

Mechanische und humorale Stimulation von kardialen Myozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Peter Bramlage
aus Essen i.O.

Giessen 1999

Aus dem
Max-Planck Institut für physiologische und klinische Forschung
Abteilung für experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Schaper

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Piper

Tag der Disputation: 09.08.2000

Bramlage, Peter:

Mechanische und humorale Stimulation von kardialen Myozyten

Dissertation, Justus-Liebig-Universität zu Giessen, 1999

Mechanische und humorale Faktoren werden unter anderem für die Entwicklung der Hypertrophie von Muskelzellen verantwortlich gemacht. Unter Hypertrophie versteht man die Größenzunahme eines Gewebes oder Organs durch Zellvergrößerung bei konstanter Zellzahl und –struktur. Sie ist damit gegenüber der Hyperplasie abzugrenzen, die mit einer Erhöhung der Zellzahl einhergeht. Die Hypertrophie ist im Herzen des Erwachsenen bei der Adaption des Organs an verschiedene pathologische Bedingungen wie Infarzierung oder Hypertonie von entscheidender Bedeutung, da die Teilung der Herzmuskelzellen in der Zeit nach der Geburt sistiert. Daher wurde die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Initiation zellulärer Hypertrophie in Kulturen von isolierten Kardiomyozyten getestet, und mit Hilfe der elektrischen Feldstimulation der Einfluß mechanischer Aktivität auf das Wachstum der Zellen untersucht.

Die getesteten Faktoren Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF I&II), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF 1&2), Leukämiezellen-inhibierender Faktor (LIF), Interleukin 11 (IL-11) und der Transformierende Wachstumsfaktor β_1 (TGF- β_1) waren nicht in der Lage, eine Hypertrophieentwicklung der Zellen zu bewirken (Proteingehalt nach 8 Tagen: IGF 77%, FGF 102%, LIF 64%, IL-11 40%, TGF- β_1 78% der 2 Tage alten Kontrolle). Erst die Kombination von Wachstumsfaktoren, wie sie in fetalem Kälberserum (FCS) und Endothelzell-Wachstumszusatz (ECGS) vorliegt, konnte einen Anstieg an zellulärem Protein bewirken (FCS 110%, ECGS 118%).

Die Zellen in Kulturen mit hoher Proteinsynthese (IGF 212%, ECGS 385%, FCS 700% der 2 Tage alten Kontrolle) veränderten ihre Morphologie sehr stark, indem sie abflachten und die Oberfläche vergrößerten. Zellen mit niedriger Syntheseleistung gelang diese Adaption nur in weit geringerem Maße (FGF 162%, LIF 135%, IL-11 133%, TGF- β_1 57%); ihre längliche Form blieb weitgehend erhalten. Eine Sonderstellung in diesem Zusammenhang nahm TGF- β_1 ein. Hatte es bei alleiniger Zugabe einen nur geringen Einfluß auf die Morphologie der Zellen, zeigte es in Kombination mit ECGS eine Suppression der ECGS-typischen adaptiven Wirkung. Die Proteinsyntheseerhöhung unter ECGS ging zurück (von 385 auf 228% der Kontrolle), der Proteingehalt stieg vergleichbar an (116%) und der strukturelle Umbau wurde blockiert.

Ausgehend von der Beobachtung, daß eine Beschleunigung der durch ECGS- oder FCS-induzierten Hypertrophieentwicklung mit spontaner kontraktile Aktivität einsetzt, wurde die Hypothese getestet, daß myokardiale Erregung und Kontraktion zu zellulärer Hypertrophie führt. In Kulturen von adulten Kardiomyozyten, die für 24h elektrisch stimuliert wurden, war die Synthese (128,5%), der Gehalt (119,4%) and totaler Ribonukleinsäure (RNA) und die Proteinsynthese im Vergleich zur 24h kultivierten Kontrolle erhöht (162%). Der Proteingehalt veränderte sich nicht (94%). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Arbeiten von Kaye et al. [1], die eine Hypertrophieentwicklung der Zellen unter Feldstimulation beschreiben. Sie postulierten als Mechanismus dieses Wachstums eine autokrine Stimulation durch FGF-2, das unter mechanischer Aktivität freigesetzt wird. Daher haben wir in der vorliegenden Arbeit auch die Expression von Wachstumsfaktoren unter elektrischer Feldstimulation untersucht. Die Transkriptionraten von FGF-1, FGF-2 und dem Rezeptor-1 für FGF (FGF-R1) blieben durch die elektrische Stimulation unbeeinflusst, die von VEGF erhöhte sich signifikant auf 136,6% der Kontrolle. Eine Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors Suramin oder eines spezifischen FGF-2 Antikörpers unter der Vorstellung einer verminderten FGF-Wirkung Wachstumsfaktor bewirkte keine Reduktion der beschriebenen Veränderungen auf RNA- und Proteinebene. Zusammengefaßt stellte daher die mechanische Aktivität einen Wachstumsfaktor dar, der primär eine Adaption der Zellen an die Kultur im Sinne einer Dedifferenzierung bewirkt, aber nicht zur Hypertrophie der Zellen führt.

Aus der vorliegenden Arbeit schließen wir, daß Hypertrophie ein komplexer Prozess ist, der die Interaktion verschiedener humoraler und mechanischer Wachstumsfaktoren voraussetzt. Einzelne rekombinante Wachstumsfaktoren waren nicht in der Lage eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen hervorzurufen. Die verschiedenen humoralen und mechanischen Stimuli beeinflussten nur Teile des Proteinumsatzes in kardialen Myozyten. Durch die sehr unterschiedlichen Wirkungsspektren behindern oder verstärken sich die Faktoren in Ihrer Wirkung. Während IGF zu einer starken Dedifferenzierung der Zellen führte, die durch eine hohe Proteinsynthese und Degradation gekennzeichnet war, konnte TGF- β_1 als Differenzierungshormon identifiziert werden, das eine durch ECGS induzierte Dedifferenzierung verhinderte. Daher ist zu vermuten, das die einzelnen Wachstumsfaktoren auf Ebene der Signaltransduktion interagieren und erst in einer geeigneten Kombination in der Lage sind, zelluläre Hypertrophie hervorzurufen.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE ENTWICKLUNG DES AUSDIFFERENZIIERTEN MYOKARDS.....	1
1.2 ZELLKULTUR VON HERZMUSKELZELLEN	2
1.3 WACHSTUMSFAKTOREN	3
1.4 MECHANISCHE AKTIVITÄT	8
1.5 INTERAKTION VON WACHSTUMSFAKTOREN	10
1.6 ZIEL MEINER ARBEIT	10
2 MATERIAL & METHODEN	12
2.1 MATERIAL.....	12
2.1.1 Zellisolierung	12
2.1.2 Zellkultur.....	12
2.1.3 Molekularbiologie.....	13
2.1.4 Histologie.....	15
2.1.5 Versuchstiere.....	16
2.1.6 Bezugsquellen.....	16
2.2 METHODEN	17
2.2.1 Isolierung von adulten Kardiomyozyten der Ratte	17
2.2.2 Kulturbedingungen.....	21
2.2.3 Stimulation mit Wachstumsfaktoren.....	21
2.2.4 Elektrische Feldstimulation	21

2.2.5 RNA-, DNA-, Proteinsynthese und Gehalt	25
2.2.6 Bestimmung des mRNA-Gehalts mittels Dot Blot	26
2.2.7 Präparation der cDNA Proben	27
2.2.8 Analyse exprimierter mRNA.....	28
2.2.9 Verwendete cDNA-Proben	31
2.2.10 Histologie	33
2.2.11 HPLC von Adenosinphosphaten.....	33
2.2.12 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 MYOZYTENISOLIERUNG & KULTUR.....	35
3.1.1 Ergebnisse der Isolierung und Qualität der Zellen.....	35
3.1.2 Adulte Kardiomyozyten in Kultur.....	36
3.1 STIMULATION MIT WACHSTUMSFAKTOREN	39
3.2.1 Effekte von fetalem Kälberserum (FCS).....	39
3.2.2 Effekte des Insulin ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF).....	42
3.2.3 Effekte des Fibroblasten Wachstums Faktors (FGF).....	45
3.2.4 Effekte von Cardiotrophin ähnlichen Zytokinen	47
3.2.5 Effekte von ECGS allein und in Kombination mit IGF I&II.....	50
3.2.6 Effekte des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- β_1).....	53
3.2.7 Der Effekt einer Zugabe von TGF- β_1 auf Kulturen mit ECGS.....	55
3.2.8 Zusammenfassung der Wirkung von Wachstumsfaktoren.....	57
3.2.9 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die kontraktile Aktivität der Myozyten	59
3.3 ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION (EFS)	60
3.3.1 Verhalten der Zellen unter elektrischer Feldstimulation	60
3.3.2 Proteinsynthese und -gehalt bei elektrischer Feldstimulation.....	63
3.3.3 Marker myokardialer Hypertrophie.....	65
3.3.4 Wachstumsfaktoren und elektrische Feldstimulation.....	67

4. DISKUSSION	73
4.1 STIMULATION ZELLULÄREN WACHSTUMS	73
4.2 DAS MODELL DER ELEKTRISCHEN FELDSTIMULATION (EFS).....	79
4.3 VERGLEICH VON WACHSTUMSFAKTOR- UND ELEKTRISCHER FELDSTIMULATION.....	82
4.4 ZUSAMMENFASSUNG	83
5. LITERATUR	85
6. TECHNISCHER ANHANG	95
6.1 GEEIGNETE ELEKTRODENANORDNUNG.....	95
6.2 GEEIGNETES ELEKTRODENMATERIAL	98
6.3 DETAILLIERTE KONSTRUKTION DER ELEKTRODEN	99
6.4 DIE VERTEILUNG DES ELEKTRISCHEN FELDES BEI VERSCHIEDENEN ELEKTRODEN.....	101
6.5 DAS VOLUMEN DES MEDIUMS.....	102

Abkürzungsverzeichnis

- T ₃	Triiodothyronin	- PKC	Proteinkinase C
- TBP	T ₃ Bindungsprotein	- ATP	Adenosin Tri-Phosphat
- TR	T ₃ Rezeptor	- ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
- IL	Interleukin	- ARC	Adulte Rattenkardiomyozyten
- CT-1	Cardiotrophin-1	- BSA	Bovines Serum Albumin
- FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor	- CDF	Cholinerger
- IGF	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor		Differenzierungsfaktor
- TGF β	Transforming Wachstumsfaktor	- CNTF	Ziliärer Neurotrophischer Faktor
- CR	Zytokin Rezeptor	- cpm	Zerfälle pro Minute
- RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase	- ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
- RSTK	Rezeptor Serin/Threonin Kinase	- DEPC	Diethylpyrocarbonat
- JAK	Janus Kinase	- DNA	Desoxyribonukleinsäure
- Rac1	Mitglied der Rac Familie	- ECGS	Endothelzell Wachstumszusatz
- CDC42	Hefe Zellzyklusgen 42	- ECM	Extrazelluläre Matrix
- STAT	Signalleitungs und Aktivator der Transkription	- EDTA	Ethylendiamintetraacetat
- MEKK	MEK Kinase	- EFS	Elektrische Feldstimulation
- SEK	SAPK Kinase	- FCS	Fetales Kälberserum
- JNK	c-Jun N-terminale Kinase	- HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin- Ethan-Sulfonsäure
- SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase	- LIF	Leukämiezellen Inhibierender Faktor
- Ras	eine monomere GTPase (p21)	- MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
- Raf	eine MAPKKK	- NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
- MEK	Mitogen aktivierte ERK aktivierende Kinase	- NMDGF	Nichtmyozyten Wachstumsfaktor
- ERK 1/2	extrazellulär regulierte Kinase ERK1=p44; ERK2=p42	- NGF	Nerven Wachstumsfaktor
- PLC β/γ	Phospholipase-C	- PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
- PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5- biphosphat	- PCA	Perchloressigsäure
- AC	Adenylatzyklase	- PDGF	Plättchen Wachstumsfaktor
- cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	- RNA	Ribonukleinsäure
- DG	1,2-Diacylglycerol	- ssDNA	salmon sperm DNA
- IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat	- TCA	Trichloressigsäure
- PKA	Proteinkinase A	- Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan
		- VEGF	Vaskulärer Endothelzell Wachstumsfaktor

1 EINLEITUNG

Das Herz stellt als Zentrum unseres Kreislaufsystems durch seine Pumpfunktion eine ununterbrochene metabolische Versorgung und Entgiftung unseres Körpers sicher. Auf zellulärer Ebene sind es die Herzmuskelzellen, die diese Funktion bewerkstelligen. Verändern sich die Anforderungen an das Herz des Erwachsenen, ist es über weite Strecken in der Lage, sich an diese Bedingungen anzupassen. Dabei ist die Hypertrophie bei der Adaption des Herzens an Druck- oder Volumenbelastung, bei Verlust kontraktile Materials (myokardiale Infarzierung) oder bei erblichen Defekten von entscheidender Bedeutung, da die Teilung der Herzmuskelzellen in der Zeit nach der Geburt sistiert und als Regulativ nicht mehr zur Verfügung steht [2, 3]. Unter Hypertrophie kommt es zu spezifischen qualitativen Veränderungen in der Genexpression und des Zellphänotyps [4, 5]. Parameter hypertropher Zellwachstums sind die Zunahme des Myozytenvolumens, des Proteingehalts pro Zelle, eine erhöhte Proteinsynthese und eine Zunahme des mRNA- und rRNA-Gehalts. In der Summe bleibt ein Zugewinn zellulären Proteins [4, 6].

1.1 Die Entwicklung des ausdifferenzierten Myokards

In der Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems erfordert der sich verändernde, wachsende Organismus eine ständige Adaption des Herzens. Diese Phase ist durch die Anwesenheit einer Vielzahl von trophischen Faktoren gekennzeichnet, die über entsprechende Oberflächenrezeptoren und intrazelluläre Signalwege eine Anpassung gewährleisten. Die Herzmuskelzellen zeigen während der Entwicklung ein sogenanntes fetales Proteinexpressionsmuster, das in der Ratte mit der Dominanz der β -Isoform der schweren Kette des Myosins (β -MHC) [7, 8], der ventrikulären Expression von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) [9, 10] und einer Aktinisiform [11, 12] einhergeht, die für die Skelettmuskulatur und glatte Muskelzellen typisch ist (α -sm Aktin). In den Herzmuskelzellen läuft die Zellproliferation und Zytodifferenzierung in der fetalen Zeit gleichzeitig ab.

In der postnatalen Zeit stoppt die Zellteilung und es kommt mit zunehmender Differenzierung zu einem Wechsel von diesen fetalen Isoformen zum adulten Protein. Die Herzmuskelzelle hypertrophiert auf etwa das Zehnfache ihres Ausgangsvolumens. Die Volumenzunahme geht auf eine Akkumulation von kontraktile Proteinen zurück, die sich in dicht gepackten Sarkomerenbündeln in der Zelle befinden. Die Proteinsynthesekapazität wird stark eingeschränkt, es kommt zu einem fast vollständigen Verlust des endoplasmatischen Retikulums. Parallel zur Differenzierung der Myozyten entwickeln sich in deren Nachbarschaft Gefäße, die eine adäquate Versorgung der Zellen gewährleisten, ein

extrazelluläres Netzwerk aus verschiedenen Matrixproteinen und ein Reizleitungssystem, um eine geordnete und den Bedürfnissen angepasste Arbeit des Herzens zu ermöglichen.

Aufgrund der abgeschlossenen Differenzierung ist die adulte Zelle weniger abhängig von trophischen Faktoren als die Zellen des fetalen Herzens [13]. Auf molekularer Ebene zeigt sich das anhand der verminderten Expression der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die sich im fetalen Herzen nachweisen lassen. So ist die Expression des Rezeptors für FGF-2 im adulten Herzen im Vergleich zum fetalen Herzen auf ein Drittel reduziert [13]. Auch die Produktion einiger Wachstumsfaktoren wie FGF, LIF und Cardiotrophin [38] wird eingeschränkt, sie werden allerdings aktiviert, sobald sich ein Bedarf für ihre Wirkung ergibt.

1.2 Zellkultur von Herzmuskelzellen

Myozyten repräsentieren 70-80% des Herzmuskelvolumen, aber nur 20-30% der kardialen Zellen [14]. Fibroblasten, Neuronen und endotheliale Zellen stellen die weitaus größere Zahl dar. Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen modulieren die hypertrophe Reaktion. Daher ist man nicht in der Lage, die Wirkung von Wachstumsfaktoren einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen. Diese Schwierigkeiten umgeht man mit der Etablierung von adulten oder neonatalen Herzmuskelzellen in Kultur. Das Überführen der Zellen aus dem myokardialen Zellverband in die Zellkultur erfordert eine intrazelluläre, strukturelle Neugliederung der Zelle und auch die räumliche Anpassung an eine flache Kulturschale. Der Zellverband und die sehr enge Nachbarschaft zwischen den Zellen wird aufgelöst, die extrazelluläre Matrix geht verloren, die mechanische Last und kontraktile Aktivität fehlt zumindest vorübergehend. Diese abrupte Änderung kann die Zelle nur bewältigen, indem sie zumindest vorübergehend dedifferenziert. Das erfordert daher die Zugabe externer trophischer Faktoren, ohne die die Zellen innerhalb weniger Tage nach Etablierung der Kultur absterben.

Als Kultivierungsmedium eignen sich vor allem definierte Medien unter Zusatz von Serum, da Serum einen großen Teil dieser trophischen Faktoren enthält. Besonders wirkungsvoll ist die Zugabe von Seren, die aus fetalem oder neonatalem Blut von Rindern gewonnen wurden [15, 16]. Sie enthalten nahezu alle trophischen Faktoren, die zur normalen Entwicklung des Organismus notwendig sind. Auch Seren von Patienten, die eine organische (Herz-) Erkrankung haben, besitzen einen hohen Gehalt an trophischen Faktoren, allerdings ist in diesen Seren eher ein Ungleichgewicht oder nur eine spezifische Auswahl an Faktoren vorhanden, die der Adaption eine spezielle, der Krankheit entsprechende Gewichtung verleihen. So fand man in der perikardialen Flüssigkeit von Patienten mit instabiler Angina pectoris einen erhöhten Gehalt an FGF-2 [18]. Dabei konnte man den FGF-2 Gehalt in der

perikardialen Flüssigkeit als auch im Serum mit der linksventrikulären myokardialen Masse korrelieren [17].

Adulte Kardiomyozyten können sich in Anwesenheit von fetalem Kälberserum so an die Kultur anpassen, daß sie nach einiger Zeit wieder einen stabilen Zustand (steady-state) erreichen. Nach Abschluß dieser Dedifferenzierung verringert sich der Bedarf der Zellen für die Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Entzieht man diesen Zellen in einem Schritt die trophischen Faktoren, sterben sie innerhalb einiger Tage. Würde man einen schrittweisen Entzug über mehrere Tage, oder eine Verschiebung des Gleichgewichts durchführen, so kommt es zu einer graduellen Differenzierung der Zellen, wie es schon für verschiedene Zelltypen gezeigt wurde [19, 20]. Diese Zellen sind im Anschluß an die Reduktion des Serums stärker differenziert und nicht mehr abhängig von der Zugabe von trophischen Faktoren.

1.3 Wachstumsfaktoren

Die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf myokardiale Zellen wurde 1996 in einem Übersichtsartikel von Long [14] zusammengestellt (Tabelle 1.1-1.3). Dieser Bericht zeigt, daß myokardiale Zellen eine Reihe von Zytokinen exprimieren und daß zelluläres Wachstum durch die produzierten Stoffe stimuliert werden kann. Speziell Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF 1&2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β), Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF I&II), Leukämie inhibierender Faktor / cholinerges Differenzierungsfaktor (LIF/CDF), Vaskulärer Endothelzell Faktor (VEGF), Cardiotrophin-1 (CT-1) Myotrophin, Nichtmyozyten Wachstumsfaktor (NMDGF) und Interleukine (IL-1 und IL-6) wurden in frisch isolierten als auch kultivierten myokardialen Zellen gefunden. Zusätzlich zu diesen Zytokinen wurden auch neurohumorale und vasoaktive Peptide wie Endothelin 1 (ET-1), Angiotensin II (AT-II) und Catecholamine im Herzen nachgewiesen. Myokardiale Zellen scheinen daher sowohl Ursprung als auch Wirkungsort dieser wachstumsfördernden Substanzen zu sein.

