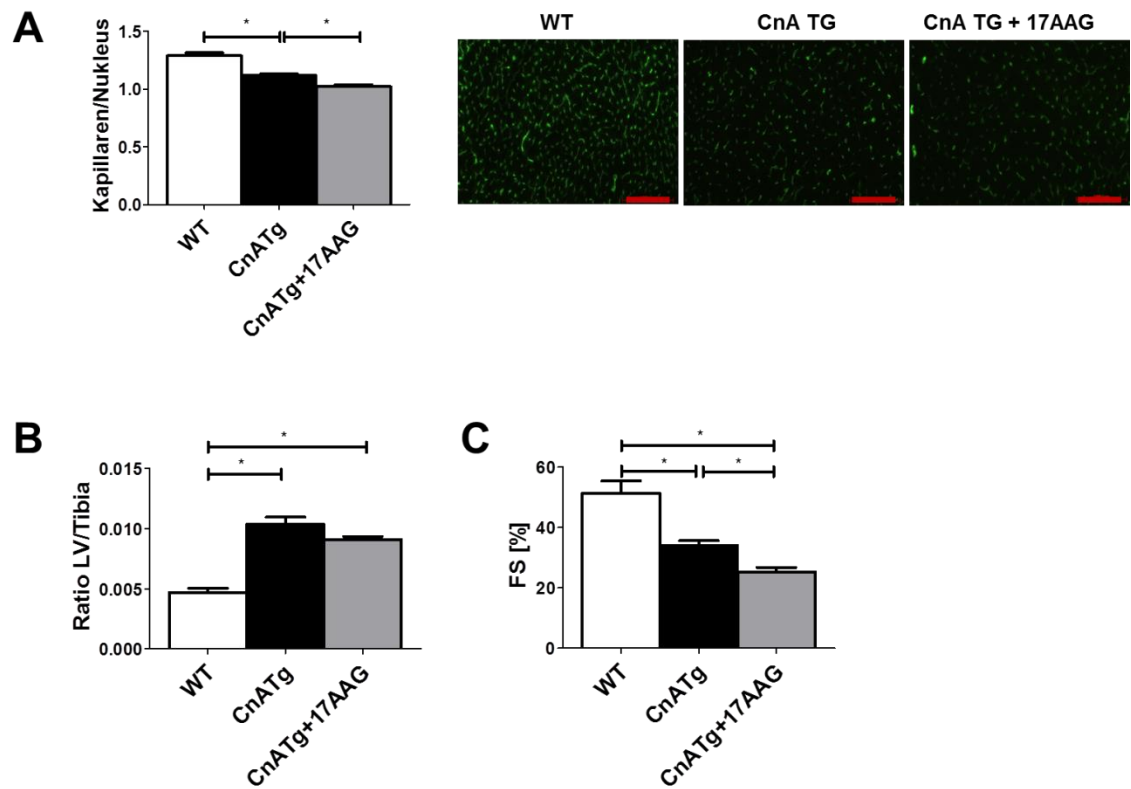


Abb. 25: Inhibierung von HSP90 in CnATg Mäusen führte zu einer Verringerung der Kapillardichte und verschlechterte die kardiale Funktion.

In CnATg Mäusen wurde die HSP90-Aktivität durch Behandlung mit 17AAG (25 mg/Körpergewicht) alle 2 Tage i.p. inhibiert. **(A)** Dies führte zu einer weiteren Verringerung der Kapillardichte, verglichen mit den CnATg Kontrolltieren (je Gruppe n=5), **(B)** ohne dabei den Grad der Hypertrophie zu beeinträchtigen (WT n=5, CnATg n=6, CnATg+17AAG n=9). **(C)** Jedoch führte die Behandlung mit 17AAG zu einer noch stärkeren Verringerung der LV-Funktion (WT n=5, CnATg n=6, CnATg+17AAG n=9).

* p<0,05

5 Diskussion

Die pathologische und physiologische Myokardhypertrophie unterscheiden sich sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene voneinander. Ein wesentlicher Unterschied bei der Entwicklung der Hypertrophieformen liegt in der Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden im Myokard [24, 43]. Die physiologische Hypertrophie geht mit einer gleichbleibenden oder verbesserten kardiale Funktion einher und wird hauptsächlich über den Akt/PKB Signalweg induziert. Die pathologische Myokardhypertrophie hingegen führt letztendlich zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion. Ein entscheidender Mediator der pathologischen Hypertrophie ist die Aktivierung der Phosphatase CalcineurinA, die über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT die Reexpression der fetalen Gene ANP, BNP sowie β -MHC induziert. Im Gegensatz zur physiologischen Hypertrophie weist die pathologische ein Missverhältnis zwischen der Anzahl der Kapillaren und der Größe der Kardiomyozyten auf, was als eine mögliche Ursache der verringerten Herzfunktion diskutiert wird. Die Kombination aus hypertrophen Kardiomyozyten, der verringerten Kapillardichte sowie der vermehrten Fibrose im Myokard resultieren in einer erhöhten Diffusionsstrecke und führen somit zu einem Defizit an Sauerstoff und anderen Nährstoffen in den Kardiomyozyten.