In kardialen Myozyten wurden die meisten Zytokintranskripte unter verschiedenen Arten von zellulärem Stress wie Hypoxie, Hitzeschock, Katecholaminen und im Gefolge einer myokardialen Infarzierung gefunden [21-25]. Diese Stressoren gehen *in vivo* als auch *in vitro* häufig mit einer Expression fetaler Gene einher [26, 27]. Daher könnte die Expression von Zytokinen eine Rekapitulation der Wachstumsfaktorproduktion in der Entwicklung sein. Sie könnten zur Rekompensation der Herzfunktion nach Schädigungen beitragen.

Tabelle 1.1 Zytokinwirkung auf myokardiale Zellen

Zytokin	Ursprung	Hypertrophie	Referenz
FGF 1&2	MC/NMC	+	[28-33]
TGF- β (1-3)	MC/NMC	+	[30, 34]
NGF	NMC	+	[35, 36]
LIF (CDF)	NMC	+	[37, 38]
IGF I&II	?	+	[39]
PDGF	NMC	+	[30, 40]
Myotrophin	?	+	[41]
Cardiotrophin-1	MC	+	[38, 42]
NMDGF	NMC	+	[30]
IL-1	NMC	+	[43]
IL-6	MC	\pm	[44, 45]
TNF	NMC	+	[30, 46]
VEGF	MC/NMC	?	[23, 25]
CNTF	?	\pm	[38, 47]

Tabelle 1.2 Neurohumorale und vasoaktive Peptide und kardiale Hypertrophie

Peptid	Ursprung	Hypertrophie	Referenz
Endothelin I	MC/NMC	+	[39, 48]
Angiotensin II	MC	+	[39, 49]
Katecholamine	NMC	+	[50]

Tabelle 1.3 Mechanische Faktoren

Stimulus	Hypertrophie	Referenz
Stretch	+	[49, 51]
Elektrische Feldstimulation	+	[1, 52-54]

Hypertropher Effekt von Zytokinen, neurohumoralen und vasoaktiven Peptiden sowie von mechanischer Belastung (modifiziert nach Long 1996 [14]); (MC = Myozyten, NMC = nicht Myozyten). Hypertrophie war durch die Stimulation der Zellgröße, den Proteingehalt oder den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in einem *in-vitro* system definiert.

Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF). IGF-I (70 Aminosäuren) und IGF-II (67 Aminosäuren) sind strukturell und funktionell mit Pro-Insulin verwandt und werden durch Spaltung aus inaktiven Vorstufen freigesetzt [28]. Während IGF-I vor allem im adulten Organismus exprimiert ist, wird IGF-II vor allem während der fetalen Entwicklung gefunden. Die Wirkung von beiden Faktoren wird vorwiegend über den IGF-I Rezeptor (IGF-R) vermittelt. Dabei ist die Komplexbildung von IGF mit dem IGF-Bindungsprotein (IGFBP) für den Transport des Komplexes über die Membran wichtig und könnte die Interaktion der IGFs mit dem Rezeptor kontrollieren.

Kardiomyozyten exprimieren IGF I&II sowie deren Rezeptoren [29]. Sie zeigen eine erhöhte Proteinsynthese unter einer Stimulation mit Insulin, IGF-I und IGF-II [30-32]. Dabei ist IGF-I am ehesten mit einer Hypertrophieentwicklung assoziiert. Unter linksventrikulärer Hypertrophie in Folge eines systemischen Hochdrucks wurde eine erhöhte Transkription von IGF-I gefunden [33, 34]. Während einer Serum-induzierten Hypertrophie in Kardiomyozyten war auch der Rezeptor für IGF-I heraufreguliert [35]. Das könnte eine parakrine Wirkung von IGF-I im Herzen nahelegen. IGF-I stimuliert im Gegensatz zu IGF-II die Akkumulation von Inositol-Triphosphat (IP_3) und Inositol 1,4-Bisphosphat [30].

Es gibt bis jetzt keine Hinweise, daß eine der fetalen Isoformen von Myosin heavy chain oder Kreatinkinase unter der Stimulation mit IGF-I heraufreguliert sind. Die Expression von α -smooth muscle Aktin (α -sm Aktin) und ANF wurde durch eine Zugabe von IGF-I gehemmt [35, 37]. Die Expression von Muskel-spezifischen Genen wie der leichten Kette des Myosins (MLC-2), von Troponin I und oder skeletalem α -Aktin war dagegen in der Gegenwart von IGF-I erhöht [38].

Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF). FGF-1 (acidic FGF, 140 Aminosäuren) und FGF-2 (basic FGF, 154 Aminosäuren) sind Peptidhormone, die je nach Isoform eine Größe von 17 oder 22 kDa haben. Die höhermolekularen Formen werden vorwiegend in neonatalen Rattenherzen gefunden, sie werden über eine N-terminale Erkennungssequenz in den Zellkern geleitet. Die niedermolekularen Formen dominieren im adulten Herzen. Die Balance scheint mit steigendem Triiodothyronin-Spiegel (T_3) zugunsten der hochmolekularen Form reguliert zu werden [39]. FGF bindet an den FGF-Rezeptor 1 (FGF-R1). Er ist ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der eine Masse von 150 kD hat. Extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Bereiche binden FGF [44, 45].

Sowohl FGF1&2 als auch der FGF-R1 werden im Herzen synthetisiert [13, 40-43]. Während in fetalen Herzen viele Transkripte gefunden werden, sinkt deren Zahl im adulten Herzen. Im hypertrophen Herzen allerdings akkumulieren FGF 1&2 [40-42]. In isolierten adulten Kardiomyozyten wurde die Existenz von FGF-1, FGF-2 und auch des FGF-R1 durch Speir nachgewiesen [43]. Während die Proteine schon in frisch isolierten Myozyten gefunden

wurden, war die mRNA für FGF-2 als auch den FGF-R1 erst in kultivierten Zellen nachweisbar.

Der Sekretionsmechanismus von FGF 1&2 konnte bisher noch nicht geklärt werden. Sie besitzen im Gegensatz zu den meisten FGF's keine Signalsequenz, werden aber sezerniert und finden sich in der extrazellulären Matrix des Herzens wieder [46]. Im Gegensatz zur üblichen Sekretion über den ER/Golgi-Apparat legt die fehlende Signalsequenz von FGF für diesen Faktor einen alternativen Sekretionsweg nahe. COS-1 Zellen, die mit FGF-2 cDNA transfiziert wurden, sind in der Lage, FGF-2 über einen ER/Golgi-unabhängigen Prozess zu sezernieren [47]. Inhibitoren von Endo- und Exocytose blockieren seine Freisetzung [48, 49]. Zusätzlich wird auch eine intrazelluläre Wirkung diskutiert, bei der FGF-2 in den Zellkern transloziert wird und dafür die Zelle nicht verlassen muß [50]. Kaye et al. postulieren, daß es sich um transiente Membranlecks handeln könnte, die unter mechanischer Belastung auftreten [1].

FGFs fördern das Zellwachstums und blockieren die terminale Differenzierung in vielen Geweben [51]. Muskelvorläuferzellen (Myoblasten) stoppen ihre Proliferation und differenzieren zu Myotuben, wenn sie in Serum- und Wachstumsfaktor freiem Medium gehalten werden. Die Zugabe von FGF verhindert die terminale Differenzierung und fördert die Proliferation der Myoblasten, die dann später unter FGF-Entzug differenzieren [52, 53]. Diese Differenzierung wird irreversibel, wenn die Expression der FGF-Rezeptoren in den Myotuben herunterreguliert wird [53].

FGF-2 induziert im Herzen genauso wie andere Proteinkinase C-aktivierende Substanzen den fetalen Phänotyp, im besonderen das skeletale α -Aktin und ANF [29, 37]. Trotz dieses Effekts auf die Regulation spezifischer Gene kann weder FGF-1 noch -2 die Proteinsyntheserate in adulten Myozyten stimulieren [36].

Leukemia inhibitory factor (LIF), Interleukin-11 (IL-11). LIF ist ein Zytokin der IL-6-Familie [54, 55]. Es ist nach seiner Fähigkeit benannt, die Proliferation der leukämischen Zelllinie M1 zu behindern und deren Differenzierung zu induzieren [56]. LIF fördert auch das Überleben und die Proliferation anderer Zelltypen [54, 55, 57]. Die Wirkung von LIF und IL-11 wird über spezifische Rezeptoren vermittelt. Interleukin 11 interagiert mit dem IL-11-Rezeptor, LIF bindet sowohl an den eigenen LIF-Rezeptor als auch an den IL-11-Rezeptor.

In einem Modell mit neonatalen Rattenmyozyten hatten Pennica et al. [58] die Wirkung von LIF und IL-11 getestet. Auf einem Score von 3-7, auf dem 3 keine Hypertrophie und 7 maximale Hypertrophie darstellt (wie etwa unter 0,1 nM Phenylephrin) hatte die Zugabe von 2,5 nM LIF einen Score von 6, IL-11 in einer Konzentration von 2,0 nM einen Score von 5,5 erreicht.

Transformierender Wachstumsfaktor β_1 (TGF- β_1). Dieses Zytokin gehört in eine Familie von Wachstumsfaktoren, die in Säugern drei strukturell homologe Dimere (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3) umfaßt und die in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche Aktivitäten entfalten [59, 60]. Das in unseren Versuchen verwendete TGF β_1 ist zu 70-80% mit den anderen Familienmitgliedern homolog. Es wird als Aminosäurevorstufe mit 390 AS synthetisiert und dann in ein N-terminales und C-terminales Segment gespalten. Das aktive TGF- β ist ein Dimer mit einer Masse von 25 kDa. Es bindet primär an den Typ-II-Rezeptor, der daraufhin mit dem Typ-I-Rezeptor dimerisiert und das Signal in die Zell fortleitet.

Kultivierte neonatale und adulte Myozyten sezernieren TGF- β vom ersten Tag an in das Kulturmedium [65, 66]. Sie exprimieren sowohl TGF- β [61-63] als auch dessen Rezeptoren [64]. Unter kardialer Hypertrophie [67] als auch unter Stimulation mit Angiotensin II [68] ist die mRNA für TGF- β aufreguliert. Massague et al. [69] zeigten, daß TGF- β die Differenzierung myogener Zelllinien inhibiert. Es inhibiert die Proliferation von neonatalen Kardiomyozyten und die Proteinsyntheserate von skeletalen Myoblasten [70]. Trotzdem könnte TGF- β eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteinsynthese in adulten Kardiomyozyten spielen, da TGF- β die Stimulation des β -Adrenorezeptors an die Proteinsynthese koppelt [66].

1.4 Mechanische Aktivität

Die Deformation des Kardiomyozyten, wie sie *in vivo* unter bei der Kontraktion, oder *in vitro* unter artifiziellen Bedingungen vorkommt, ist ein mechanischer Streß für die zellulären Strukturen. *In vivo* stellt die hämodynamische Überlastung einen wichtigen Grund für eine erhöhte myokardiale Proteinsynthese dar. Passive Dehnung der Zellen *in vitro* ruft eine Vielzahl an Reaktionen hervor, die zu zellulärer Hypertrophie und struktureller Neugliederung führen [71]. Daher könnte mechanische Aktivität ein wichtiger physiologischer Stimulus für die Entwicklung einer Hypertrophie sein.

Dehnung. Die mechanische Dehnung von neonatalen Myozyten verursacht eine Erhöhung der Proteinsynthese und des RNA-Gehalts [72, 73]. Sie aktiviert eine autokrine Kaskade in den Kardiomyozyten, die dann die hypertrophe Antwort auslöst [74]. In diesem Zusammenhang scheint Angiotensin-II (AT-II) ein wichtiger Mediator zu sein, da die Blockade des AT-II Rezeptors die Zunahme der Proteinsynthese hemmt [75].

Allerdings wurde gezeigt, daß AT-II nur zum Teil für die durch Dehnung induzierte Hypertrophie verantwortlich ist [76]. In adulten Ratten- und Katzenmyozyten scheint AT-II für die anabolen Prozesse unter mechanischer Last nicht erforderlich zu sein [77]. In Mäusen kann eine akute Drucküberlastung auch dann eine Hypertrophie hervorrufen, wenn der Angiotensin Rezeptor Typ 1a nicht exprimiert (ausgeknockt) ist [124]. Mechanische Dehnung könnte daher mehrere Signalwege in ventrikulären neonatalen Myozyten aktivieren, die sich gegenseitig zumindest zum Teil ersetzen könnten.

Elektrische Feldstimulation. Piper et al. [78] untersuchten 1982 die Wirkung von elektrischer Feldstimulation auf kultivierte adulte Kardiomyozyten. Dazu verwendeten sie Platinelektroden in einem Abstand von 20 mm und stimulierten die Zellen mit einer Impulsdauer von 0,5 ms über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden (siehe auch Abbildung 6.1). In diesem Modell erreichten sie Kontraktionsraten von > 90% im Feld zwischen den Elektroden.

Diese zeitliche Limitierung auf etwa 4 Stunden war die Ursache für weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet, deren Ergebnisse von Berger et al. publiziert wurden [1, 79]. Sie nahmen große Zellkulturflaschen mit 175 cm² Grundfläche, an deren Längsseite runde Graphitelektroden mit einem Durchmesser von 0,25 inch angebracht waren. Sie erreichten mit einer Frequenz von 3 Hz im Zeitraum von 6-72 h nach Isolierung bei 75-80% der Zellen synchrone Kontraktionen, dieser Anteil sank auf etwa 50% nach 7 Tagen Kultur. Sie untersuchten mit diesem Modell den Mechanismus der unter EFS ausgelösten

Proteinsyntheseerhöhung und postulierten, daß die Freisetzung von FGF-2 über eine autokrine Stimulation zur Hypertrophie der Zellen führt [1].

1.5 Interaktion von Wachstumsfaktoren

Es gibt experimentelle Untersuchungen, die eine Interaktion der verschiedenen Wachstumsfaktoren auf Ebene der Signaltransduktion nahelegen (Abbildung 1.1). Im Kontext der Sarkomerogenese sind IGF-I und FGF-2 Gegenspieler in der Regulation des Sarkomeraufbaus [37]. In serumhaltigen Kulturen von adulten Kardiomyozyten fördert IGF-I die Sarkomerogenese und supprimiert die Expression von atrialem natriuretischen Faktor (ANF). FGF-2 dagegen hemmt den Aufbau des Sarkomers und erhöht die Expression von ANF. Dabei ist etwa 1 nM T₃ für die Wirkung von FGF-2 und IGF-I Voraussetzung. In dieser Konzentration regulieren diese Wachstumsfaktoren differentiell die Expression von α -sm Aktin [80, 81].

Ein anderes Beispiel ist TGF- β . Es reguliert bei alleiniger Gabe weder in neonatalen noch adulten Kardiomyozyten die Proteinsynthese oder das Zellwachstum [66, 82]. Erst die Kombination von TGF- β mit Isoproterenol führt zu zellulärer Hypertrophie [66].

An neuronalen Zellen des Huhns wurde für das FGF-2 gezeigt, daß ausschließlich die Kombination von FGF-2 mit Depolarisation und / oder Laminin das Überleben von Zellen in Kultur ermöglicht [83]. Keiner der Faktoren zeigt als alleiniges Stimulans diesen Effekt. Diese Daten zeigen, daß verschiedene hypertrophische Stimuli zusammenwirken, um eine Vielzahl von morphologischen und biochemischen Phänotypen hervorzubringen.

1.6 Ziel meiner Arbeit

Die einzelnen, in Kulturen von adulten Kardiomyozyten identifizierten hypertrophen Stimuli, sind wahrscheinlich *in vivo* und auch während einer kompensierten Hypertrophie im Gleichgewicht. Die Veränderung der Expression einzelner Faktoren kann jedoch dieses Gleichgewicht ins Wanken bringen und zu einer Verschlechterung der Situation führen. Die Erforschung der zellulären Reaktion auf individuelle hypertrophische Stimuli ist eine wichtige Grundlage, da etablierte als auch neue therapeutische Strategien in der Kardiologie entweder die Verstärkung oder die Blockade der Wirkung von Wachstumsfaktoren verfolgen.

Das Ziel meiner Arbeit war daher die Beschreibung der Wirkung humoraler und mechanischer Stimuli auf die Regulation der Zelladaption von Kardiomyozyten im Anschluß an die Etablierung einer Kultur und die Identifikation hypertroph wirkender Stimuli. Dazu sollte eine Auswahl an Wachstumsfaktoren an Kulturen von adulten kardialen Myozyten der

Ratte getestet werden, die Morphologie beschrieben und vergleichende Untersuchungen zum Proteinumsatz durchgeführt werden. Basierend auf der Beobachtung, daß sich die Dedifferenzierung der Zellen nach Einsetzen von spontanen Kontraktionen beschleunigt, sollte der Einfluß von Kontraktionen auf diese Prozesse untersucht werden. Dazu wurde ein System etabliert, das erlaubt, kultivierte Zellen über mehrere Tage oder Wochen mittels eines elektrischen Feldes zu stimulieren. Ob es durch diese mechanische Aktivität zur Hypertrophie kommt und ob für die beobachteten Veränderungen Wachstumsfaktoren verantwortlich sind, sollte dann anhand der Messung von Protein- und RNA-Synthese / Gehalt als auch auf transkriptioneller Ebene durch Northern-Blot-Hybridisierungen für Wachstumsfaktoren-Transkripte untersucht werden.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellisolierung

- Isolierungspuffer
 - 110 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 1,2 mM KH_2PO_4
 - 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 25 mM HEPES
 - 11 mM Glucose
 - pH 7,4

- Kochsalzlösung
 - 154 mM NaCl in Aqua dest.

- Kollagenasestammlösung (1:10)
 - 30 mg Kollagenase (Worthington)
 - 40 μl 100 mM Ca^{2+} -stock
 - 10 ml Isolierungspuffer

- Ca^{2+} -Stock
 - 100 mM CaCl_2

- BSA-Stock
 - 0,2 g fettsäurefreies BSA / ml Isolierungspuffer

2.1.2 Zellkultur

- ACCITT-Zellkulturmedium
 - M199 mit Earle's Salz
 - 1,3 mM Glutamin
 - 5 mM Creatin
 - 2 mM L-Carnitin
 - 5 mM Taurin
 - 2,5 mM Pyruvat
 - 100 U/ml Penicillin / Streptomycin
 - pH 7,4

• Phosphatpuffer	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,9 mM CaCl_2	pH 7,4
• Hybridisierungspuffer	5 ml ddH ₂ O 2 ml 5 M NaCl 0,5 ml 50%iges Dextransulfat 1 mg salmon sperm DNA	
• Guanidinium Puffer	4 M Guanidiniumisothiocyanate 25 mM Natriumzitat, pH 7,0 0,5 % Sarcosylsarcosyl 0,1 M 2-Mercaptoethanol	
• CI	Chloroform / Isoamylalkohol (49 : 1)	
• PCI	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) mit 100 mM Tris-HCl. pH 8 gesättigt	
• TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA	
• 50 x TAE	2 M Tris 1 M Na-Azetat 50 mM EDTA	
• 20 x TBE	1 M Tris-HCl, pH 7,5 1 M Borsäure 20 mM EDTA	
• 20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Zitrat	pH 7,0

-
- DEPC-H₂O 100 µl DEPC pro l H₂O, über Nacht gerührt
2x autoklaviert

 - 10x MOPS 0,2 M MOPS
50 mM Na-Azetat
10 mM EDTA pH 7,0

 - RNA-Probenpuffer (5x) 3,75 ml deionisiertes Formamid, pH 7,0
0,75 ml 10x MOPS
1,2 ml Formaldehyd 37°C
0,5 ml DEPC-H₂O
0,5 ml Glycerol
0,4 ml Bromphenolblau 10%

 - Hybridisierungspuffer 10 ml deionisiertes Formamid
4 ml NaCl (5 mM)
4 ml Probenpuffer (5x)
1 ml Dextransulfat 50%
2 mg aufgekochte ssDNA

 - LB-Medium 10 g / l Bacto-Pepton
5 g / l Bacto-Yeast Extrakt
10 g / l NaCl; pH 7,5
als Selektionsmedium mit 40 µg / ml Ampicillin

 - LB-Agar LB-Medium, mit 15g / l Agarose Agar

2.1.4 Histologie

- Antikörper monoklonaler Antikörper gegen α -Actinin
biotinylierter anti-Maus-Antikörper (Esel)
Streptavidin-Cy 2

2.1.5 Versuchstiere

- Wistar-Ratten - *eigene Zucht*

2.1.6 Bezugsquellen

Allgemeine Chemikalien wurden von den Firmen *Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg; Fluka, Neu Ulm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Gibco BRL, Gaithersburg / USA; Sigma, St. Louis / USA* bezogen. Radioaktiv markierte Nukleotide wurden von *Amersham / Großbritannien* bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von adulten Kardiomyozyten der Ratte

Zur Isolierung der Myozyten fand eine modifizierte Langendorff-Perfusionsapparatur (Eigenbau) Verwendung, die in ähnlichem Aufbau schon von Powell [84] und Piper [85] beschrieben worden war. Sie gewährleistet während des Experiments eine konstante Temperatur von 37°C, bietet durch einen verschließbaren Auffangbecher eine Art "Klimakammer" für das Herz, äquilibriert den Puffer vor und während der Isolierung mit Carbogen (95% O₂ - 5% CO₂) und gewährleistet die Konstanz des pH's. Es lassen sich an ihr zwischen einem und vier Herzen gleichzeitig perfundieren, was je nach Bedarf zur Anwendung kam.

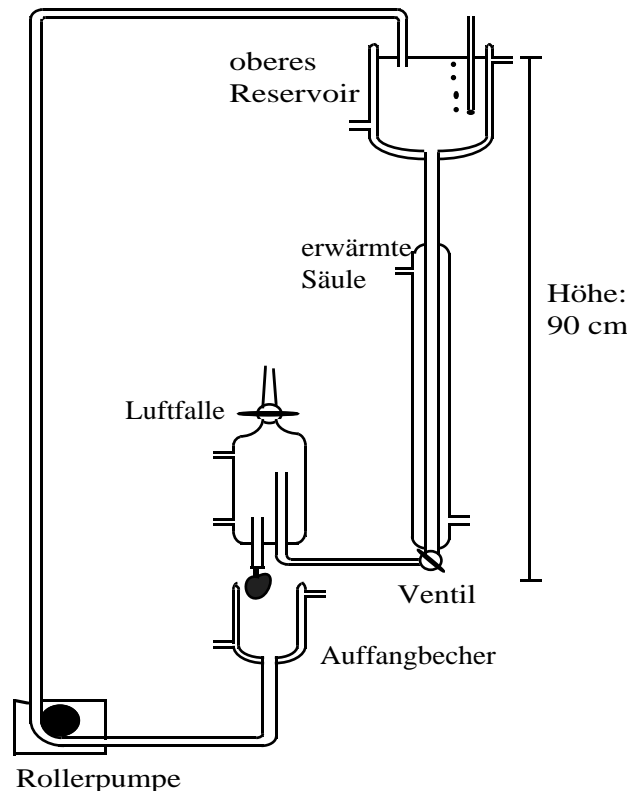


Abbildung 2.1 Perfusionsapparatur, modifiziert nach Powell und Piper [84, 85]. Die 90cm hohe Säule bietet einen konstanten Perfusionsdruck für das Herz und wird mittels einer Flußregulierung reguliert. Unter Zwischenschaltung einer Luftfalle werden dann die Koronarien mit diesem Druck perfundiert. Die Rollerpumpe befördert die Enzymlösung zurück in das obere Reservoir, in dem es begast und angewärmt wird und damit zur Reperfusion zur Verfügung steht.

Im oberen Reservoir befindet sich die Enzymlösung. Sie steht über eine 90 cm hohe, gewärmte Säule mit einem Luftfänger in Verbindung, an dem sich die Kanüle zur Perfusion des Herzens befindet. Dieser Aufbau generiert einen Druck von 90 cm Wassersäule, der mit einer Flußregulierung gesteuert werden kann. Der Auffangbecher unterhalb des Herzens dient zur Rezirkulation der Enzymlösung, sowie durch einen Verschuß des Bechers mittels Parafilm als Klimakammer, so daß das gesamte Herz während der Perfusion eine Temperatur von 37,5°C aufweist.

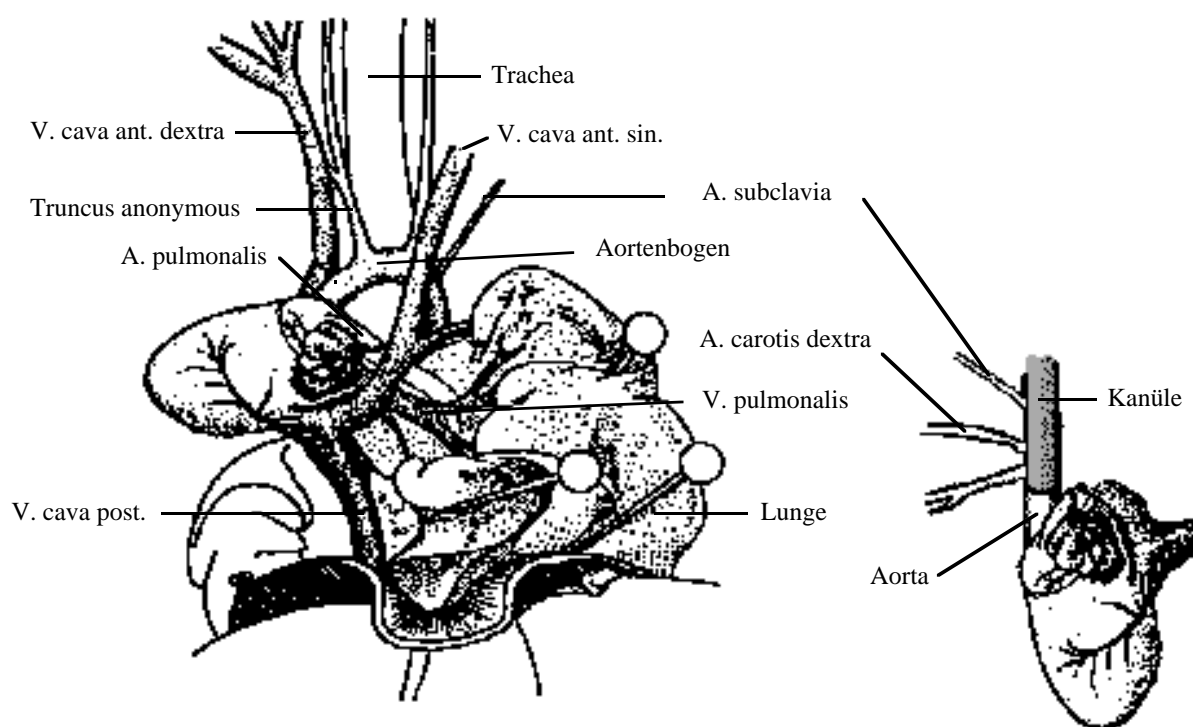


Abbildung 2.2 Situs nach Eröffnung des Thorax. Zur Entnahme werden die Gefäße zuerst distal am Zwerchfell, dann proximal am Hals durchtrennt und der gesamte Mediastinalinhalt entnommen. Das Herz wird dann in der eiskalten Salzlösung freipräpariert und für die Kanülierung vorbereitet. Auf der rechten Seite sieht man die optimale Positionierung der Kanüle

Vorbereitung. Zu Beginn einer Isolierung wurde das Wärmebad eingeschaltet und mit der Begasung der Puffer begonnen. Der Alkohol, mit dem das System zur Aufbewahrung gefüllt ist, wurde mit Aqua dest. ausgewaschen und die Apparatur vor der Isolierung noch einmal mit dem Isolierungspuffer gespült. Anschließend wurde das System mit Puffer gefüllt und das obere Reservoir begast. Bei der Befüllung war darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen im System befanden, um mit den Blasen keine Gewebsareale zu embolisieren.

Organentnahme. Eine etwa 250g schwere Ratte wurden mit Äther narkotisiert. Reagierte sie nicht mehr auf Schmerzreize, wurde der Thorax eröffnet und das Herz mit dem gesamten Mediastinalinhalt entnommen. Man umfaßte zur Entnahme des Herzens mit der linken Hand den gesamten Mediastinalinhalt, trennte die nach distal laufenden Strukturen wie Vena cava, die Aorta und den Ösophagus ab, hob dann das Herz an und trennte auch die proximalen Verbindungen. Dadurch erhielt man ein Bündel, das neben dem Herzen sowohl die Lungen als auch den Thymus enthielt, und gab es in ein mit eiskalter Kochsalzlösung gefülltes Gefäß. Das Herz schlug zu dieser Zeit noch kräftig und trieb das Blut aus dem Kapillarbett und den Ventrikeln und verhinderte so eine Thrombosierung der Koronargefäße. Die Herzaktion sistierte in der kalten Salzlösung nach einigen Sekunden. Nach dem Auswaschen des Blutes im ersten Gefäß wurde das mediastinale Gewebe vom Herzen abgetrennt und das Herz in die zweite Schale überführt. Die Aorta fand sich unmittelbar hinter dem glasig aussehenden Thymus. Zur Präparation trennte man die beiden Lappen des Thymus mit den Forceps-Zangen voneinander und sah die Aorta auf der linken, die A. pulmonalis auf der rechten Seite. Die Aorta zieht um die Arteria pulmonalis herum nach distal und läßt sich von proximal aus gut verfolgen und freilegen.

Präperfusion. Die Perfusion wurde mit 1 Tropfen / sec / Kanüle gestartet. Während die Herzen in der Kochsalzlösung schwammen, wurde das Lumen der Aorta mit zwei Forceps-Zangen geöffnet, das Herz angehoben, die Aorta über die Kanüle gestülpt und gerade so weit vorgeschoben, bis sie den Abgang des Truncus anonymus passiert hatte (siehe Abb. 2.2). Die Kanüle sollte also die Gefäße des Aortenbogens verschließen, durfte aber weder die Koronarien verlegen, noch die Aortenklappe penetrieren. In dieser Position wurde die Aorta mit einer Krokodilklemme fixiert, anschließend durch eine Ligatur gesichert und pro Herz mit ungefähr 2 Tropfen / sec präperfundiert (10 ml / min). Die etwa 3 min dauernde Präperfusion diente zum Auswaschen des restlichen Blutes und der Erniedrigung des extrazellulären Calcium-Spiegels.

Perfusion. Indem man den Auffangbehälter unter die Herzen schob, hochzog und mit Parafilm verschloß, wurde das System auf Reperfusion umgestellt. 10 ml der Kollagenasestammlösung gab man zum oberen Reservoir und das Puffervolumen wurde auf ein Endvolumen von 100 ml ergänzt. In den nun folgenden 30 Minuten wurde das Herz mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 Tropfen / sec perfundiert. Während dieser Zeit wies das Herz eine homogene Färbung auf, die auf eine gleichmäßige Perfusion des Gewebes hindeutete.

Nachverdau. Man nahm das Herz von der Perfusionsapparatur, indem man die Ventrikel an der Klappenebene von den Vorhöfen trennte und in 2-4 Stücke teilte. Diese Stücke wurden in einer Zellkulturschale, die 10 ml Kollagenaselösung enthielt, mit 2 Skalpellen klein geschnitten und in den vorbereiteten Glasbecher gegeben, der mit 20 ml Kollagenaselösung und 4 ml BSA-Stammlösung gefüllt war. Die kontinuierliche Begasung mit Carbogen stellte die Sauerstoffversorgung der Zellen sicher und sorgte für eine mechanische Unterstützung der Verdauung. Während einer 10-15 min dauernden Inkubationszeit wurde der Verdau regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt.

Zellanreicherung. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonsieb dekantiert und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Nach anfänglichem Abzentrifugieren der Enzymlösung wurden die Zellen in Isolierungspuffer mit steigendem Calcium-Gehalt von 200 μM und 500 μM gewaschen, anschließend in einer 1 mM Calcium-Lösung resuspendiert und auf den 4 %-igen Albumingradienten geschichtet. Der Albumingradient wurde 1 min bei 15g zentrifugiert und die Zellen noch einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Nach Abschluß der Waschschrirte wurden die Zellen pro Herz in 60 ml Medium resuspendiert.

Myozytenzählung. Zur Zählung der Myozyten wurde ein Mikroskop verwendet, in dessen Okular ein Feld definierter Größe eingeschliffen ist. Man zählte jeweils 10 dieser Felder aus, um die Anzahl der Myozyten, sowie das Verhältnis von intakten zu abgerundeten Zellen zu bestimmen.

Trypanblaufärbung. Die Intaktheit der Myozyten und ihrer Membran wurde mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau bestimmt. Mischte man die Farbstofflösung in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit dem Medium, konnten Myozyten mit starken Schäden an der Zellmembran diesen Farbstoff nicht mehr ausschließen, es kam zu einer Blaufärbung der Zellen.

Sarkomerenlänge. Zur Messung der Sarkomerenlänge wurden mittels eines Auflichtmikroskops Bilder von der Querstreifung der Myozyten und eines Eichmaßes angefertigt. Dabei wurde die Länge von mindestens 30 Sarkomeren mit einem elektronischen Mikrometer gemessen und die Länge mit Hilfe des Eichmaßes umgerechnet.

2.2.2 Kulturbedingungen

Es wurde unterschieden zwischen Kulturen zur Stimulation mit Wachstumsfaktoren (WF) und Kulturen zur elektrischen Feldstimulation (EFS). Am Vorabend eines Versuchstages wurde Laminin in einer Konzentration von 5 (EFS) bzw. 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (WF) auf die Schalen aufgetragen, fein verteilt und im Brutschrank über Nacht inkubiert (80 $\mu\text{l} / \text{cm}^2$ Laminin). Vor Versuchsbeginn saugte man das Laminin ab, die Schale wurden zweimal mit Medium gewaschen und die $4,5 \times 10^6$ Zellen eines Herzens, in 60 ml Medium resuspendiert und auf einer Fläche von etwa 225 cm^2 ausplattiert (2×10^4 Zellen / cm^2). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C waren die länglichen Myozyten angeheftet. Alle nicht angehefteten Zellen wurden in den nun folgenden Waschschrinen abgehoben.

2.2.3 Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Zur Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden die Zellen nach der Isolierung einen Tag ohne Zusatz kultiviert. Am folgenden Morgen wechselte man das Medium. Die Wachstumsfaktoren wurden aus den Stammlösungen entnommen und in das frisch gewechselte Medium pipettiert. In der Folge wurde das Medium alle 48 Stunden ausgetauscht.

2.2.3 Elektrische Feldstimulation

EZIN™ Stimulationskammer (Eigenbau)

Material: EZIN™ 75 cm^2 Zellkulturschalen - *Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich, BRD*
 2 Graphitelektroden 0,25" - *Ladd Research Industries, Burlington VT, USA*
 Plexiglasdeckel - *Cadillac, Frankfurt, BRD*
 Teflonfüße, Messinganschlußstücke
 Platin-Iridiumdraht
 Steckverbindungen

Die größere der beiden Kammern (Abb. 2.3) basierte auf EZIN™ 75 cm^2 Schalen von Nunc. Sie diente zur Kultivierung größerer Zellmengen, wie sie zur Isolierung von RNA und Proteinen notwendig war.

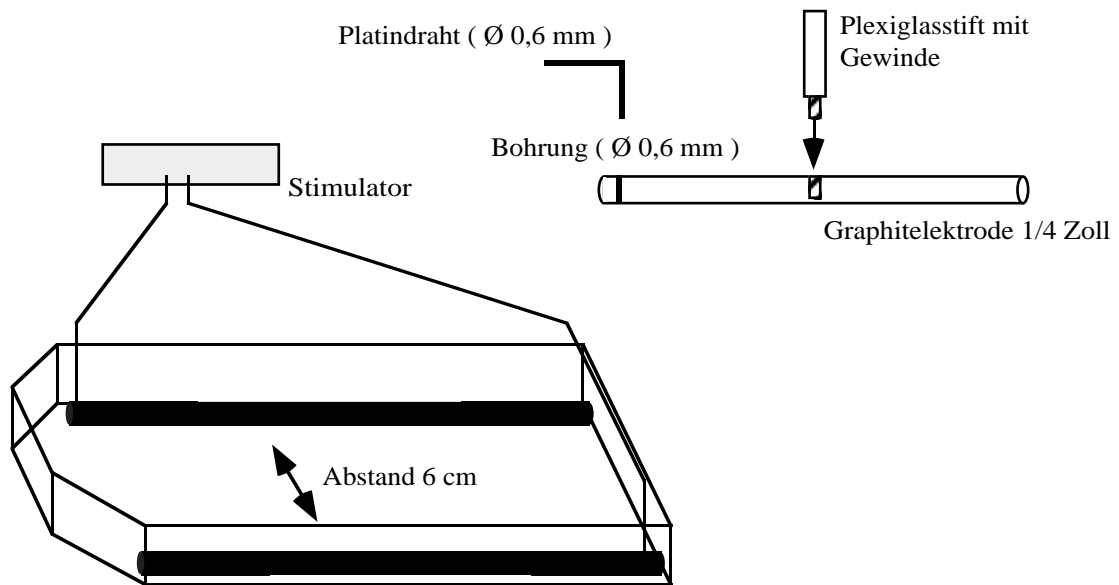


Abbildung 2.3 Aufbau der großen Stimulationskammer, modifiziert nach Berger et al. [79]. Durch die Verwendung von zwei langen Graphitstäben wird die gleichmäßige Stimulation der gesamten Schale ermöglicht. Diese Anordnung erlaubt entweder die direkte Kultur von Zellen, um damit molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen oder die Einlage von Objektträgern für immunhistochemische Anfärbungen.

Die Graphitelektroden waren 0,6 cm dick und 9 cm lang. Sie befanden sich an den Längsseiten der 75 cm²-Schale (12 cm lang und 7,2 cm breit). Der Abstand zwischen den Elektroden betrug 6 cm. An den gegenüberliegenden Enden der Elektroden befand sich jeweils eine Bohrung, in die der Platindraht (Ø 0,6 mm) als Verbindung zum Stimulator eingelassen war. Dieser Platindraht war mit dem Stimulator verbunden. Die Elektroden waren über Halterungen an einen Plexiglasdeckel geschraubt und erlaubten dadurch eine einfache Handhabung der Elektroden.

QUADRIPERM™ Stimulationskammer (Eigenbau)

- Material: QUADRIPERM™ Kulturschalen - *Heraeus Instruments GmbH, Hanau, BRD*
 8 Graphitelektroden, 0,25", 2,2 cm Länge - *Ladd Research Industries, USA*
 Plexiglasbügel - *Cadillac, Frankfurt, BRD*
 Platin-Iridiumdraht
 Steckverbindungen

Die kleinere Ausführung (Abb 2.4) basierte auf QUADRIPERM™-Schalen der Firma Heraeus (4 x 21,6 cm²). Die einzelnen Tröge waren 2,7 cm breit und 8 cm lang. Durch diese

Aufteilung erlaubten sie die Messung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese und Gehalt, sowie die Stimulation von Myozyten auf eingelegten Glasobjektträgern. Die Gesamtfläche von vier Trögen entsprach in etwa der einer 75 cm²-Schale. Die Stimulation dieser Schalen bedurfte allerdings im Vergleich zur EZINTM-Schale einer höheren Spannung, da die einzelnen Tröge in Reihe geschaltet wurden.