Mit dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Angiogenese in Bezug auf die Art der sich entwickelnden Myokardhypertrophie genauer untersucht werden. Auf Ebene der physiologischen Hypertrophie stellte sich dabei insbesondere die Frage, ob die Inhibierung der Angiogenese eine Modifizierung der physiologischen in eine pathologische verursacht. Auf der anderen Seite wurde untersucht, inwieweit die Aktivierung der Calcineurin-NFAT-Signalkaskade, welche die Ausbildung einer pathologischen Myokardhypertrophie bedingt, auf die Regulation der Angiogenese beeinflusst.

5.1 Inhibierung der Angiogenese kann eine physiologische Hypertrophie nicht in eine pathologische Hypertrophie umwandeln

Postnatales Wachstum oder vermehrtes körperliches Training führen zur Ausbildung einer physiologischen Myokardhypertrophie, die sowohl mit einer gleichbleibenden bzw. verbesserten Herzleistung einhergeht, als auch mit einer Gewährleistung der Aufrechterhaltung einer adäquaten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Myokards aufgrund einer vermehrten Angiogenese.

Für die Analyse der Angiogenese in der physiologischen Myokardhypertrophie wurden Mäuse durch ein kontinuierlich aufbauendes Schwimmtraining für zwei bzw. vier Wochen trainiert. Bereits nach zwei Wochen war sowohl eine Massenzunahme des linken Ventrikels als auch eine verbesserte Kapillarisation nachzuweisen. Zwischen beiden Gruppen, nicht trainiert und trainiert, konnten keine Unterschiede in der linksventrikulären Funktion nach vier Wochen Trainingsdauer gemessen werden. Des Weiteren war die Expression des fetalen Genprogramms, einem Zeichen der pathologischen Myokardhypertrophie, in den trainierten Mäusen, gegenüber den untrainierten, unverändert. Zusammengefasst belegen diese Daten, dass das kontinuierliche Schwimmtraining eine physiologische Myokardhypertrophie induziert.

Auf molekularer Ebene war nach zwei Wochen Training eine vermehrte Phosphorylierung der Kinase Akt am Ser473 nachweisbar, sowie eine vermehrte Expression des durch Akt regulierten proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF-A. Interessanterweise ging die Phosphorylierung von Akt am Ser473 danach wieder zurück und war nach vier Wochen auf dem Expressionslevel der untrainierten Mäuse. Auch die Expression von VEGF-A ist nach vier Wochen Training verringert, jedoch immer noch tendenziell etwas erhöht gegenüber den untrainierten Mäusen. Zwischen diesen zwei Zeitpunkten von zwei und vier Wochen Trainingsdauer fand keine Zunahme der Trainingsintensität statt. Man kann daher davon ausgehen, dass nach vier Wochen der linke Ventrikel an die gleichbleibende Belastung bereits adaptiert ist und daraus resultierend die Akt-Signalkaskade mit folgender VEGF-A Expression nicht mehr aktiviert wird.

Die Inhibierung der Angiogenese erfolgte in diesem Modell in zwei unterschiedlichen Kohorten mittels SU5416, einem Thyrosin-Kinase-Inhibitor und einem neutralisierenden Antikörper gegen den VEGFR-2, mAB VEGFR-2 Klon DC101. Diese unterdrückte ein Wachstum des linken Ventrikels, jedoch konnte interessanterweise in beiden Kohorten weder eine kontraktile Dysfunktion, noch die Reexpression des fetalen Genprogramms festgestellt werden. Interessanterweise war eine vermehrte Phosphorylierung von Akt in diesen Kohorten zu beobachten. Schlussfolgernd war es nicht möglich, die physiologische Hypertrophie durch Inhibierung der Angiogenese in eine pathologische Myokardhypertrophie umzuwandeln.