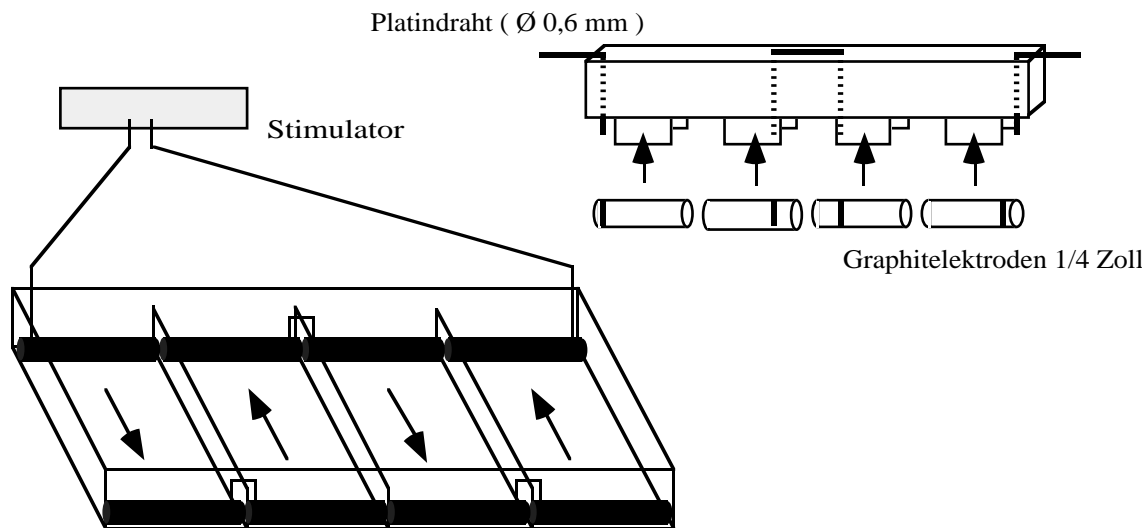


Abbildung 2.4 Aufbau der kleinen Stimulationskammer, modifiziert nach Kato et. al. [86]. Der Vorteil dieser Kammer liegt in den vier getrennten Trögen, die von der Menge her für Synthesemessungen ausreichend sind und neben einer Kontrolle 3 verschiedene Experimente erlauben. Auch hier lassen sich vier Objektträger für histochemische Untersuchungen einlegen.

Auf die genaue Konstruktion der Stimulationskammern wird im **Technischen Anhang (Kapitel 6)** näher eingegangen. Er ist als Ergänzung zu diesem Kapitel zu sehen und dient zur genaueren Orientierung.

Beschreibung des verwendeten Stimulators. Bei der Konstruktion des Stimulationsgeräts für die elektrische Feldstimulation wurde mit der Firma *Heinemann, Kelkheim* ein Stimulationsgerät entwickelt.

- Es bestand eine Wahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Stimulationsfrequenzen zwischen 1 und 10 Hz und erlaubte die Einstellung einer Impulsdauer von 1 bis 10 ms.
- Der Stimulationsimpuls war von wechselnder Polarität. Dabei war der Impuls selbst monophasisch und rechteckig.
- Die Restspannung während der Impuls-freien Zeit war auf ein Minimum beschränkt, um die Elektrolyse zu minimieren und keine Ladung zwischen den Elektroden aufzubauen.
- Es war in der Lage, insgesamt vier Schalen zu betreiben.

-
- Eine Anzeige des Stimulationsstroms, um die Höhe des Schwellenwerts für die elektrische Stimulation zu bestimmen. Diese Anzeige war zwischen beiden Kanälen umschaltbar und zeigte entweder die Spannung in Volt oder den fließenden Strom in mA an.
 - Eine Kontrolldiode erlaubte die Überwachung der Stimulation von außerhalb des Brutschanks.

Versuchsaufbau. Fünf Stunden nach Ende der Isolierung wurde das Medium gewechselt und die Elektroden in die Schale eingesetzt. Nach einer weiteren Stunde wurde die Schale an das Stimulationsgerät angeschlossen und der Erfolg der Stimulation unter einem Auflichtmikroskop betrachtet. Dabei sorgte eine Rotlichtlampe für eine konstante Temperatur von 37°C. Zur Bestimmung der Stimulationsschwelle erhöhte man die Spannung von null anfangend soweit, bis etwa 50% der Zellen in der Schale den Stimulationsimpulsen folgten. Die "Endstromdichte" erreicht man, indem man die Spannung um weitere 10 % erhöhte. Diese Spannung wurde dann über die gesamte Zeitdauer des Experiments beibehalten. Die Impulsbreite betrug 5 ms, die Frequenz 2,5 Hz.

2.2.5 RNA-, DNA-, Proteinsynthese und Gehalt

Markierung und Aufbereitung der Proben. Die Zellen wurden zur Synthesemessung in Gegenwart radioaktiver Metabolite kultiviert. Dabei fanden die elektrisch stimulierten Kulturen aus den QUADRIPERM™-Schalen (4 Tröge) Verwendung. Die Messungen der Kulturen mit Wachstumsfaktoren fanden in den 6-Tröge-Platten statt. Dazu wurde für die Messung der RNA-Synthese ³H markiertes Uridin zum Medium zugegeben und die Zellen für weitere 2 h kultiviert. Für Proteinsynthese-Messungen wurden die Zellen für 4 h in Gegenwart von ³H Phenylalanin inkubiert. Die Radioaktivität betrug 2,5 µCi pro ml Medium. Nach dem Ende der Markierungszeit wurde jeder Trog zweimal mit 3 ml Hanks gepufferter Salzlösung gewaschen, eine Stunde lang mit 2,5 ml eiskalter 10 % - iger Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und anschließend zweimal mit 2 ml 10 % TCA gewaschen. Es folgte nun ein dreifacher Waschschrift mit 95% Ethanol, an den sich eine 10-minütige Trocknung bei 37°C anschloß. Dann wurden die Zellen mit 700 ml 0,3 N NaOH lysiert und 40 min bei 55°C inkubiert. Durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren wurden die Proteine aus der Schale gelöst, in ein Eppendorff-Tube überführt und 15 sec gut gemischt. Aliquots dieser Probe fanden in den nun folgenden Messungen Verwendung.

DNA-Gehalt. Die DNA-Messungen erfolgten nach der Methode von Cesarone [87]. Dazu stellte man eine Verdünnungsreihe her, die 0 - 32 µg in Aqua dest. gelöste DNA enthielt und das Volumen mit 0,3 N NaOH auf 282 µl ergänzt. Die Proben wurden anschließend mit 1,4 ml eiskalter EDTA-Lösung versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Sie wurden auf Eis abgekühlt und mit 100 µl 1 M KH₂PO₄ versetzt. Nach gutem Mischen wurde 1,5 ml Bisbenzimidine-Lösung zu jeder Probe gegeben. Die Fluoreszenz wurde in einem Spektrofluorometer (Perkin-Elmer) bei einer Excitation von 350 nm, einer Emission von 455 nm und einem Split von 10 nm bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf den Standard bezogen und der DNA-Gehalt im linearen Bereich mittels Dreisatz bestimmt.

RNA-Gehalt. 750 µl der Probe wurden mit 250 µl 4 N PCA gemischt, bei 4°C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorff überführt. Die Absorption des Überstands wurde in einer Quarzglas-Küvette bei 232 und 260 nm Wellenlänge gemessen. Der RNA-Gehalt errechnete sich aus:

$$\text{RNA (mg / ml)} = 32,9 \times A_{260} - 6,11 \times A_{232}$$

Protein-Gehalt. Die Messung des Protein-Gehalts wurde mit dem Kit von Bio-Rad (Bio-Rad DC Protein Assay Katalog-Nr. 500-0112) durchgeführt.

RNA- und Protein-Synthese. Ein Aliquot von 100 μl der Probe wurde zu 3 ml eines Scintillation-Cocktails gegeben und gut durchmischt. Die Radioaktivität wurde in einem Beta-Counter für 2 min gezählt und auf den DNA-Gehalt bezogen.

2.2.5 Bestimmung des mRNA Gehalt mittels Dot Blot

Das verwendete System. Für die Dot-Blots wurde der Minifold II von Schleicher & Schuell verwendet. Dazu wurden zwei Bögen S&S Papier auf die Filterträgerplatte gelegt, der Filter mit 10x SSC-Lösung befeuchtet und blasenfrei auf die Unterseite der Probenbehälterplatte gelegt. Nach dem Zusammenbau der Apparatur (Abbildung 2.6) fixierte man sie mit Hilfe der U-förmigen Seitenklammern.

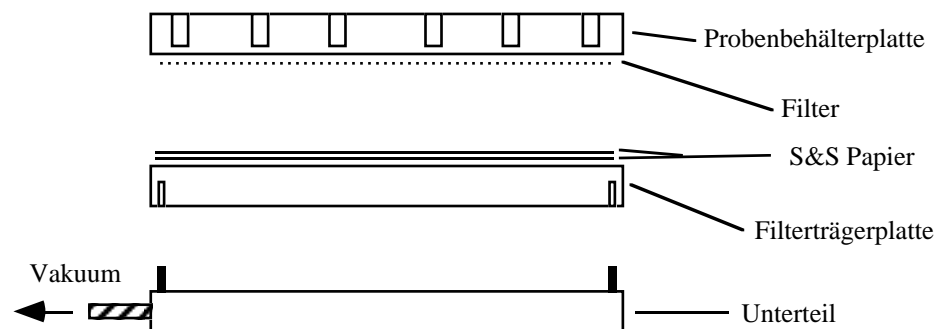


Abbildung 2.5 Dot-Blot Apparatur

Die Slots wurden bis zur Verwendung mit 10x SSC gefüllt. Die verwendete Menge totaler RNA trocknete man unter Vakuum und löste sie anschließend in 30 μl H_2O . Zur RNA wurden 7 μl Formaldehyd (37%) und 2 μl 20x SSC gegeben, für 15 min bei 68°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann gab man das doppelte Volumen 20x SSC (78 μl) zu und zentrifugierte für 5 min bei 14.000g. Zur Beschickung der Slots pipettierte man die RNA in die entsprechenden Slots und füllte die freien Slots mit 10x SSC. Mit Hilfe des Vakuums wurde die Flüssigkeit abgesaugt, dieser Schritt einmal wiederholt und die Membran anschließend getrocknet. Der Filter wurde kurz in 2x SSC gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und für 30 Sekunden unter einer UV-Lampe fixiert.

Markierung der Probe. Die oligo-dT Probe zur Bestimmung des mRNA-Gehalts (30 Thyminbasen) markierte man mit einer T4-Polynukleotidkinase. Dazu wurden 5 pmol des oligo-dT in 21,5 µl Aqua dest. aufgenommen, 5 min aufgekocht und 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 3 µl eines 10x Kinase Puffers, 3,5 µl (³²P) γ-ATP und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (30 U) zugegeben. Dieses Gemisch inkubierte man 10 min bei 37 °C und stoppte die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0,1 M EDTA. Zur Aufreinigung der Probe wurden CHROMA-SPIN™ columns von Clontech eingesetzt. Dazu zentrifugierte man die Säule für 5 min bei 3000g, um das in H₂O suspendierte Resin zu sedimentieren und das Wasser abzutrennen. Dann wurde die markierte Probe aufgegeben und die Columns wiederum 5 min bei 3000g zentrifugiert. Das Filtrat konnte zur Hybridisierung verwendet werden.

Hybridisierung mit Oligo-dT. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 5 ml Aqua dest., 2ml 5x Probenpuffer, 2 ml 5M NaCl, 0,5 g Dextran und 2 mg salmon-sperm-DNA. In dieser Lösung wurden die Filter im Rollerschrank 4 h bei 42°C prähybridisiert. Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurde ein Volumen der markierten Probe, das 1,5 Mio Counts entspricht, für 5 min aufgekocht, auf Eis wieder abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde sie in die Prähybridisierungslösung pipettiert und die RNA anschließend für 16 h bei 42 °C mit dem Oligo-dT hybridisiert.

Dehybridisierung. Zur Dehybridisierung wurden 0,01 % SSC, H₂O und 0,1 % SDS gemischt und aufgekocht. Diese Lösung wurde auf den Filter gegossen und bei 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Der Filter wurde feucht eingeschweißt und bei 4°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.7 Präparation der cDNA Proben

Die cDNA-Proben, die in den Experimenten Verwendung fanden, sind Teil des Bestandes in unserem Labor. Sie waren in der Regel als Inserts fertig präpariert und bedurften keiner weiteren Aufarbeitung. Die Plasmide für die Myosine mußten vor ihrer Verwendung vervielfältigt werden. Dazu wurden superkompetente Bakterien mit diesen Plasmiden transfiziert, vermehrt und die Inserts anschließend aus den Plasmiden isoliert.

Vermehrung der Plasmide. Die Plasmide wurden zu ihrer Vermehrung in superkompetente HB101-Zellen eingebracht und diese Zellen über Nacht kultiviert. Dazu mischte man 200 µl kompetente Zellen mit 5 µl Plasmidmix, inkubierte sie für 35 - 40 min auf Eis, anschließend

40 sec bei 42 °C und dann unter Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin 60 min bei 37°C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm wurden 1 ml des Überstands verworfen und das Pellet in dem Rest von etwa 200 µl resuspendiert. Diese Suspension wurde mit einer ausgeglühten Öse auf Ampicillin-haltigen Platten ausgestrichen. Die einzelnen Kolonien, die bei 37°C über Nacht auf diesen Platten wachsen wurden mit einem kleinen Holzstift gepickt und in 2 ml LB-Medium unter Zusatz von 2 µl einer Ampicillin-Stammlösung bis zum nächsten Morgen vermehrt.

Die Kultur wurde bei 4°C für 3 min zentrifugiert und die enthaltenen Plasmide mit Hilfe des MiniPrep-Kits von Promega aufbereitet. Sie konnten dann sequenziert werden, um die Klone zu identifizieren, die ein intaktes Insert enthalten. Diese Sequenzierungen wurden in unserem Haus in einer zentralen Sequenziereinrichtung verarbeitet. Nach Identifikation geeigneter Klone wurde ein Aliquot erneut kultiviert und die Plasmide mit dem MaxiPrep-Kit von Promega aufgearbeitet. Der cDNA-Gehalt der aus den MaxiPreps erhaltenen Plasmidsuspensionen wurde durch Spektrophotometrie bei 260, 270 und 280 nm bestimmt.

Präparation der Inserts. Zu 40 µg Plasmid gab man die zum Schnitt verwendeten Enzyme und der entsprechende Puffer. Dieses Gemisch wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann die Verdauung mit EDTA abgestoppt.

Die Auftrennung des Plasmidgemisches erfolgte in sehr breiten Slots eines FA-Gels. Dazu verwendete man besonders gereinigte Agarose. Die Bande mit dem Insert wurde ausgeschnitten und die Inserts mit dem Gene-clean-Kit aufgereinigt. Dazu wurde das Eppendorff mit dreifachem Volumen Natriumiodid aufgefüllt und die Agarose für 5 min bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Glasmilch pro 5 µg Insert-DNA und Inkubation für 15 min bei RT wurde die Glasmilch 5 sec bei 14.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit 200-700 µl einer Waschlösung gewaschen. Dann eluierte man das Insert für 15 min mit etwa 15 µl H₂O oder TE-Puffer aus dem Pellet. Nach 30 sec scharfem Abzentrifugieren wurde der Überstand mit den Inserts abgehoben und in ein neues Eppendorff transferiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.8 Analyse exprimierter mRNA

RNA-Isolierung. Das Medium wurde von den Zellen abgehoben und die Zellkulturschale zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend gab man 2 ml Guanidiniumpuffer zu, löste das Lysat mit einem Zellschaber, teilte es in 1,5 ml Eppendorff in Portionen zu je 0,5 ml und legte es auf Eis.

Pro Eppendorff wurden 50 µl 2 M Natrium-Azetat, 500 µl Phenol und 100 µl Chloroform : Isoamylalkohol (49 : 1) zugegeben und sorgfältig für 1 min gevortext, für 15 min auf Eis gestellt und 20 min bei 14.000 g / 4°C abzentrifugiert. Man nahm die obere klare, wässrige Phase ab, gab sie in ein frisches Eppendorff-Tube und präzipitierte sie dort mit 500 µl Isopropanol (1h bei -20°C). In einem nächsten Schritt wurde die RNA für 20 min bei 14.000 g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol gewaschen und bei 14.000g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet kurz getrocknet. Dann löste man das Pellet in 100 µl Guanidinium-Puffer und präzipitierte es mit 100 µl Isopropanol bei -20°C für eine Stunde. Im letzten Schritt wurde das Pellet zweimal mit 70%-igem eiskalten Ethanol gewaschen und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Dazu inkubierte man es 15 min bei 65°C. Zur Konzentrationsbestimmung wurde in einem Spektrophotometer die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Nun wurde die RNA mit der 2,5-fachen Menge 100% Alkohol bei -80°C zur weiteren Analyse eingefroren.

$$\text{RNA (mg/ml)} = (\text{A}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40) / 1000$$

Formaldehyd-Agarose Gel. Zur Herstellung eines großen 1%-igen Agarose Gels wurde 2,5 g Agarose mit 25 ml 10x MOPS versetzt und mit 225 ml H₂O aufgefüllt. Dieses Gemisch kochte man für 5 min auf und stellte das Ausgangsvolumen mit Aqua dest. wieder her. Nach Zugabe von 13 ml Formaldehyd 37% wurde das Gel blasenfrei gegossen und der Kamm eingesetzt. Es wurde nach dem Polymerisieren dann in die mit 2000 ml 1x MOPS gefüllte Kammer gestellt. Bei der Probenvorbereitung aliquotierte man 15 µg totale RNA aus den Stocks und trocknete sie in der Speed vac. Dann wurden 2,5 µl H₂O, 12,5 µl RNA-Probenpuffer (5x) und 1 µl Ethidiumbromid (1mg / ml) je Probe zugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 65°C inkubiert, kurz auf Eis gelegt, abzentrifugiert und in die Taschen des vorbereiteten Gels pipettiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel kurz in Aqua dest. und dann in 10x SSC gewaschen.

Northern Blot. Der Aufbau des Northern Blot ist in Abb. 2.6 dargestellt. Eine Glasplatte wurde auf zwei Schalen, gefolgt von einer 10 cm dicken Schicht aus Zellstoff gelegt. Das rechteckige 3MM Papier tränkte man in 10x SSC und legte es oben auf den Stapel, es folgten die feuchte Membran (Hybond N+, Amersham) und zum Schluß das Gel. Dann wurde eine Maske aus Folie aufgelegt und schließlich der ganze Stapel mit zwei länglichen, getränkten 3MM-Streifen bedeckt, die an ihren Enden bis in die 20x SSC-Lösung reichten. Es wurde eine zweite Glasscheibe aufgelegt und das Glas mit einer 500 ml Flasche beschwert.

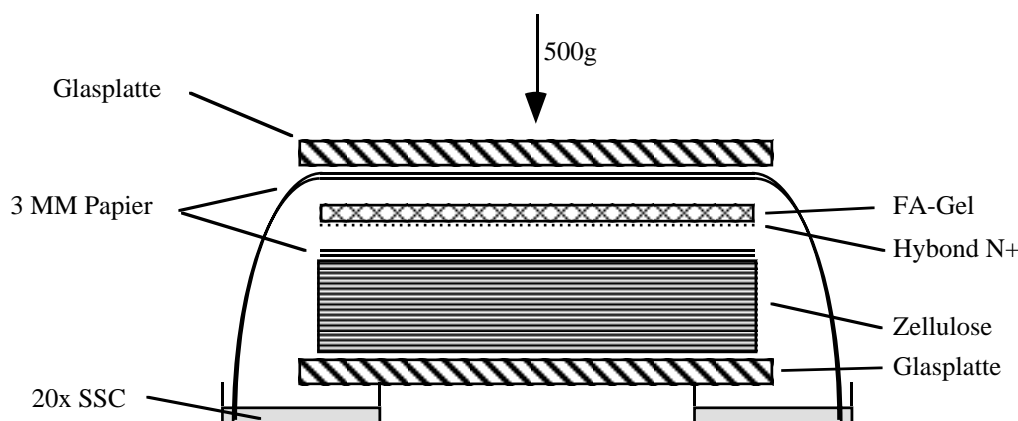


Abbildung 2.6 Kapillarblot

Nach 16 h Kapillarblot wurde die Membran kurz in Aqua dest. gewaschen und zwischen 2 Streifen 3MM-Papier getrocknet. Die RNA-Seite fixierte man mit UV-Licht.

Markierung der Probe. Zum Markieren der cDNA-Proben wurde das "RediPrime-DNA-labelling-system" von Amersham verwendet. Die DNA wurde in 45 μ l Aqua dest. aufgenommen und für 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde sie mit den Nukleotiden, dem Enzym und 3,5 μ l (32 P) dCTP vermischt und bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 5 μ l 0,2 M EDTA gestoppt. Mit Hilfe der Papierchromatographie wurde der Einbau des Phosphors in das Insert bestimmt. Dazu wurde 1 μ l des gelabelten Ansatzes auf einen Papierstreifen aus Whatman Papier gegeben, unter Rotlicht getrocknet und die freien Nukleotide durch 5 M KH_2PO_4 als Laufpuffer vom Insert getrennt. Der Streifen wurde 5 min getrocknet, geteilt und in einem β -Counter der Einbau bestimmt.

Hybridisierung der Membran. Die geblotteten Filter wurden mit der RNA-Seite nach innen in 50 ml Röhren hybridisiert. Für die Prähybridisierung wurde 10 ml deionisiertes Formamid, 4 ml 5M NaCl, 4 ml 5x Probenpuffer und 1 ml 50% Dextransulfat gemischt und mit 2 ml aufgekochter salmon sperm-DNA (10 min) versetzt. Dann wurde 5 ml Puffer in die Hybridisierungsröhren gegeben, der Filter befeuchtet und die Luftblasen zwischen Filter und Wand ausgestrichen. Anschließend wurde der Filter im Rollerschrank 3-4 Stunden bei 42°C prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurde ein Volumen der markierten Probe eingesetzt, das 3 Millionen Zerfällen pro Minute entsprach. Es wurde 5 min aufgeköcht und dann auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Probe in die Hybridisierungsflüssigkeit gegeben, das Röhren gut verschlossen und der Filter 16 h bei 42°C im Rollerschrank hybridisiert.

Auswertung. Nach der Hybridisierung wurde der Filter gewaschen und auf den Phosphorimager (Molecular Dynamics) aufgelegt, um die Signale zu detektieren und zu quantifizieren. Diese Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageQuant des Phosphorimagers. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde ein Röntgenfilm auf den Filter gelegt (bei -80°C).

Dehybridisierung. Zum Dehybridisieren wurde $0,01\times$ SSC mit $0,1\%$ SDS aufgekocht und auf den Filter gegossen. Ein 15-minütiges Waschen bei Raumtemperatur reichte in der Regel aus, um die RNA zu dehybridisieren.

2.2.9 Verwendete cDNA-Proben

Atrialer Natriuretische Faktor

Dr. Govelan Patter, CalBio via H.S. Sharma

Die mRNA für ANF der Ratte [88] ist eine 787 bp lange Ribonukleinsäurekette (Accession M27498). Die Probe, die zur Hybridisierung benutzt wurde, ist ein 800 Basenpaare langes Insert, das von Position 37 - 766 mit der mRNA von ANF hybridisiert. Das Insert ist in ein pU9-Plasmid kloniert, aus dem es mit Eco R1 und Hind III ausgeschnitten wird.

α -Myosin heavy chain

Ketty Schwartz, Paris [89]

Die mRNA für α -MHC der Ratte [90] ist eine 5830 bp lange Ribonukleinsäure (Accession X15938). Die cDNA-Probe besteht aus einem 95 Basen langen Insert, das in die Sma I Schnittstelle des pBS-Plasmids von Stratagene kloniert ist. Die Probe ist spezifisch für die α -MHC mRNA der Ratte und zeigt eine 88,9 %ige Identität über einer Strecke von 72 Basenpaaren. Dieser Überlappungsbereich geht von Position 5834 bis 5905. An dessen Ende geht es in eine 23 Basen lange Kette aus Thymidinbasen über. Schneidet man das Insert mit Hind III und Eco-R I aus dem Plasmid ergibt sich ein 135 Basenpaare langes Insert.

β -Myosin heavy chain

Ketty Schwartz, Paris [89]

Die mRNA für β -MHC der Ratte [91] ist eine 5925 bp lange Ribonukleinsäure (Accession X15939). Die cDNA-Probe besteht aus einem Triplet eines 69 Basen langen Inserts (207 bp), das spezifisch ist für β -MHC mRNA der Ratte. Ein Sequenzvergleich ergab, das 67 Basen eines 70 Basen langen Überlappungsbereichs identisch sind (95,7%) und das Insert weder an das α -MHC der Ratte noch an die MHC-mRNA anderer Säuger bindet. Dieser Bereich fängt

an Position 5797 an und geht bis Position 5865. Es ist in ein 2,75 kb großes pBS-Plasmid von Stratagene (La Jolla, Kalifornien) kloniert. Schneidet man das Plasmid mit Pst I / Eco-R I resultiert ein 242 bp langes Insert.

Fibroblast Growth Factor 1

Die mRNA für FGF-1 der Ratte [92] ist eine 1216 bp lange Ribonukleinsäure, die auch unter dem Namen HBGF-1 bekannt ist (Accession X14232). Das verwendete Insert zeigt in einem Überlappungsbereich von 370 Basenpaaren eine Identität von 86,8%, beginnt an Position 369 und endet an Position 738.

Fibroblast Growth Factor 2

Ivor Mason, London

Die mRNA für FGF-2 der Ratte [93] ist eine 1272 bp lange Ribonukleinsäure (Accession M22427). Die cDNA-Probe für bovines FGF-2 (bFGF) ist ein Insert, das in die Sma I Schnittstelle des Vektors pGEM-1 kloniert wurde. Schneidet man es mit Hind III aus, so resultiert ein 450 Basenpaare langes Insert.

FGF-Rezeptor 1

Ivor Mason, London

Die mRNA für den FGF-R1 der Ratte [94] ist eine 2469 bp lange Ribonukleinsäure (Accession D12498). Die cDNA für den FGF-R1 ist ein Insert, welches in den Vektor pGEM-7f+ kloniert ist und umfaßt die zytoplasmatische Domäne des FGF-Rezeptors 1. Es beginnt an Nukleotid 1448 und reicht bis Position 2501 der Hamster Sequenz (Accession M28998). Schneidet man das Plasmid mit Bam-H 1 und Xba I resultiert ein 1053 Basenpaare langes Insert.

Transforming Growth Factor β_1

R. Derynck via Dr. H.S. Sharma

Die mRNA für den TGF- β_1 der Ratte [95] ist eine 1585 bp lange Ribonukleinsäure (Accession X52498). Die verwendete Probe ist ein 1050 Basenpaare langes Insert, das einen Teil des humanen TGF- β_1 kodiert. Es ist in ein pGEM-Plasmid kloniert und läßt sich mit EcoR1 ausschneiden.

Vascular Endothelial Growth Factor

E. Keshet, Jerusalem

Die mRNA für den VEGF der Ratte [96] ist eine 1491 bp lange Ribonukleinsäure (Accession AF014827). Die cDNA-Probe ist für Maus-VEGF spezifisch und ist ein Insert, das in die

Eco-R I Schnittstelle des Vektors pBluescript (+) kloniert wurde. Schneidet man es mit diesem Enzym aus dem Vektor, entsteht ein 1800 Basen langes Insert. In seiner Publikation gibt Sharma [97] an, mit seiner cDNA Probe des Schweins eine 1,7 und eine 3,9 kb große Bande im Schweineherzen zu finden.

2.2.10 Histologie

Zellkultur. Die Zellen wurden zu diesem Zweck in speziellen 8-well Zellkulturkammern (Nunc) kultiviert, die auf einem Objektträger befestigt waren. Sie bestehen aus einem Termanox-Träger und einer Kammer aus Polystyrene. Die Benutzung dieser Objektträger erlaubte die selektive Stimulation eines bestimmten Wells, ohne die Medien und Wachstumsfaktoren zu vermischen. Sie wurden vor Benutzung mit 10 µg/ml Laminin beschichtet und mit den Kardiomyozyten beschickt. Die Kultur der Zellen verlief dann wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Immunfluoreszenz. Die Myozyten wurden in 4 % Formaldehyd in PBS fixiert und 10 Minuten in 0,05 % Triton X 100 in PBS permeabilisiert. Nach einer Blockierung für 10 min in 0,1 M Glycin/PBS wurden die Zellen weitere 10 min in einem Gemisch aus 5 % bovinem Serumalbumin und 0,2 % Gelatine inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dann ein Stunde mit dem monoklonalen Antikörper gegen α -Actinin, eine Stunde mit dem anti-Maus-Antikörper und anschließend mit Streptavidin-Cy2 inkubiert. Zwischen allen Schritten wurden die Zellen viermal für 3 min in Phosphatpuffer gewaschen. Diese Färbung und die mikroskopische Untersuchung der Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. D. Scholz durchgeführt.

Fluoreszenz-Mikroskopie. Die gefärbten Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LEICA-TCS-Laser) mit entsprechenden Filtern beurteilt und photographiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Kodak 100 ASA Farbdiafilm gemacht.

2.2.11 HPLC von Adenosinphosphaten

Zu diesem Zweck wurden entweder Gewebeprobe, frisch isolierte oder 2 Tage kultivierte Myozyten in 10% PCA (70% v/v) in Phosphatpuffer gelöst, um die Proteine zu denaturieren. Nach einer Ultraschallbehandlung (3 x 5 Sekunden) wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis aufbewahrt. Nach einem dreiminütigen Abzentrifugieren der gefällten Proteine wurde der Überstand in ein frisches Eppendorff gegeben und 2 µl pH Indikator zugesetzt. Der pH wurde mit Kaliumhydroxid auf einen Wert zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt. Um die Perchlorat-

Lösung zu entfernen, schloß sich eine erneute Zentrifugation an, nach der der Überstand für die HPLC-Bestimmung genutzt wurde. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. T. Podzuweit durchgeführt.

2.2.12 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Versuche mit Wachstumsfaktoren wurde in der Regel eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied, schloß sich bei gleicher Varianz ein Bonferroni Test, bei ungleicher Varianz der Kruskal-Wallis ANOVA und der Dunn's Test an. Die Versuche zur elektrischen Feldstimulation wurden mit dem unpaarigen Students T-Test ausgewertet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet. In den entsprechenden Graphen wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Myozytenisolierung & Kultur

3.1.1 Ergebnisse der Isolierung und Qualität der Zellen

Die beschriebene Methode lieferte routinemäßig etwa 4 Millionen längliche Kardiomyozyten pro Herz, die sich in der Kulturschale anhefteten. Durch die simultane Verwendung von bis zu 4 Tieren standen so pro Experiment ausreichend Zellen zur Verfügung. Die Experimente einer Versuchsreihe erfolgten jeweils an einer Präparation.

Zellqualität während der Isolierung. Nachdem das Herz 40 Minuten nach Perfusionsbeginn von der Apparatur abgenommen worden war, wurde im Anschluß an eine 10-minütige Immersionsphase der Zustand der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Hier fanden sich etwa 70% vereinzelte, intakte Myozyten. Von diesen Zellen zeigten etwa 10-20 % spontane Kontraktionen (etwa eine Kontraktion pro Minute). Neben Gewebestücken mit weiteren länglichen Myozyten waren die restlichen vereinzelt Zellen abgerundet. Alle Zellen, die nicht vereinzelt und intakt waren, wurden in den folgenden Waschschritten abgetrennt.

Zellqualität beim Plattieren. Nach dem Ausplattieren der Zellen fanden sich 85-90% längliche Myozyten in der Kulturschale. Diese kontrahierten noch zu etwa 10% während der ersten Stunden in Kultur. Die Kontraktionen entstanden in der Regel an einem Glanzstreifen und bewegten sich wellenförmig über den Zellkörper hinweg. Bei einigen Zellen fand sich ein Kontraktionsmuster, bei dem sich die Zellenden symmetrisch aufeinander zu bewegten. Diese Zellen lösten sich in der Regel dann in der Folgezeit von der Schale und wurden in den Waschschritten abgelöst. Nach dem ersten Mediumswechsel (1 Stunde) bestand die Zellschicht aus etwa 95% intakten Myozyten, die dann in den weiteren Untersuchungen Verwendung fanden. Abb. 3.1 zeigt die Myozyten in einer Übersichtsaufnahme unter einem Auflichtmikroskop unmittelbar nach dem Plattieren. Man sieht den hohen Anteil an intakten Myozyten, die der *in-vivo*-Morphologie entsprechen. Sie zeigen die übliche Morphologie für diese Zellart mit der fast rechteckigen, polygonalen Form und der regelmäßigen Querstreifung durch die Anordnung der Sarkomeren.

3.1.2 Adulte Kardiomyozyten in Kultur

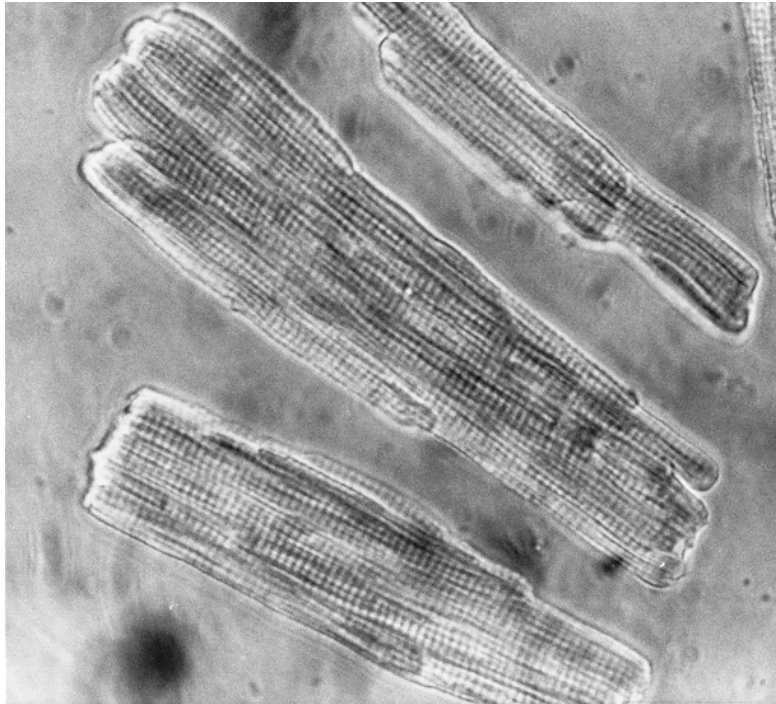


Abbildung 3.1 Phasenkontrastübersicht von adulten Kardiomyozyten eine Stunde nach Isolierung (480-fach). Man sieht die typische langgestreckte, stäbchenförmige Morphologie der intakten Muskelzelle. Wie Versuche über 2 Wochen zeigten, sind diese Kulturen kaum mit anderen Zellarten verunreinigt.

Zelldimensionen

Bei frischen Zellen betragen die Abmessungen der Zellen etwa 10-30 μm in der Breite und 70-160 μm in der Länge. Die Messung der Sarkomerenlänge ergab eine durchschnittliche Länge von 1,92 μm bei einem durchschnittlichen Verhältnis von Länge zu Breite von 7 : 1.

Gehalt an energiereichen Phosphaten

Zur Bestimmung der energiereichen Phosphate wurde eine HPLC-Bestimmung von Adenosintriphosphaten (ATP), sowie deren Metaboliten ADP und AMP vorgenommen. Außerdem wurde NAD gemessen. Hier zeigte sich (Abbildung 3.2), daß der Energiegehalt der Zellen in Kultur deutlich zunimmt. Ein relativ niedriger ATP-Gehalt von frisch isolierten Myozyten stieg unter den Kulturbedingungen an. Während die Zellen vor der Kultur einen Gehalt von 0,44 (\pm 0,18) $\mu\text{mol ATP} / \text{g}$ unverdaulichem Herzgewebe aufwiesen, stieg dieser in zwei Tagen Kultur auf 2,01 (\pm 0,75) $\mu\text{mol} / \text{g}$ an ($p < 0,05$). ADP fiel von einem Ausgangswert von 0,58 (\pm 0,11) $\mu\text{mol} / \text{g}$ auf 0,34 (\pm 0,16). AMP sank von 0,72 (\pm 0,57) auf 0,04 (\pm 0,00) ($p < 0,05$). NAD zeigte keine wesentlichen Veränderungen [0,12 (\pm 0,05) mmol / g vs. 0,16 (\pm 0,11)].

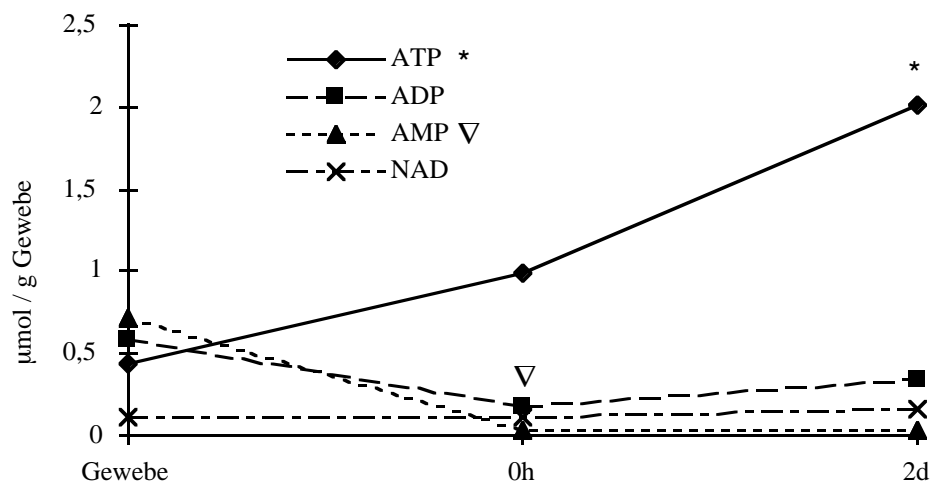


Abbildung 3.2 Energiegehalt der Zellen im Gewebe, nach der Isolierung (0h) und nach zwei Tagen in Kultur (2d). Man sieht den deutlichen Anstieg des ATP-Gehalts * (+ 1,57 $\mu\text{mol/g}$ Gewebe) und den starken Abfall des AMP-Gehalts ∇ (- 0,68 $\mu\text{mol/g}$ Gewebe) der Zellen. Die Werte für ADP, AMP und NAD pendeln sich schnell auf einem niedrigen Niveau ein. (* und ∇ jeweils signifikant mit $p < 0,05$ gegenüber der Gewebekontrolle)

Morphologische Veränderungen über 8 Tage. Um die Veränderungen der Zellen über einen Zeitraum von 8 Tagen zu beschreiben, wurden Färbungen für α -Aktinin an frisch isolierten und an 8 Tage alten Myozyten durchgeführt. Es handelt sich bei α -Aktinin um ein Protein des Z-Streifens, das als eines der ersten Proteine bei der Neuorganisation des kontraktiven Materials im Rahmen der Redifferenzierung in Kultur sichtbar wird. Man sah sowohl in der frischen Kontrolle (Abb. 3.3) als auch in den 8 Tage alten Zellen (Abb. 3.4) eine regelmäßige Querstreifung der Myozyten, wie sie typisch ist für adulte differenzierte Zellen.

Die frisch isolierten Zellen zeigten eine scharf begrenzte Anfärbung für α -Aktinin, die Sarkomeren waren sehr geordnet und durchzogen den gesamten Zellkörper. Dieser war insgesamt relativ dick und hatte eine glatte Oberfläche. Dagegen waren die 8 Tage alten Zellen schlanker, etwas unförmiger und zeigten eine diffusere Fluoreszenz, in der die Z-Streifen aber noch zu erkennen waren. Die Zahl der Zellen hatte allerdings im Vergleich zur frischen Kontrolle leicht abgenommen, etwa 80% der Zellen sind noch länglich. Verfolgte man diese Zellen bis zum 16. Tag in Kultur, verringerte sich der Anteil der länglichen Zellen bei unveränderter Morphologie auf 50% (ohne Abbildung).