Mittlerweile ist vielfach belegt, dass durch Aktivierung der Akt-Kinase über Wachstumshormone die Adaption des linken Ventrikels an eine vermehrte körperliche Belastung reguliert wird. So sind der IGF-Rezeptor und eine vermehrte Akt-Phosphorylierung über die PI3Kp110 α Untereinheit für die Ausbildung einer physiologischen Myokardhypertrophie notwendig [43, 73, 74]. Insbesondere Akt1 spielt eine kritische Rolle für das Wachstum des Myokards bzw. der Kardiomyozyten. So weisen Akt1^{-/-} Mäuse ca. 20% weniger Körpergewicht auf als die Wildtypmäuse. Durch ein 20 tägiges Schwimmtraining konnte in diesen Mäusen kein hypertrophes Wachstum des linken Ventrikels induziert werden, weder das LV/Tibia Verhältnis, noch die Kardiomyozytengröße wiesen eine Vergrößerung im Vergleich zu den Kontrolltieren auf [43]. Verschiedene Arbeitsgruppen entwickelten Mausstämme mit unterschiedlichen Charakteristika, die eine aktive Form der Akt1 vermehrt exprimieren. Die Arbeitsgruppe um Shioi et al. konnte zeigen, dass transgene Mäuse, die herzspezifisch eine aktive Form von Akt1 überexprimieren, eine massive Hypertrophie mit einer normalen linksventrikulären Funktion aufzeigen, jedoch aber vermehrt Fibrose ausbilden im Gegensatz zu den Wildtypmäusen [40]. Andere Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander diese Ergebnisse nur teilweise bestätigen. Ihre entwickelten Akt1-transgenen Mäusen wiesen ebenfalls eine starke Myokardhypertrophie mit gleichbleibender oder verbesserter LV-Funktion auf, jedoch konnte keine vermehrte Fibrosebildung nachgewiesen werden

[75, 76]. Ein weiteren interessanten Befund konnte Shiojima et al. in einer induzierbaren Akt-Überexpressions-Mauslinie zeigen. Zum einen führte die kurzzeitige Akt-Überexpression in adulten Mäusen zu einer physiologischen Myokardhypertrophie, wohingegen eine längerfristige Akt-Aktivierung mit kontraktile Dysfunktion, Fibrose und einer vermehrten Expression von ANP und β -MHC einhergeht. Die Inhibierung der Angiogenese mittels neutralisierendem VEGFR-2 Antikörper bei der Kurzzeitaktivierung der Akt-Kinase führte, analog zu unseren Versuchen, zu einer verminderten Kapillardichte im linken Ventrikel, einer verringerten Ausbildung der Myokardhypertrophie und interessanterweise auch zu einer signifikanten Verschlechterung der kardialen kontraktilen Funktion. Auf Grundlage dieser Daten postulierte Shiojima, dass eine Inhibierung der Angiogenese die physiologische Myokardhypertrophie in eine pathologische modifiziert [54]. Die Aktivierung der Akt-Kinase kann sowohl über Wachstumsfaktoren über die PI3Kp110 α als auch über G-Protein aktivierte p100 γ Untereinheit, die eher eine maladaptive Hypertrophie stimuliert, aktiviert werden [77]. In einem Modell mit artifizieller Akt-Überexpression werden die differenziellen Aktivierungsmöglichkeiten der Akt-Kinase über die PI3K übergangen, was möglicherweise dazu führt, dass nach einer gewissen Zeit der ‚physiologische‘ Akt-Signalweg in den ‚pathologischen‘ Akt-Signalweg modifiziert wird.

Da die Inhibierung der Angiogenese im von uns gewählten Schwimmmodell weder die Reexpression des fetalen Genprogramms induzierte, noch die kardiale Funktion beeinflusste, können die Daten von Shiojima nicht bestätigt werden, dass durch antiangiogene Behandlung eine physiologische in eine pathologische Hypertrophie überführt werden kann.

Vermutlich wurde die Aktivierung der Akt-Kinase in unserem Modell der physiologischen Myokardhypertrophie hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren über die PI3Kp110 α aktiviert und somit die kardiale Funktion trotz antiangiogener Behandlung aufrechterhalten.

In den antiangiogen behandelten trainierten Mäusen, sowohl mit SU5416 als auch mit mAB VEGFR-2 klon DC101, wurde die Akt-Kinase nochmals verstärkt phosphoryliert, was eventuell einen Mechanismus induziert um die

kontraktile Funktion aufrechtzuerhalten. Neben der oben beschriebenen Rolle von Akt in der physiologischen Myokardhypertrophie, ist diese Kinase auch an der Regulierung der kontraktile Funktion beteiligt [76, 78]. Aktives Akt führt zu einer verbesserten kardialen Kontraktilität, wohin gegen Akt-/Mäuse nach körperlicher Belastung eine verschlechterte fraktionelle Verkürzung aufweisen [43, 76]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Akt eine entscheidende Bedeutung für den Kalziumfluss sowohl bei der intrazellulären Regulierung als auch beim extrazellulären Kalziumeinstrom spielt [79, 80].

Welche Auswirkung die vermehrte Akt-Aktivität in den trainierten Mäusen mit antiangiogener Behandlung in Bezug auf den Kalziumtransport bewirkt und ob dadurch ein Kompensationsmechanismus induziert wird, um die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten, muss noch genauer untersucht werden.

Einen weiteren Parameter, der untersucht wurde, um zu entscheiden, ob eine pathologische Myokardhypertrophie induziert werden konnte, war die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, die einen wichtigen Mediator der pathologischen Hypertrophie darstellt. Aktiviertes Calcineurin induziert eine Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Zellkern, wo es die hypertrophe Genexpression induziert. Unter anderem besitzt NFAT Bindestellen am Promotor des *myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1.4* (MCIP1.4), das deshalb oftmals als Read-Out für die Calcineurin-Aktivität verwendet wird. Wilkins et al. konnte zeigen, dass in der physiologischen Hypertrophie die Calcineurin-Aktivität verringert ist und somit nur in der pathologischen Form eine wichtige Rolle spielt [81].