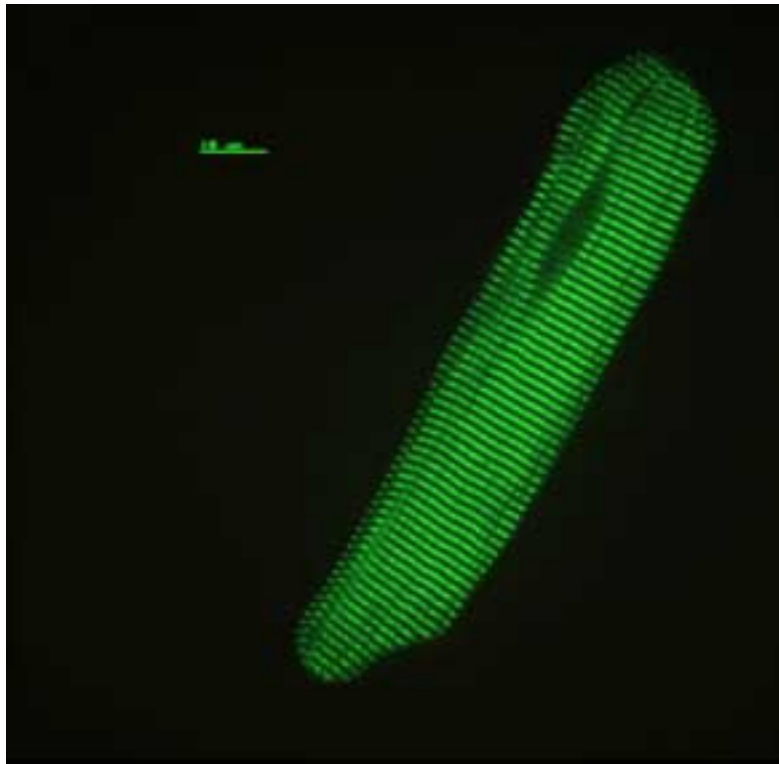


Abbildung 3.3 Frischer Myozyt angefärbt für α -Aktinin. Die Zellen zeigen die typische Morphologie frischer Zellen und eine regelmäßige Querstreifung durch das im Z-Streifen lokalisierte α -Aktinin.

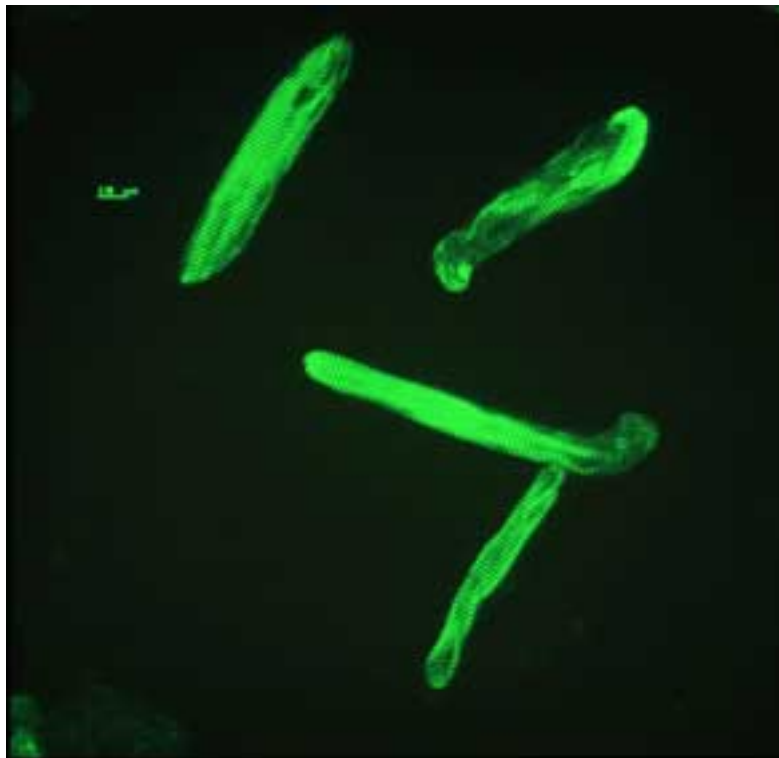


Abbildung 3.4 Etwas schlankere Morphologie eines 8 Tage alten Myozyten (α -Aktinin). Insgesamt diffusere Fluoreszenz mit unscharfen Z-Streifen.

3.2 Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Um die Wirkung der verschiedenen Wachstumsfaktoren zu beschreiben, wurden neben serumfrei kultivierten Zellen als Kontrolle, Kulturen mit Zugabe von 5 oder 20% Serum stimuliert.

3.2.1 Effekte von fötalem Kälberserum (FCS)

Morphologie. Die Zellen in den Abbildungen 3.5 a&b sind 8 Tage in Gegenwart von 5 bzw. 20% Serum kultiviert worden. Sie zeigten die für Serum typische, markante Morphologie. Dazu hatten sie den Zellkörper gänzlich umstrukturiert und waren dadurch sehr flach und groß geworden. An der Außenseite der Zelle zeigten sich sehr kurze kleine Ausläufer. Diese Ausläufer waren in den 5% Kulturen noch relativ klein und wurden unter 20% rund um den Zellkörper ausgebaut. In der Zelle selbst zeigte sich an der Färbung mit α -Aktinin ein Neuaufbau kontraktiven Materials. Es entstand eine feine Querstreifung in den einzelnen Sarkomerenbündeln, die allerdings in ihrer Gesamtheit nicht so organisiert erschien und nicht zu einer homogenen Querstreifung der gesamten Zelle führte, wie es bei frischen Zellen der Fall war. Wie man in der Abbildung 3.5 b besonders gut erkennen kann, ziehen die neu aufgebauten Sarkomeren von den Verankerungspunkten der Zellen in der Peripherie in den Zelleib hinein. Dadurch entsteht eine sternenförmige Anordnung von Sarkomeren mit dünnen Bündeln in der Peripherie und dicken Lagen von Sarkomerenbündeln im Zentrum der Zelle. In frisch isolierten Zellen dagegen laufen alle Sarkomerenbündel von dem Glanzstreifen auf der einen Seite der Zelle zum Glanzstreifen auf der gegenüberliegenden Seite. Dadurch haben die Sarkomeren die gleiche Ausrichtung und es entsteht in der α -Aktinin Färbung der Eindruck einer durch den Zellkörper gehenden Scheibe, die aber einen einzelnen Z-Streifen repräsentiert.

Proteinsynthese. Man sah eine deutliche Steigerung der Proteinsynthese unter 5 als auch 20 % FCS (Abbildung 3.5c). Bis zum 4. Tag in Kultur stieg die Proteinsyntheserate noch bei allen Kulturen an. Danach sank dann die Proteinsynthese in den Kontrollkulturen, während sie sich in den Serumkulturen noch weiter steigerte. Am 6. Tag war sowohl die 5% serumhaltige Kultur mit 5099 ± 406 cpm als auch die 20% serumhaltige Kultur mit 6605 ± 437 cpm gegenüber der Kontrolle mit 1757 ± 318 cpm signifikant erhöht. Am 8. Tag stieg dieses Verhältnis noch auf 5700 ± 967 cpm bei 5% und 9309 ± 1894 cpm bei 20% gegenüber der Kontrolle von 1135 ± 333 cpm ($p < 0,05$).

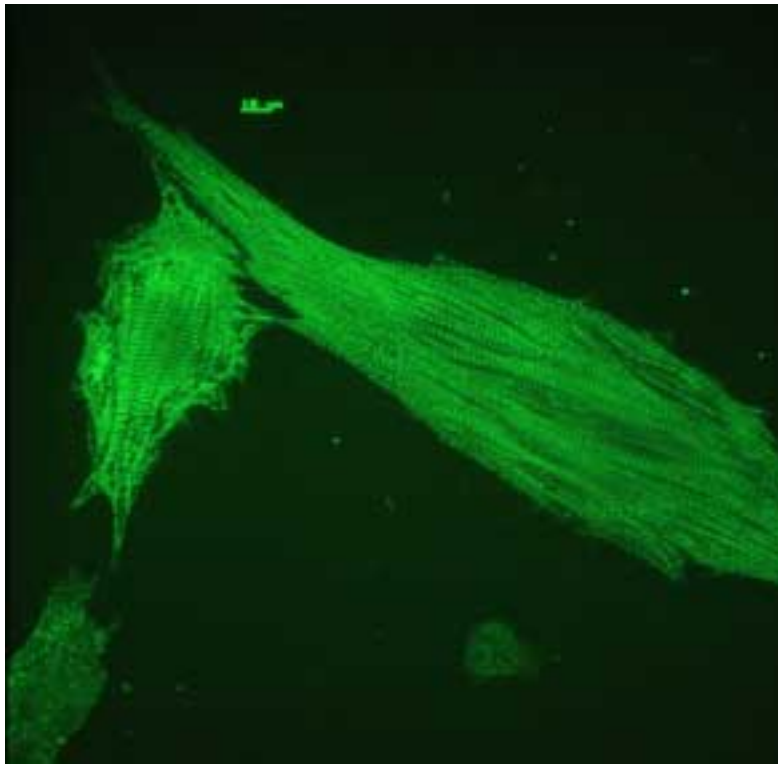


Abbildung 3.5 a Unter 5% Serum kultivierte Zellen nach 8 Tagen in Kultur. Die Zelloberfläche ist im Vergleich zu frisch isolierten Zellen relativ groß.

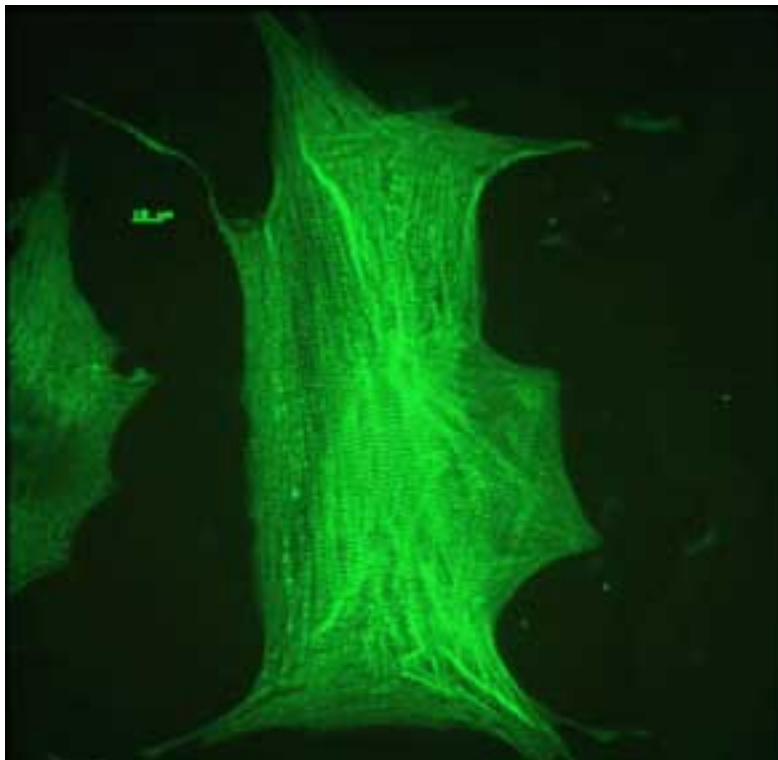


Abbildung 3.5 b Unter 20% Serum kultivierte Zellen. Man sieht eine im Vergleich zu Abbildung 3.5 a deutliche Oberflächenvergrößerung mit kurzen Ausläufern.

Proteingehalt. Unter Stimulation mit Serum stieg der Gehalt an Protein (Abbildung 3.5d). Am 2. Tag in Kultur lag der Proteingehalt der 3 Kulturen noch dicht beieinander und betrug etwa $100 \mu\text{g} / \mu\text{g DNA}$. Nur die Zellen unter Serum waren allerdings in der Lage ihren Proteingehalt über einen Zeitraum von acht Tagen aufrechtzuerhalten. Auch hier war ein Knick wieder am vierten Tag in Kultur zu finden. Bis zu diesem Zeitpunkt lag der Proteingehalt noch relativ dicht beieinander (C $98,6 \pm 13,2$; 5% $117,8 \pm 7,1$; 20% $130,0 \pm 0,7 \mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$). In der Folgezeit ging in allen Kulturen Protein verloren. Allerdings geschah das in den Kontrollschalen ohne Serum wesentlich schneller als in den serumhaltigen Kulturen. So wurden die Unterschiede zwischen Serum und Kontrolle hier signifikant. Bis zum achten Tag in Kultur atrophierten die Kontrollzellen auf einen Proteingehalt von $54,4 \pm 9,8 \mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$. Die Zellen unter Serum dagegen wiesen einen Proteingehalt auf, der in etwa der frischen Kontrolle entsprach (5% $91,8 \pm 21,9$; 20% $107 \pm 19,1$; * $p < 0,05$).

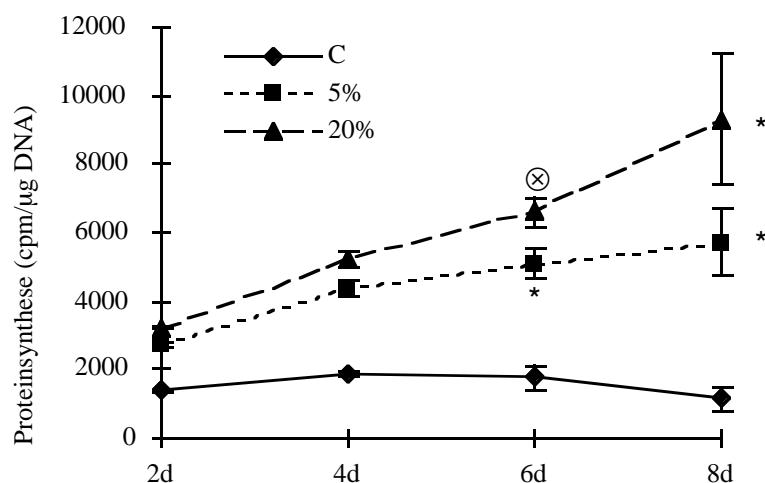


Abbildung 3.5 c Zeitverlauf der Proteinsynthese unter 5 bzw. 20% Serum. (⊗ 20% vs. C / 5%, $p < 0,05$; * 20% und 5% vs. C, $p < 0,05$). Sind die Unterschiede am vierten Tag noch nicht auffallend, so findet man in den folgenden Tagen (6 und 8) signifikante Unterschiede. Am sechsten Tag kommt es zu einer Steigerung der Syntheseleistung unter 5 als auch 20% um das 5 bzw. 6,5 fache und zwei Tage später ist die Syntheseleistung der Zellen etwa fünf bzw. neunmal so hoch wie in den Kontrollkulturen.

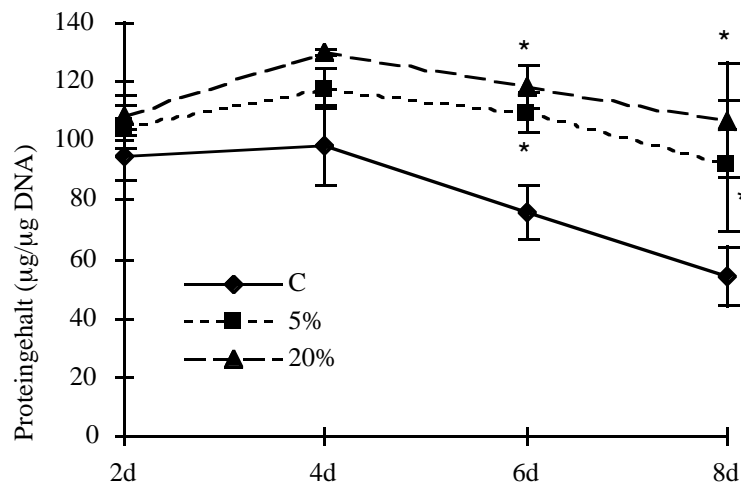


Abbildung 3.5 d Zeitverlauf des Proteingehalts unter 5 bzw. 20% Serum. Man sieht deutlich den Knick im Verlauf bei 4 Tagen und die anschließende Atrophie der Zellen. Nach 8 Tagen Kultur beträgt der Proteingehalt bei 5% 91,8 µg und bei 20% 107 µg und bewegt sich damit etwa in der Höhe frisch isolierter Zellen. Die Kontrolle dagegen weist nur 54,4 µg auf. (* $p < 0,05$ vs. C)

3.2.2 Effekte des Insulin ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF)

Morphologie. Die IGF's wurden in diesen Experimenten wie beschrieben in einer Konzentration von 500 ng / ml Medium verwandt. Morphologisch ließ sich die Adaption der Zellen an die Kulturbedingungen sehr gut erkennen (Abb. 3.6 a & b). Die Zellen veränderten sich unter dem Einfluß von IGF-I wie schon für die Zellen unter 5% Serum beschrieben. Dabei erreichten sie allerdings nur 1/4 der Größe und bildeten etwas längere Ausläufer. Die α -Aktinin-Anordnung schien im Inneren der Zelle nicht so gut organisieret zu sein, die Sarkomeren liefen wie unter 20% Serum eher von der Verankerung zur Zellmitte und die typische Querstreifung ließ sich nicht so gut erkennen. Ähnlich, aber deutlicher war diese Beobachtung unter IGF-II. Die typische Querstreifung war hier nur andeutungsweise zu erkennen. Die Lokalisierung des Zellkörpers vor der Adaption an die Kultur ließ sich noch gut erkennen, da er nur unvollständig in diesen Prozess mit einbezogen wurde. Die Ausläufer der Zelle, unter Stimulation mit IGF-I noch eher feingliedrig und in großer Zahl vorhanden beschränkten sich hier auf einige wenige, relativ dicke Zellfortsätze. Dieses Verhalten wurde auch in der Versuchen zur Modulation des Einfluß von ECGS mit IGF-I bzw. II beobachtet (Kapitel 3.2.5). In Abbildung 3.6 b sieht man auch eine Zelle, die von der gesamten Restrukturierung ausgespart blieb.

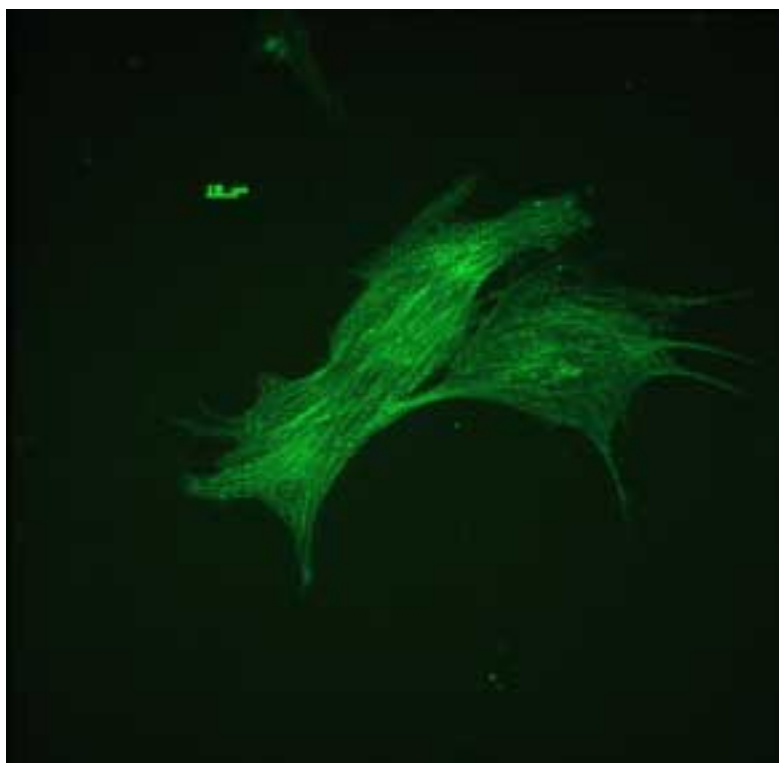


Abbildung 3.6 a Myozytendifferenzierung unter Stimulation mit IGF-I (Färbung: α -Aktinin)

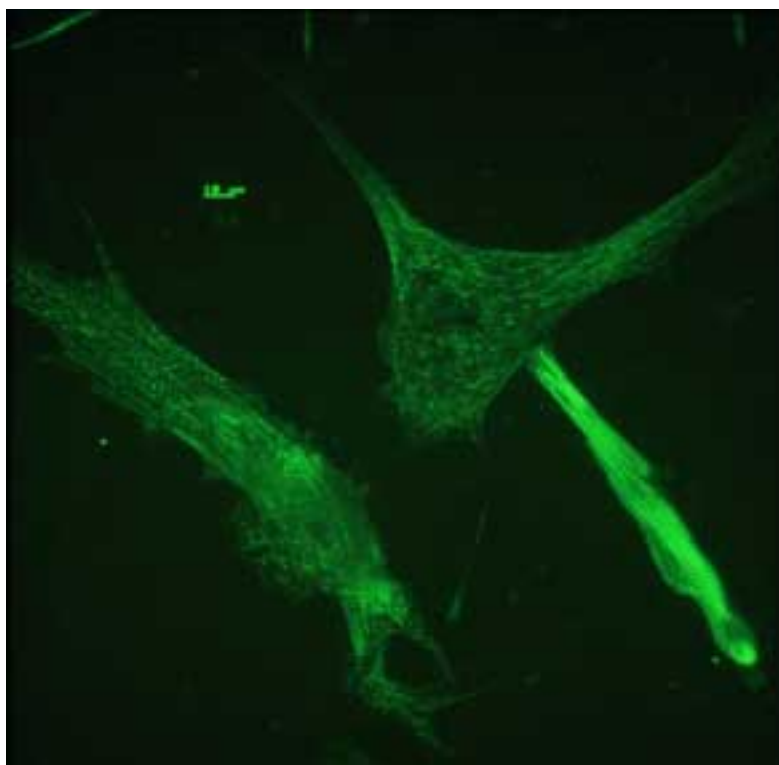


Abbildung 3.6 b Myozytendifferenzierung unter dem Einfluß von IGF-II (Färbung: α -Aktinin)

Um die Veränderungen der Zellen unter dem Einfluß der IGFs zu objektivieren und weitere Informationen über die Restrukturierung der Zellen zu erhalten, wurde die Proteinsynthese und der Proteingehalt nach 8 Tagen gemessen (Abb. 3.6 c & d). Als Kontrolle dienten serumfrei kultivierte Zellen nach 2 bzw. 8 Tagen.