Auch in unserem Modell konnten wir die Daten von Wilkins et al. bestätigen und sahen nach zwei und vier Wochen Training eine verringerte Expression des MCIP1.4, was wiederum auf eine verringerte Calcineurin-Aktivität hinweist. Zwischen den trainierten Mäusen und den trainierten Mäusen, die mit den VEGFR-2 Inhibitoren behandelt wurden, war in unserem Modell kein Unterschied in der Expression von MCIP1.4 zu verzeichnen. Folglich nahm die Inhibierung der Angiogenese auch keinen Einfluss auf die Calcineurin-Aktivität.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Inhibierung der Angiogenese sowohl mit SU5416 als auch mit DC101 bei Ausdauertraining in Mäusen ein hypertrophes Wachstum des linken Ventrikels zwar unterdrückt, jedoch keine pathologische Myokardhypertrophie induzieren kann. Einen möglichen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Myokardfunktion konnte noch nicht aufgezeigt werden, jedoch kann postuliert werden, dass die vermehrte Phosphorylierung und somit die erhöhte Aktivität der Akt-Kinase einen Kompensationsmechanismus auslöst, der wahrscheinlich auf den intrazellulären Kalziumhaushalt einwirkt und somit die Kontraktilität der Kardiomyozyten aufrechterhält. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht weiter untersucht.

5.2 Einfluss der Calcineurin-NFAT-Signalkaskade auf die Regulierung der Angiogenese während der pathologischen Myokardhypertrophie

5.2.1 CalcineurinA transgene Mäuse weisen überraschenderweise eine transiente Aufrechterhaltung der Kapillardichte auf

Während der Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie entsteht ein Missverhältnis zwischen der Kapillardichte im linken Ventrikel und der Kardiomyozytengröße, die zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung führt. Einen möglichen Zusammenhang zwischen der Angiogenese, der Hypertrophie sowie der Funktionsleistung des linken Ventrikels können mittlerweile zahlreiche Daten belegen. Durch eine proangiogene Behandlung während der pathologischen Myokardhypertrophie verbessert sich die Mikrovaskularisierung und führt zu einer Aufrechterhaltung der kardialen Funktion [60, 61]. Konträr führt die Inhibierung der Angiogenese zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion und verstärkt somit den Übergang von der Hypertrophie in die Insuffizienz [47, 82].

Auf molekularer Ebene wird die pathologische Myokardhypertrophie mit einer Aktivierung der CalcineurinA-NFAT-Signalkaskade assoziiert. CalcineurinA

ist eine Phosphatase, die im aktiven Zustand den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert und dessen Translokation in den Nukleus induziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer aktiven Form des CalcineurinA in Mäusen (CnATg-Mäuse) schon im jungen Alter eine stärkere Hypertrophie als sie durch eine transverse Aortenkonstriktion (TAC-Modell) induziert werden kann. In beiden Modellen wurde diese von einer Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion begleitet.

Im Gegensatz zum TAC-Modell, das nach vier Wochen eine signifikante Reduzierung der Kapillardichte von -12% aufwies, weisen CnATg Mäuse überraschenderweise eine Reduzierung der Kapillardichte erst im Alter von acht Wochen auf. Eine genauere Betrachtung der Daten zeigt auch, dass in den CnATg Mäusen, verglichen zu den Wildtypmäusen, eine relativ adäquate Kapillardichte trotz der massiv ausgeprägten Myokardhypertrophie erhalten blieb. Zu einem Zeitpunkt, an dem die Hypertrophie in beiden pathologischen Modellen, CnATg und TAC-Modell, ähnlich ausgebildet war, nämlich nach vier Wochen, weisen die CnATg Mäuse eine signifikant erhöhte Kapillarisation im linken Ventrikel auf.

Um einen generellen Einfluss der Angiogenese im CnATg-Mausmodell zu untersuchen, wurden diese im Alter von vier Wochen mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 behandelt. Parallel wurde auch, als vergleichendes Modell, in Mäuse mit transverser Aortenkonstriktion die Angiogenese inhibiert. In beiden Modellen hatte dies eine signifikant verringerte Kapillardichte zur Folge, ohne dabei den Grad der Hypertrophie zu verändern. Des Weiteren führte die Behandlung mit SU5416 zu einer weiteren Minderung der kardialen Funktion. Schlussfolgernd verursachte eine antiangiogene Therapie auch in CnATg-Mäusen eine negative Auswirkung auf die pathologische Myokardhypertrophie und bedingte wahrscheinlich dadurch einen verfrühten Übergang von der Hypertrophie in die Insuffizienz. Diese Daten decken sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten, die ebenfalls eine Inhibierung der Angiogenese in pathologischen Myokardhypertrophie-Modellen mit einer

verstärkten kardialen Dysfunktion in Verbindung bringen konnten [47, 82]. Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit in Hinblick auf den Einfluss der Inhibierung der Angiogenese in der pathologischen Myokardhypertrophie, dass CalcineurinA ein wichtiges Schlüsselmolekül zur Ausbildung einer pathologischen Myokardhypertrophie darstellt. Zum anderen weist die transiente Aufrechterhaltung der Kapillardichte, trotz einer stark ausgeprägten Hypertrophie, im CnATg-Mausmodell auf einen möglichen protektiven Effekt von CalcineurinA auf die Myokardhypertrophie hin.

5.3 CnA weist partiell protektive Effekte auf die Myokardhypertrophie auf

Molekulare Mechanismen, die für eine verringerte Kapillardichte bei der Ausbildung der pathologischen Myokardhypertrophie verantwortlich sind, sind weitgehend unbekannt. Bislang geht man davon aus, dass das Missverhältnis der Kapillardichte in der pathologischen Myokardhypertrophie über eine verringerte HIF-1 α Aktivität verursacht wird. HIF-1 α ist ein proangiogener Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich über proteasomale Degradation reguliert wird. So konnte Sano et al. eine Tumorsupressor p53 abhängige Destabilisierung von HIF-1 α in TAC operierten Mäusen als Ursache für das Missverhältnis zwischen Kapillaren und Kardiomyozyten in der pathologischen Myokardhypertrophie zeigen [47].

Im vorhergehenden Abschnitt wurde bereits darauf hingewiesen, dass CnATg Tiere eine transiente Aufrechterhaltung der Kapillardichte aufweisen und dass diese, verglichen mit der Kapillardichte im TAC-Modell, erhöht ist. Im Gegensatz zu der TAC- induzierten Hypertrophie, in der HIF-1 α nur in der kompensatorischen Phase stabilisiert vorlag und durch die erhöhte p53 Expression vermutlich wieder destabilisiert wurde, zeigten vier und acht Wochen alte CnATg Tieren stets eine erhöhte Stabilisierung von HIF-1 α als auch eine vermehrte Expression der Zielgene, wie z.B. VEGF-A, auf.

Um einen weiteren Einblick in den Mechanismus zu erhalten, wurden *in vitro* Versuche mit neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Auch neonatalen Rattenkardiomyozyten, die eine aktive Form von CalcineurinA

überexprimieren, zeigten eine Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α . Interessanterweise zeigte jedoch die Überexpression des Transkriptionsfaktors NFAT, welcher durch CalcineurinA aktiviert wird, keinerlei Effekte auf die Stabilisierung von HIF-1 α . Folglich kann angenommen werden, dass CalcineurinA, unabhängig der NFAT-Aktivität, Einfluss auf HIF-1 α ausübt.

Interessanterweise induzierte die Überexpression von CnA eine leichte aber signifikant vermehrte Expression von HSP90, einem Stabilisator von HIF-1 α . Sowohl in CnA-transfizierten Zellen als auch in CnATg Mäusen konnte eine verstärkte Interaktion von HSP90 mit HIF-1 α nachgewiesen werden. Die Inhibierung von HSP90, entweder durch RNA-Interferenz oder durch das Geldanamycin-Analogon 17AAG, führte zu einer Blockade der HIF-1 α Stabilisierung in den CnA-transfizierten Zellen. Auch die Inhibierung von HSP90 mit 17AAG in CnATg-Mäusen induzierte eine Destabilisierung von HIF-1 α mit resultierender verminderter Kapillardichte und einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion. Die Destabilisierung von HIF-1 α erzielt somit gleiche Effekte auf die myokardiale Funktion und Angiogenese, wie sie schon bei der Inhibierung der Angiogenese durch SU5416 in den CnATg-Tieren beschrieben wurden.

In dieser Arbeit werden Ergebnisse aufgezeigt, die implizieren, dass CalcineurinA, ein zentraler Mediator der pathologischen Hypertrophie, auch partielle kardioprotektive Eigenschaften aufzeigt, in dem es eine kurzfristige Aufrechterhaltung der Kapillardichte über einen HSP90/HIF-1 α abhängigen Mechanismus bewirkt.

HIF-1 α ist ein proangiogener Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich über proteasomale Degradation reguliert wird. Intrazelluläre hypoxische Bedingungen verhindern die proteasomale Degradation und führen zur Dimerisierung der HIF-1 α und HIF-1 β Untereinheiten. Unter Normoxie konkurrieren die Proteine HSP90 und RACK1 um die Bindung am N-Terminus von HIF-1 α . Das Chaperone, HSP90, verhindert die Destabilisierung von HIF-1 α , wohingegen RACK-1 die proteasomale Degradation des Transkriptionsfaktors induziert [69]. Des Weiteren konnte

gezeigt werden, dass CalcineurinA die Bindung von RACK-1 an HIF-1 α inhibiert und so die Degradation von HIF-1 α unterbinden kann [70].