Proteinsynthese. Sie war unter Stimulation mit den IGFs insgesamt stark beschleunigt. Es ergaben sich signifikante Werte (* $p < 0,05$) im Vergleich von IGF-I ($2934,4 \pm 804,8$) und der Kombination von IGF-I & II ($2757,8 \pm 396,8$) mit der 8 Tage alten Kontrolle ($1161,3 \pm 324,7$). Die Steigerung der Proteinsynthese unter IGF-II ($2975,9 \pm 893,7$) war sogar gegenüber beiden Kontrollen (2 und 8 Tage) signifikant erhöht ($\otimes p < 0,05$).

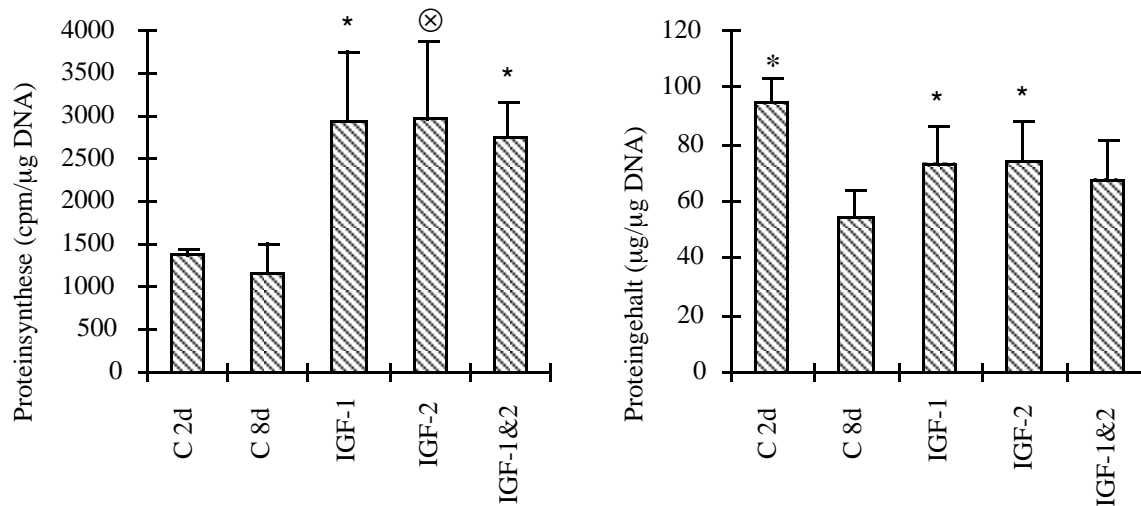


Abbildung 3.6 c&d Proteinsynthese (links) und Gehalt (rechts) unter Stimulation mit IGF-I, IGF-II und der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren. Man sieht eine signifikant erhöhte Proteinsynthese, die sich in einer verminderten Atrophie der Zellen niederschlägt (* signifikant mit $p < 0,05$ gegenüber der 8 Tage alten Kontrolle, \otimes signifikant gegenüber der 2 und der 8 Tage alten Kontrolle $p < 0,05$).

Proteingehalt. 2 Tage kultivierte Zellen wiesen einen Proteingehalt von $95,0 \pm 8,49 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA auf. In den folgenden sechs Tagen sank dieser Proteingehalt auf einen Wert von $54,3 \pm 9,2 \mu\text{g}$ ab ($\oplus p < 0,05$). Die Stimulation der Zellen mit IGF-I als auch IGF-II konnte eine signifikante Präservierung des Proteingehalts bewirken. Beide Werte lagen mit $73,4 \pm 12,5$ für IGF-I und $73,6 \pm 14,9 \mu\text{g}$ für IGF-II deutlich über dem Wert der 8 Tage alten Kontrolle mit $54,3 \pm 9,2 \mu\text{g}$ (* $p < 0,05$). Eine Kombination beider Wachstumsfaktoren konnte keine Erhöhung dieser Werte bewirken, er lag mit $64,6 \pm 14,0 \mu\text{g}$ sogar in einem Bereich, der sich nicht signifikant von der 8 Tage alten Kontrolle unterschied.

3.2.3 Effekte des Fibroblasten Wachstums Faktors (FGF)

Die FGFs sind eine Familie von Wachstumsfaktoren, die in der Entwicklung, der Wundheilung, der Hämatopoese und der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielen. Sie wurden in diesen Experimenten in einer Konzentration von 100 ng / ml Medium verwandt.

Morphologie. Die Abbildung 3.7 a zeigt die Myozyten nach 8 Tagen in Kultur unter Stimulation mit FGF-1. Die Zelle zeigten eine nur leichte Tendenz zu dedifferenzieren. Diese Umstrukturierung war aber weder mit den IGFs noch mit Serum zu vergleichen. Die Zelloberfläche vergrößerte sich nur wenig und die Färbung der Z-Streifen mit α -Aktinin blieb gut erhalten. Es starb ein größerer Teil der Zellen ab. Sehr ähnliche Aussagen konnte man für die Wirkung von FGF-2 auf die Adaption der Zellen in Kultur machen. Verglichen mit FGF-1 war hier die Dedifferenzierung der Zellen etwas ausgeprägter, die Zahl der überlebenden Zellen höher. Manche Zellen waren von der Wirkung des FGF-2 unbeeinflusst, einige zeigten eine Tendenz, sich an die Kultur anzupassen. Die Vergrößerung der Zelloberfläche fiel im Vergleich zu Serum und den IGFs ungleich kleiner aus. Insgesamt dedifferenzierten die Zellen wie schon unter FGF-1 sehr wenig.

Proteinsynthese und Gehalt. Es fiel eine gegenüber der 2 Tage (1388 \pm 35,4 cpm / μ g DNA) und 8 Tage alten Kontrolle (1161,3 \pm 324,7) erhöhte Proteinsynthese von FGF-1 (2091 \pm 162,5) als auch FGF-2 (2410,8 \pm 124,0) auf. Sie war unter FGF-2 ist etwas höher als unter FGF-1 und war gegenüber dem Kontrollwert mit $p < 0,05$ signifikant. Die unter IGF gemessenen Werte waren mit etwa 3000 cpm etwas höher. Auffällig war allerdings der Proteingehalt der Zellen. Er blieb, im Gegensatz zu der bei den IGFs beobachteten Abnahme, auf dem Niveau der 2 Tage alten Kontrolle (95 \pm 8,5 μ g / μ g DNA). Die Werte von FGF-1 und FGF-2 lagen bei 97,9 \pm 6,8 bzw. 95,1 \pm 10,5 und waren damit signifikant unterschiedlich zur Kontrollkultur mit 54,3 \pm 9,2 (* $p < 0,05$).

Zusammenfassend läßt sich für die FGFs im Vergleich zu den IGFs eine deutlich verminderte Adaptionfähigkeit an die Kultur feststellen. Dabei ist die Reaktion auf die Zugabe von FGF sehr heterogen. Die überlebenden Zellen präservieren ihre Form weitgehend, die Zellen breiten sich nicht sehr stark auf dem Substrat aus und es fehlt die starke Verankerung in der Kulturschale. Eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Proteinsynthese geht mit dem Erhalt des zellulären Proteingehalts einher und wirkt von daher der für serumfreie Kulturen typischen Atrophie entgegen.

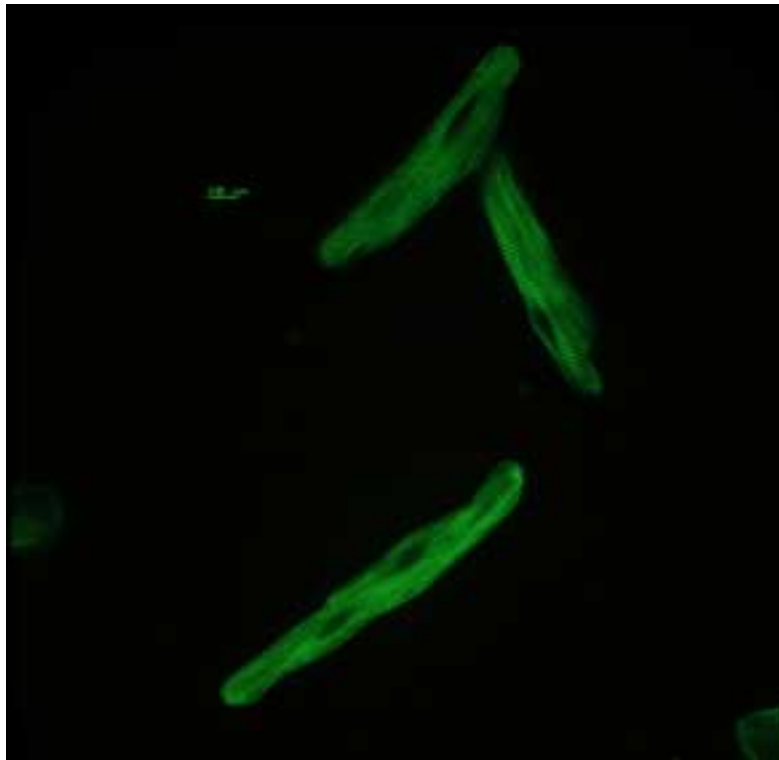


Abbildung 3.7 a Adulte Kardiomyozyten kultiviert in der Gegenwart von 100 ng / ml FGF-1. Man sieht die erhaltene Zellstruktur und nur mäßige Adaption an die Kultur (α -Aktinin).

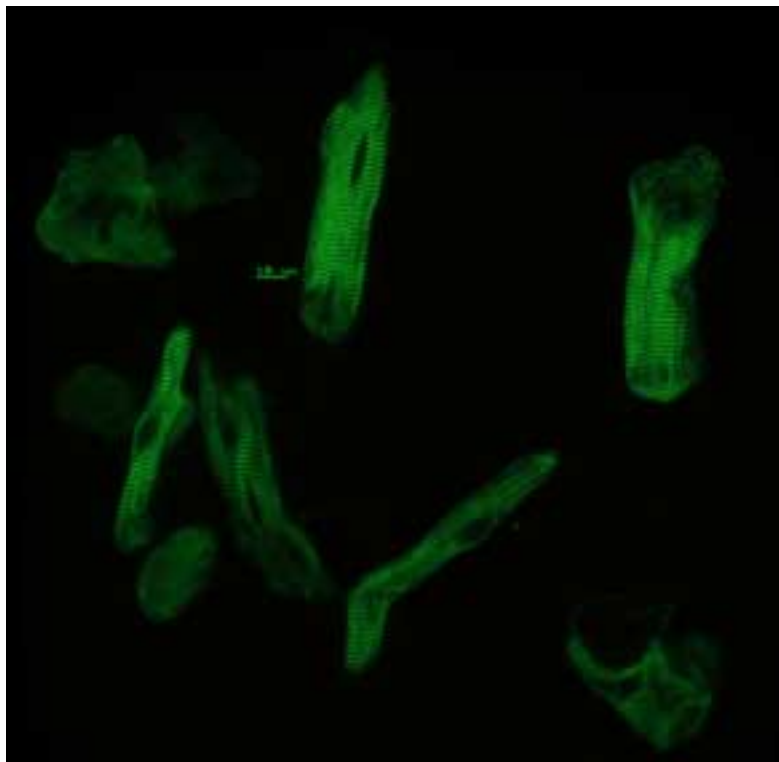


Abbildung 3.7 b Kardiomyozyten kultiviert in der Gegenwart von 100 ng / ml FGF-2 (α -Aktinin)

Während die IGFs eine deutliche Dedifferenzierung hervorriefen, bewahren die Zellen unter FGF-Stimulation eher ihre Struktur, verlieren aber dadurch auch häufig den Kontakt zum Substrat Laminin.

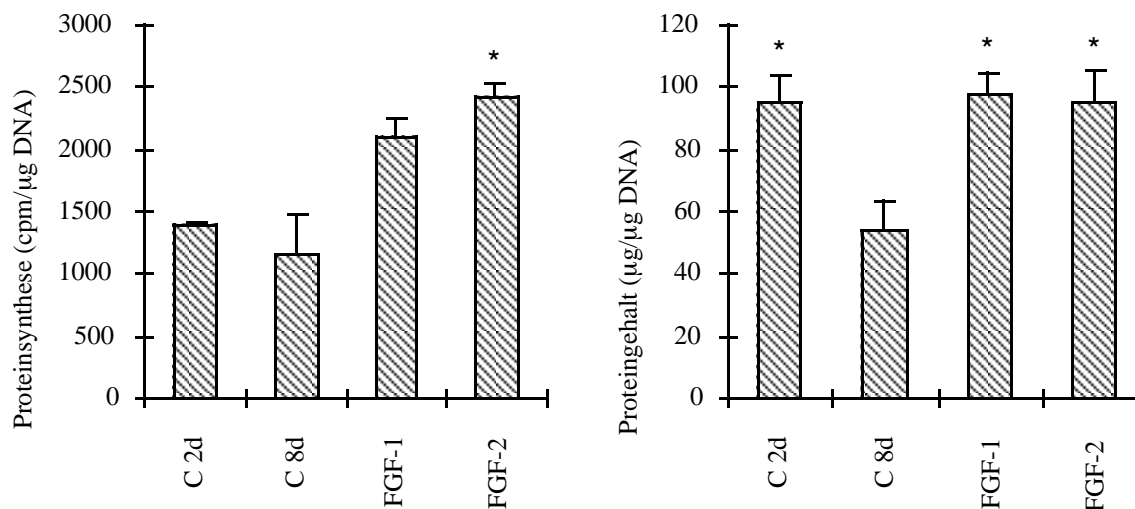


Abbildung 3.7 c&d Proteinsynthese (c) und -gehalt (d) unter Stimulation mit FGF-1 oder -2. Auffällig ist die im Vergleich zu den IGFs leicht erniedrigte Proteinsynthese, die allerdings den Proteingehalt der Zellen auf dem Niveau der 2 Tage alten Kontrolle zu halten vermag (* $p < 0,05$ vs. C 2d).

3.2.4 Effekte von Cardiotrophin ähnlichen Zytokinen

In den Versuchen wurden, repräsentativ für die Gruppe der Cardiotrophin-ähnlichen Zytokine, zwei starke Induktoren kardialer Hypertrophie im neonatalen Herzen, Leukemia inhibitory factor (LIF) und Interleukin-11 (IL-11), überprüft. Die Versuche wurden mit 100 ng/ml LIF (Abbildung 3.8a) bzw. 100 ng/ml Interleukin 11 (Abbildung 3.8b) durchgeführt.

Morphologie. Morphologisch konnten in der adulten Ratte bei Anfärbung des Cytoskeletts mit α -Aktinin bei beiden Faktoren vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. Die Zellen blieben in den Kulturen länglich und schmal und zeigten an den Zellenden kurze Ausläufer. Unter der Stimulation mit LIF war die Zellgröße in etwa erhalten, die in frischen Zellen organisierte Anfärbung für α -Aktinin zeigte zwar noch ihre typische Quersteifung, aber nicht mehr die zelluläre Verteilung. Die einzelnen Sarkomerenstränge lagen ungeordnet in der Zelle, sie waren gut gegen die anderen Sarkomeren abzugrenzen. Unter IL-11 zeigte sich im Vergleich zu LIF ein ganz ähnliches Bild.

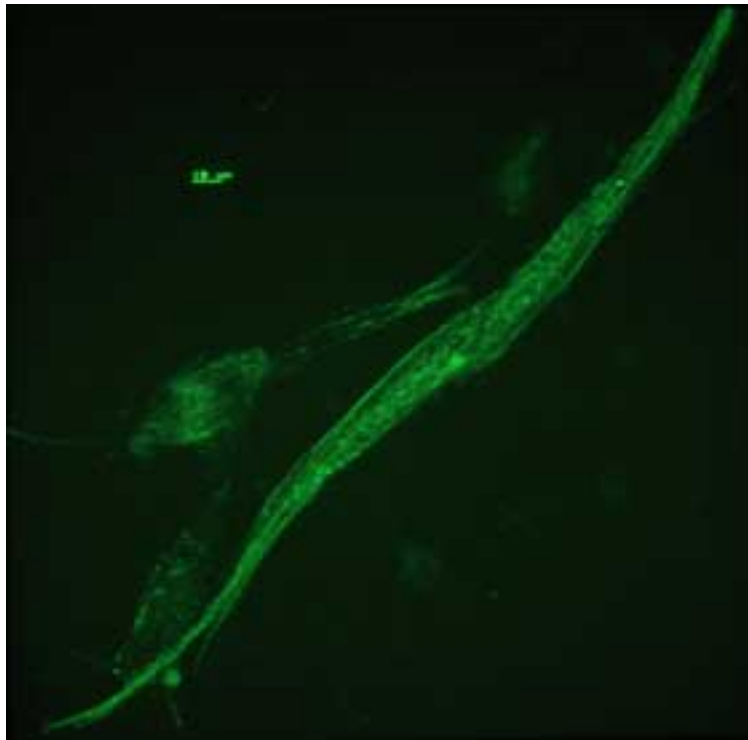


Abbildung 3.8 a Zellen nach 8 Tagen Stimulation mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

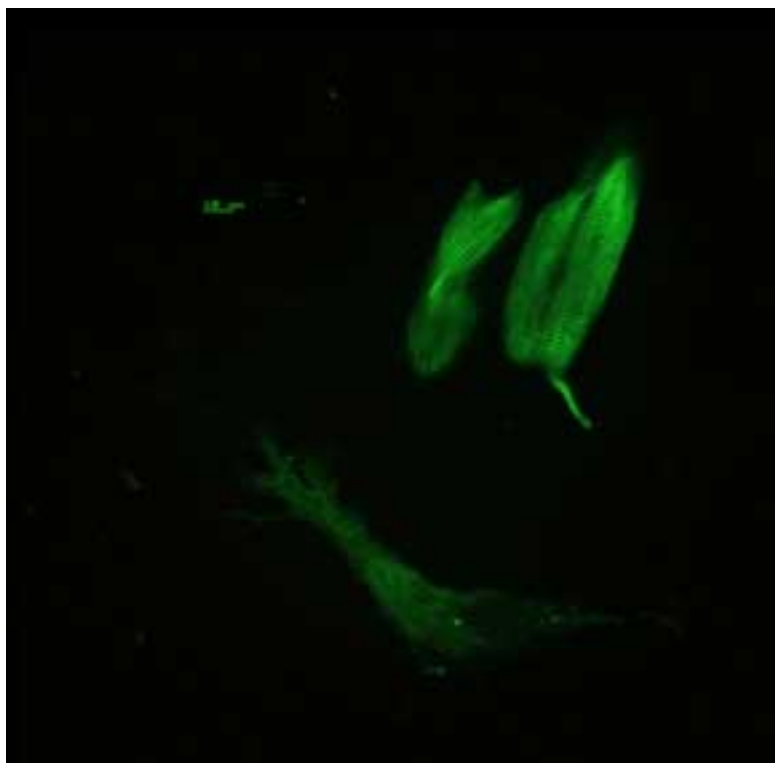


Abbildung 3.8 b Zellen nach 8 Tagen Stimulation mit Interleukin-11 (IL-11)

Proteinsynthese und Gehalt. Die Proteinsynthesewerte für LIF ($1873,3 \pm 359,9$ cpm / μg DNA) und IL-11 ($1843,0 \pm 193,7$) lagen am achten Tag in beiden Fällen nur leicht über den jeweiligen Kontrollkulturen von 2 (1388 \pm 35,4) oder 8 Tage (1161,3 \pm 324,7) alten Zellen. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Bei der Messung des Proteingehalts konnte man dann eine deutliche Abnahme des Gehalts in durch LIF und IL-11 stimulierten Zellen sehen. Er bewegte sich mit $60,4 \pm 25,2$ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA für LIF und $38,1 \pm 4,2$ für IL-11 auf dem Niveau der 8 Tage alten Kontrolle ($54,3 \pm 9,2$). Die 2 Tage alte Kontrolle hingegen wies noch einen Gehalt von $95 \pm 8,5$ μg auf.