Bislang geht man davon aus, dass das Missverhältnis der Kapillardichte in der pathologischen Myokardhypertrophie über eine verringerte HIF-1 α Aktivität verursacht wird [47]. CalcineurinA-transgene Tiere hingegen weisen eine konstante Stabilisierung von HIF-1 α über HSP90 auf, die vorerst für eine Aufrechterhaltung der Kapillardichte verantwortlich ist.

HIF-1 α besitzt jedoch nicht nur einen protektiven Effekt auf die Angiogenese in der Hypertrophie. So konnte gezeigt werden, dass heterozygote knock out Mäuse nach transverser Aortenkonstriktion eine verschlechterte kardiale Funktion aufgrund eines gestörten Kalziumhaushaltes aufweisen [83]. Andererseits werden mittlerweile die protektiven Effekte von HIF-1 α , z.B. auf die Angiogenese in der pathologischen Hypertrophie, in Frage gestellt. So konnten verschiedene andere Studien belegen, dass HIF-1 α möglicherweise auch negative Effekte auf den Metabolismus in der pathologischen Myokardhypertrophie ausübt sowie zu einer Kardiomyopathie im Falle einer Überexpression führt [84, 85].

Dies ist nicht die erste Arbeit, die einen partiell positiven Effekt von CalcineurinA in der pathologischen Myokardhypertrophie aufzeigt. In einer Mauslinie mit dilatativer Kardiomyopathie konnte gezeigt werden, dass eine moderate Überexpression von CalcineurinA die Apoptose als auch die Fibrose vermindert und folglich die kardiale Funktion verbessert [86]. Des Weiteren führt die vermehrte Expression von MCIP1.4, dessen Expression durch die CalcineurinA-NFAT-Aktivierung induziert wird, zu einer Repression des kardialen *Remodelings*, wohingegen die Inhibierung oder eine fehlende CalcineurinA-Aktivität das kardiale *Remodeling* in der pathologischen Myokardhypertrophie verschlechtert [87-89]. Die Rolle des Calcineurin-NFAT-Signalweges als zentrale Kaskade in der pathologischen Myokardhypertrophie, wie sie 1998 von Molkenkin erstmals beschrieben wurde, sollte daher nach neuestem Kenntnisstand der Forschung kontrovers betrachtet werden.

Zusammenfassend konnte mit diesen Daten ein überraschender partiell positiver Effekt von CalcineurinA auf die Angiogenese über eine HSP90-HIF-1 α abhängige Interaktion festgestellt werden. Die Inhibierung von HSP90 und damit zusammenhängende Destabilisierung von HIF-1 α führten sowohl zu einer verringerten Kapillardichte als auch einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion.

Folglich kann aber auch gemutmaßt werden, dass die Beeinträchtigung der Kapillarisation in der pathologischen Hypertrophie nicht nur von HIF-1 α abhängt. Da trotz einer steten HIF-1 α Stabilisierung die Kapillardichte im Verlauf des Alterns abnimmt.

5.4 Die Rolle der Angiogenese in der Hypertrophie

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Angiogenese an drei etablierten Hypertrophie-Modellen untersucht. Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die Inhibierung der Angiogenese in der physiologischen Hypertrophie keine Modifizierung in eine pathologische Hypertrophie bewirken kann. Jedoch unterdrückte die Inhibierung der Angiogenese eine Massenzunahme des linken Ventrikels.

Gegenteilige Ergebnisse wurden in den pathologischen Modellen erzielt. Sowohl im TAC- als auch im CnATg-Modell wurde durch die Inhibierung der Angiogenese die kardiale Funktion noch stärker geschwächt. Abschließend kann postuliert werden, dass für die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion der exogene Stimulus verantwortlich ist und nicht das Vorhandensein der Angiogenese per se.

Auf der anderen Seite konnte mit dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass CalcineurinA als zentraler Mediator der pathologischen Myokardhypertrophie nicht nur negative Eigenschaften besitzt. So übt CalcineurinA durch die Stabilisierung von HIF-1 α über HSP90 einen proangiogenen Effekt aus, was partiell protektiv auf die pathologische Myokardhypertrophie wirkt.

Für zukünftige Arbeiten wäre es daher sehr interessant zu untersuchen, ob es möglich ist, die positiven Effekte von CalcineurinA zu nutzen oder zu verstärken und von dem negativen Einfluss auf die Hypertrophie zu trennen, um somit innovative neue therapeutische Ansätze zu finden.

6 Abkürzungen

17AAG	17-allylaminogeldanamycin
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT-I	Angiotensin I
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-PAS	basicHelix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim
BNP	B-natriuretisches Peptid
CMV	Cytomegalovirus
CnA	CalcineurinA
CnATg	CalcineurinA transgen
CnB	CalcineurinB
CsCl	Cäsiumchlorid
ct	<i>cycle treshold</i>
Ct-I	Cardiotrophin-I
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EPZ	endothelialen Progenitorzellen
Et-I	Endothelin-I
EZM	Extrazelluläre Matrix
EtBr	Ethidiumbromid
f	femto
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Flk-1	=VEGFR-2
Flt-1	=VEGFR-1
FS	<i>fractional shortening</i>
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
HEK	human embryonal kidney

HIF-1 α	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i>
IGF-I	<i>Insulin growth factor-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KHK	koronare Herzkrankheit
LDHA	Laktat dehydrogenase A,
LV	linker Ventrikel
LVEDD	Enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels
LVESD	Endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels
M	Molar
m	milli
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCIP1.4	<i>myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1, exon 4 isoform</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
MOI	<i>multiply of infection</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
n	nano
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NRVCM	neonatale Rattenkardiomyozyten
p	piko
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PGK-1	Phosphoglyceratkinase 1
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
pVHL	Hippel-Landau Tumor Suppressor Protein
RACK-1	<i>receptor for activated C-kinase-1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Serca2a	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>

SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
β-MHC	<i>myosin heavy chain beta</i>
TAC	transverse Aortenkonstriktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAD	transkriptionale Aktivierungsdomänen
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tr	trainiert
U	Units
UTr	untrainiert
ü. N	über Nacht
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor-A</i>
VEGF-B	<i>vascular endothelial growth factor-B</i>
VEGFR-1	<i>vascular endothelial growth factor receptor-1</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro

7 Literaturverzeichnis

1. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
2. Liu, Y.V. and G.L. Semenza, *RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization*. Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 656-9.
3. Ruas, J.L. and L. Poellinger, *Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 514-22.
4. Molkentin, J.D., *Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells*. Circ Res, 2013. **113**(1): p. 16-9.
5. Lloyd-Jones, D., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2010. **121**(7): p. 948-54.
6. Soonpaa, M.H., et al., *Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9.
7. Cooper, G.t., *Cardiocyte adaptation to chronically altered load*. Annu Rev Physiol, 1987. **49**: p. 501-18.
8. Ritter, O. and L. Neyses, *The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure*. Trends Mol Med, 2003. **9**(7): p. 313-21.
9. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
10. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
11. Weber, K.T., C.G. Brilla, and J.S. Janicki, *Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(3): p. 341-8.
12. Rakusan, K., et al., *Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy*. Circulation, 1992. **86**(1): p. 38-46.
13. Karch, R., et al., *The spatial pattern of coronary capillaries in patients with dilated, ischemic, or inflammatory cardiomyopathy*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(3): p. 135-44.
14. Chien, K.R., et al., *Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response*. FASEB J, 1991. **5**(15): p. 3037-46.
15. Izumo, S., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, *Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression*

- produced by pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 339-43.
16. Pluim, B.M., et al., *The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function*. Circulation, 2000. **101**(3): p. 336-44.
 17. Ferrans, V.J. and E.R. Rodriguez, *Cardiovascular lesions in collagen-vascular diseases*. Heart Vessels Suppl, 1985. **1**: p. 256-61.
 18. Schaible, T.F. and J. Scheuer, *Comparison of heart function in male and female rats*. Basic Res Cardiol, 1984. **79**(4): p. 402-12.
 19. Fagard, R.H., *Effect of training on left ventricular structure and functioning of the normotensive and the hypertensive subject*. Blood Press Monit, 1997. **2**(5): p. 241-245.
 20. Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang, *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13367-70.
 21. Wilkins, B.J., et al., *Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(21): p. 7603-13.
 22. Okamura, H., et al., *Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 539-50.
 23. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 695-7.
 24. Molkentin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
 25. De Windt, L.J., et al., *Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3322-7.
 26. Hill, J.A., et al., *Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10251-5.
 27. Rothermel, B.A., et al., *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3328-33.
 28. Fuentes, J.J., et al., *A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(10): p. 1935-44.
 29. Rothermel, B., et al., *A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8719-25.
 30. Yang, J., et al., *Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. E61-8.

31. Vega, R.B., et al., *Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity.* J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30401-7.
32. Sadoshima, J., et al., *Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling.* Circ Res, 1995. **76**(1): p. 1-15.
33. Yamazaki, T., et al., *Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes.* J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 12069-76.
34. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
35. Cheng, J.Q., et al., *Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3636-41.
36. Nakatani, K., et al., *Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 906-10.
37. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts.* Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
38. Downward, J., *Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 262-7.
39. Jiang, B.H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1749-53.
40. Shioi, T., et al., *Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2799-809.
41. McMullen, J.R., et al., *Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12355-60.
42. Shioi, T., et al., *The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice.* EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2537-48.
43. DeBosch, B., et al., *Akt1 is required for physiological cardiac growth.* Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-104.
44. Friehs, I. and P.J. del Nido, *Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury.* Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S678-84.
45. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Activation of the HIF pathway in cancer.* Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(3): p. 293-9.
46. Heineke, J., et al., *Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart.* J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3198-210.

47. Sano, M., et al., *p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload*. Nature, 2007. **446**(7134): p. 444-8.
48. Kelly, B.D., et al., *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1074-81.
49. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. Blood, 2005. **105**(1): p. 199-206.
50. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 434-8.
51. Dimmeler, S., E. Dernbach, and A.M. Zeiher, *Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration*. FEBS Lett, 2000. **477**(3): p. 258-62.
52. Semenza, G.L., *Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling*. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 840-7.
53. Levy, A.P., et al., *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13333-40.
54. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
55. Brugarolas, J.B., et al., *TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways*. Cancer Cell, 2003. **4**(2): p. 147-58.
56. Liang, Q., et al., *The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7460-9.
57. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
58. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
59. Giordano, F.J., et al., *A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5780-5.
60. Friehs, I., et al., *Promoting angiogenesis protects severely hypertrophied hearts from ischemic injury*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(6): p. 2004-10; discussion 2011.
61. Kaza, E., et al., *Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents angiogenesis in hypertrophied myocardium*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(2): p. 410-8.
62. Abraham, D., et al., *Selective downregulation of VEGF-A(165), VEGF-R(1), and decreased capillary density in patients with*

- dilative but not ischemic cardiomyopathy*. Circ Res, 2000. **87**(8): p. 644-7.
63. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(5): p. 588-94.
64. Srinivas, V., et al., *Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(2): p. 557-61.
65. Masson, N., et al., *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation*. EMBO J, 2001. **20**(18): p. 5197-206.
66. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
67. Mahon, P.C., K. Hirota, and G.L. Semenza, *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2675-86.
68. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4089-96.
69. Liu, Y.V., et al., *RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 207-17.
70. Liu, Y.V., et al., *Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37064-73.
71. De Windt, L.J., et al., *Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 255-63.
72. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
73. Kim, J., et al., *Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(11): p. 2531-43.
74. McMullen, J.R., et al., *The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4782-93.
75. Matsui, T., et al., *Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22896-901.
76. Condorelli, G., et al., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12333-8.

77. Patrucco, E., et al., *PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects*. Cell, 2004. **118**(3): p. 375-87.
78. Sun, H., et al., *Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca²⁺ currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1390-7.
79. Catalucci, D., et al., *Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28180-7.
80. Catalucci, D., et al., *Akt regulates L-type Ca²⁺ channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability*. J Cell Biol, 2009. **184**(6): p. 923-33.
81. Wilkins, B.J., et al., *Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 110-8.
82. Izumiya, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload*. Hypertension, 2006. **47**(5): p. 887-93.
83. Silter, M., et al., *Impaired Ca(2+)-handling in HIF-1alpha(+/-) mice as a consequence of pressure overload*. Pflugers Arch, 2010. **459**(4): p. 569-77.
84. Bekeredjian, R., et al., *Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11693.
85. Krishnan, J., et al., *Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy*. Cell Metab, 2009. **9**(6): p. 512-24.
86. Heineke, J., et al., *Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(6): p. 1080-7.
87. Li, H.H., et al., *Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex*. J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1058-71.
88. Heineke, J., et al., *Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1655-60.
89. van Rooij, E., et al., *MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction*. Circ Res, 2004. **94**(3): p. e18-26.

8 Danksagung

Natürlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei dieser Arbeit unterstützt haben und somit auch einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein großer Dank gilt PD Dr. Emmanuel Chorianopoulos für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ebenso danke ich Ihm sehr für die engagierte Betreuung, die wissenschaftlichen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Angel für die Übernahme des Erstgutachtens, seinen wissenschaftlichen Anregungen und Vorschläge, die bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Johannes Backs für die Begutachtung dieser Arbeit. Zudem bedanke ich mich zusätzlich für die wissenschaftliche Unterstützung und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Wieland und Prof. Dr. Martin Müller für die Bereitstellung als Prüfer meiner Disputation bedanken.

Ich möchte mich auch besonders bei Susann Werkmeister und Kai-Uwe Jarr bedanken. Kai-Uwe Jarr danke ich für die außergewöhnliche Unterstützung und der fachlichen Expertise. Susann Werkmeister danke ich für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die tolle Zeit sowohl im Labor als auch Privat und Ihr Verständnis für meine Launen und Macken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen der AG Hassel, AG Most, AG Raake und AG Müller für die tolle Atmosphäre im ‚Laborgang‘ bedanken. Ganz besonders bedanke ich mich bei Julia Reinkober, Julia Ritterhoff und Henrike Tschechner für die ‚Mitbenutzung‘ einiger Antikörper, den konstruktiven Gesprächen und der Motivation mit Kaffee und Schoki in den richtigen Momenten.