Zusammenfassend findet man unter den Cardiotrophin-ähnlichen Zytokinen keine Förderung der Adaption an die Kultur (Dedifferenzierung). Die nicht signifikant erhöhte Proteinsynthese stabilisiert den Proteingehalt nicht, der unter Stimulation mit IL-11 sogar noch unter den entsprechenden Kontrollwert absinkt.

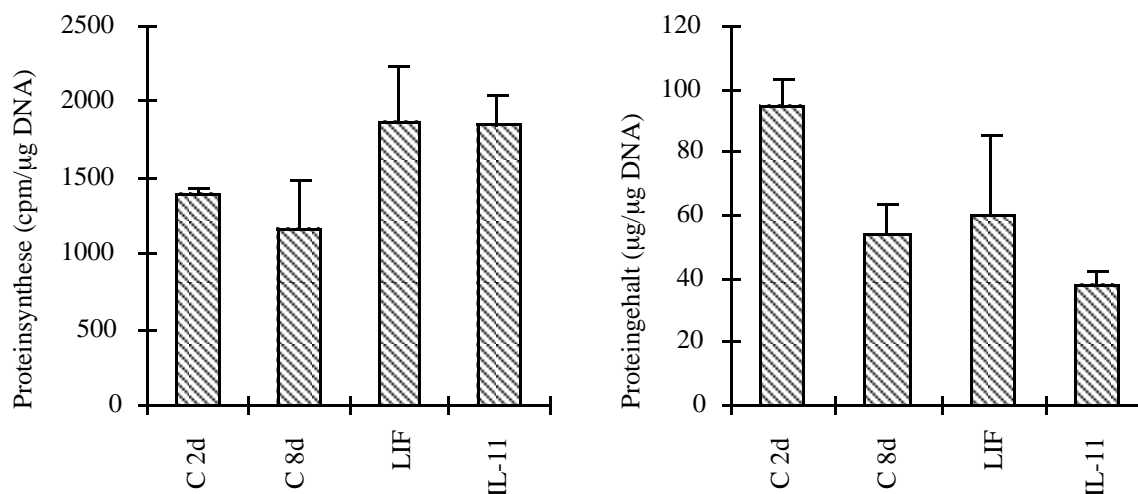


Abbildung 3.8 c&d Proteinsynthese (c) und -gehalt (d) bei Wachstum unter 100 ng/ml LIF und IL-11. Man sieht einen nicht signifikanten Anstieg der Proteinsynthese und einen starken Abfall des Proteingehalts auf Werte im Bereich der nichtstimulierten atrophischen Kontrolle.

3.2.5 Effekte von ECGS allein und in Kombination mit IGF I&II

Morphologie. Zugabe von ECGS zu Kulturen von frisch isolierten Myozyten in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ECGS hatte keinen Effekt auf die Morphologie der Zellen im Vergleich zu serumfrei kultivierten Zellen. In einer Konzentration von 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ rief ECGS die stärksten morphologischen Veränderungen hervor. Diese Veränderungen waren gekennzeichnet durch einen relativ großen Zellkörper mit feinen Ausläufern und stellten vom Phänotyp am ehesten eine Mischung aus serumhaltigen Kulturen mit IGF-Stimulation dar. Die Oberfläche der Zellen hatte sich vergrößert, an allen Seiten fanden sich kleine Ausläufer, die die Zelle in ihrer Umgebung verankerten. Die α -Aktinin Färbung fiel in diesen Kulturen ähnlich wie unter Serum-Stimulation aus. Es fand sich eine starke Querstreifung, die neugebildeten Sarkomeren liefen von einem Verankerungspunkt in der Peripherie in die Zelle hinein und füllten die ganze Zelle aus. Die Zahl der Zellen in der Schale blieb hoch, es kam zu einer starken Dedifferenzierung der Zellen.

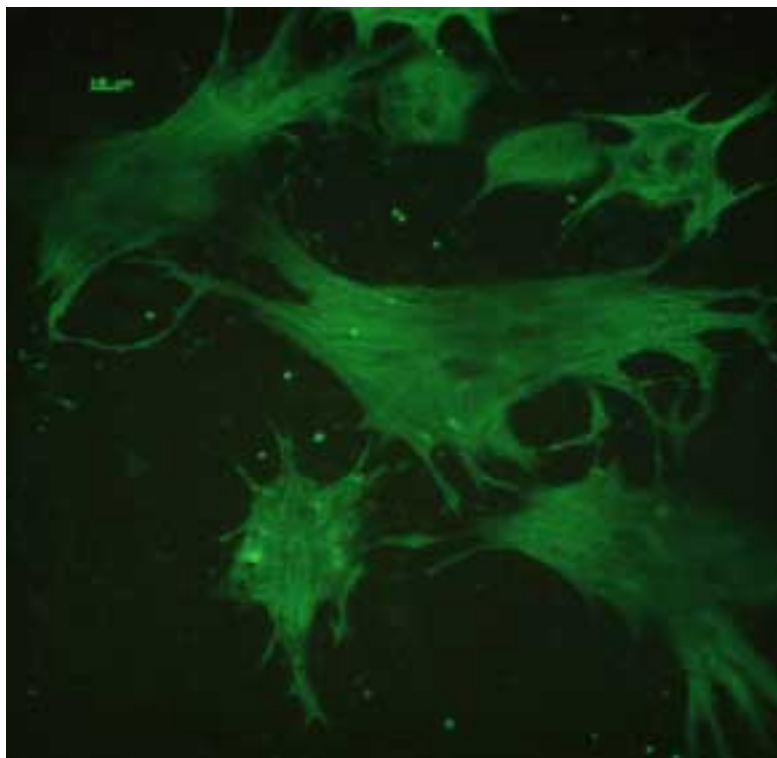


Abbildung 3.9 a Adult Rattenkardiomyozyten (ARCM) in Kultur unter dem Einfluß von ECGS, man sieht die Vergrößerung der Zelle mit einer sehr regelmäßigen Querstreifung durch die Anfärbung des α -Aktinin.

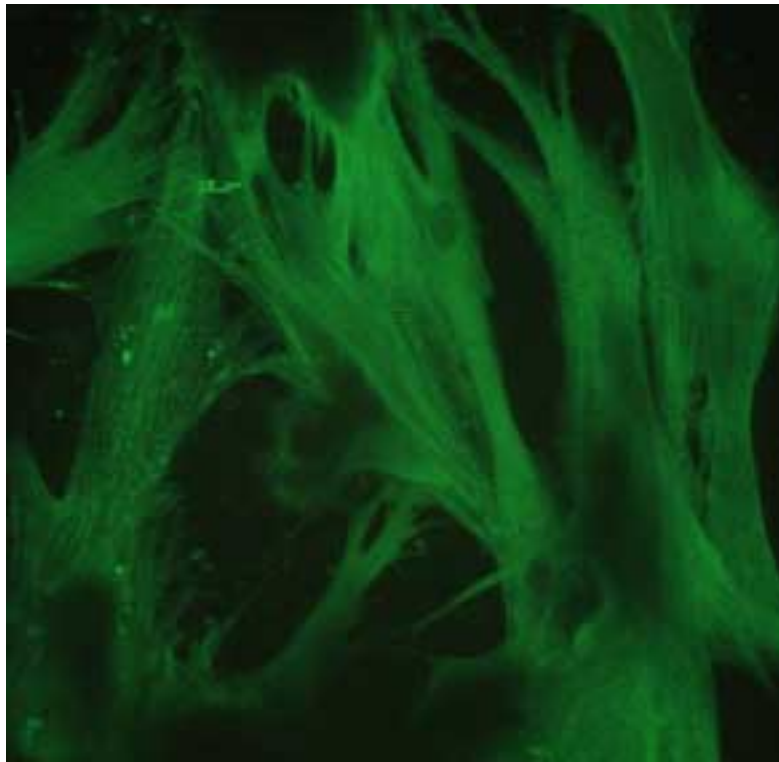


Abbildung 3.9 b ARCM 8 Tage unter dem Einfluß von ECGS unter Zusatz von IGF-I kultiviert

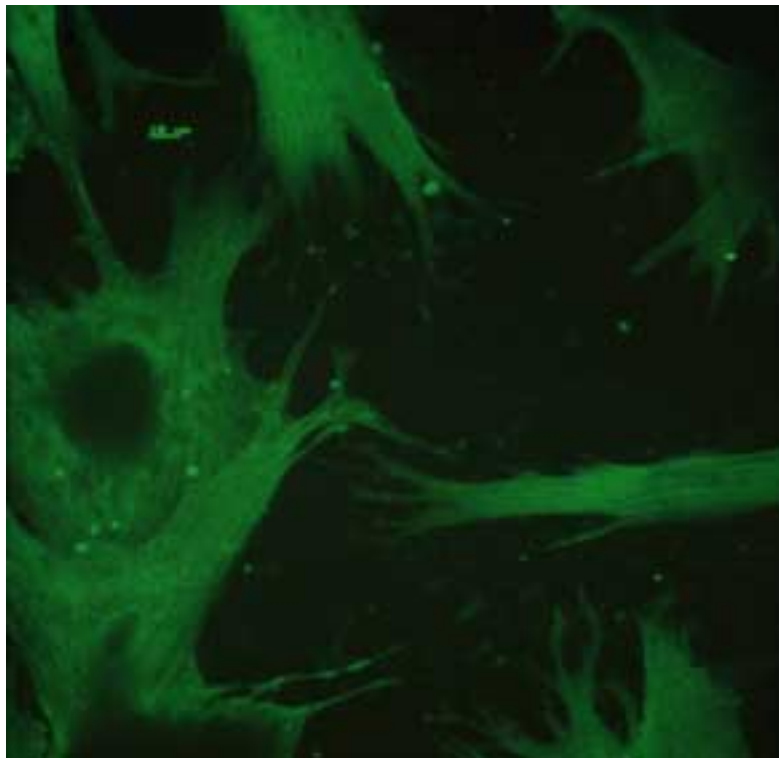


Abbildung 3.9 c ARCM 8 Tage unter dem Einfluß von ECGS unter Zusatz von IGF-II kultiviert

Durch den Zusatz von IGF-I respektive IGF-II wurde untersucht, ob die Wirkung von beiden Wachstumsfaktoren zusammen mit ECGS additiv ist, oder ob sich der Phänotyp durch diesen Zusatz modulieren läßt. In den folgenden Abbildungen sieht man das Ergebnis dieser Versuche. Der Zusatz von 500 ng / ml IGF-I (Abbildung 3.9 b) zu den ECGS stimulierten Kulturen ließ die Zelle insgesamt viel großflächiger erscheinen und die vielen kurzen Ausläufer waren nicht so akzentuiert. Die Ausläufer waren in ihrer Zahl reduziert und viel dicker als unter ECGS-Stimulation alleine. Zellen, die unter ECGS Stimulation noch eher vereinzelt waren, hatten nun durch die erheblich größere Zelloberfläche direkten Kontakt zueinander. Im Inneren der Zelle erschien die Querstreifung durch das α -Aktinin nicht so regelmäßig und geordnet, wie unter reinem ECGS. Neben normaler Querstreifung gab es auch Areale, in denen die Färbung eher punktförmig erschien, Hinweis auf eine zunehmende Ausdünnung dieser Sarkomeren.

Die Kulturen, die durch IGF-II stimuliert worden waren, waren schon makroskopisch leicht von den anderen zu unterscheiden (Abb. 3.9c). Sie waren durch den Zusatz von 500 ng / ml IGF-II stimuliert worden und zeigten neben der großen Wachstumsfläche, wie unter Zusatz von IGF-I beobachtet, sehr lange, dicke und relativ organisierte Ausläufer. Diese Ausläufer fanden in der Peripherie dann Kontakt zu den Nachbarzellen. Man konnte diese Ausläufer bis in die Peripherie intensiv mit Antikörpern für α -Aktinin anfärben.

Proteinsynthese und Gehalt. In der verwendeten Konzentration von 250 μg / ml stimulierte ECGS die Proteinsynthese ($5337,5 \pm 215,5$ cpm/ μg DNA). Es kam zu einer etwa 5-fachen Steigerung gegenüber den Kontrollzellen (C 8d) mit $1161,3 \pm 324,7$ cpm (* $p < 0,05$). Der Proteingehalt dieser Zellen unter ECGS-Stimulation zeigte im Vergleich zur 2 Tage alten Kontrolle eine Steigerung, wie sie in den Versuchen zuvor in ähnlicher Weise nur unter Stimulation mit Serum (107 μg) gesehen worden war. Während die Kontrolle sich am achten Tag (C 8d) bei $54,3 \pm 9,2$ μg / μg DNA bewegte, gab es unter ECGS eine signifikante Steigerung auf $111,6 \pm 16,1$ μg ($p < 0,05$). Eine über diese markante Wirkung des ECGS hinausgehende Wirkung auf die Proteinsynthese konnte man durch Zusatz von IGF-I bzw. -II zu diesen Kulturen erzeugen. Lag ECGS alleine noch bei 5337 cpm / μg DNA, so zeigte sich eine weitere Steigerung dieser Synthese unter IGF-I auf $7741,8 \pm 1814,5$ cpm und unter IGF-II auf $7986,3 \pm 1110,1$ cpm. Diese erhöhten Proteinsynthesewerte schlugen sich dann in der Folge auch in einem leicht erhöhten Proteingehalt nieder (IGF-I $124,4 \pm 13,5$ μg ; IGF-II $111,0 \pm 30,3$ μg), der allerdings nicht signifikant war im Vergleich zur ECGS-Stimulation.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Stimulation von Kardiomyozyten sowohl mit ECGS alleine als auch in der Kombination mit den IGFs zu einer signifikanten Steigerung der Proteinsynthese in der Lage ist, die sich am achten Tag in Kultur auch in einem erhöhten Proteingehalt niederschlägt. Dabei wirkt die Zugabe von IGF-I als auch IGF-II zu den mit ECGS behandelten Zellen additiv auf die Proteinsynthese.

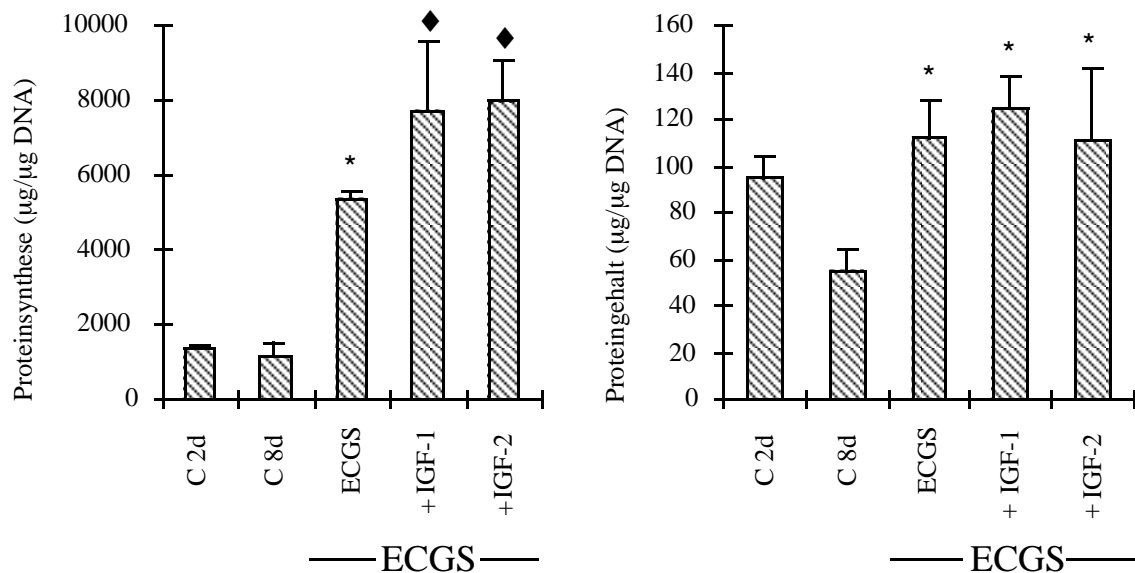


Abbildung 3.9 d&e Proteinsynthese (d) und -gehalt (e) von Zellen unter dem Einfluß von ECGS alleine und in Kombination mit IGF-I, IGF-II. Man sieht die deutlich beschleunigte Proteinsynthese, die sich auch in einem erhöhten Proteingehalt der Zellen niederschlägt (* signifikant mit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle C 2d, ♦ signifikant mit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle C 2d und ECGS stimulierten Zellen).

3.2.6 Effekte des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- β_1)

Morphologie. Der Transformierende Wachstumsfaktor beta 1 wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Zellen, die 8 Tage mit TGF- β_1 stimuliert worden waren, änderten ihre rechteckige Form nur wenig. Die Zellen waren relativ lang, schmal und an ihren Enden hatten sie sich durch kurze Ausläufer an die Schale angeheftet. Die Fluoreszenz durch die Färbung des α -Aktinin war eher diffus, eine regelmäßige Querstreifung wie unter Serum und ECGS war nur unscharf zu erkennen. Eine starke Abnahme der Zellzahl wurde allerdings nicht beobachtet.

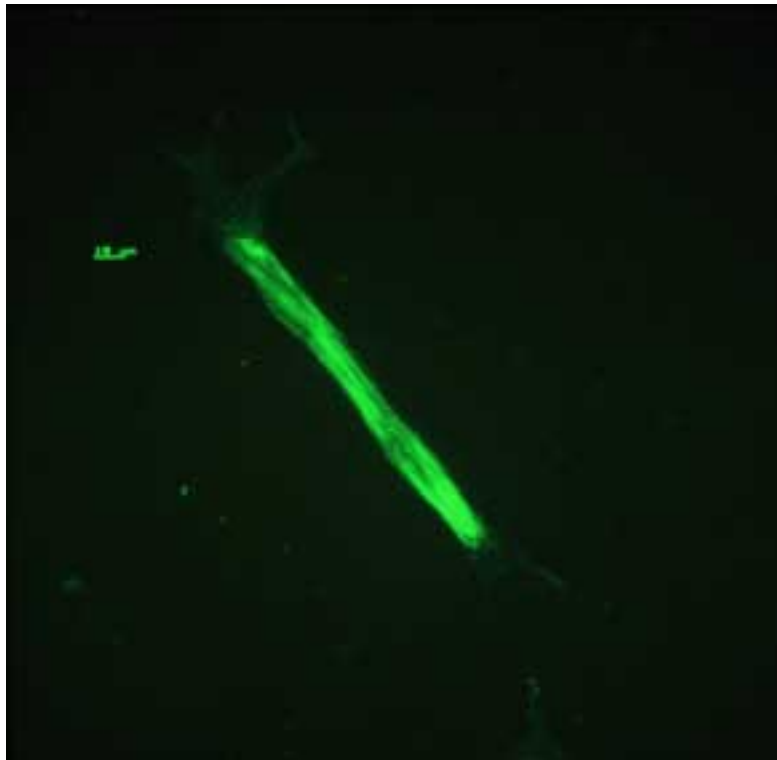


Abbildung 3.10 a α -Aktinin-Färbung eines Myozyten unter dem Einfluß von TGF- β_1 . Man sieht die längliche Form, die Zelle sind an ihren Enden angeheftet, die Flureszenz für α -Aktinin ist eher diffus.

Proteinsynthese und Gehalt. Untersuchte man die Wirkung von TGF- β_1 auf den Proteinumsatz der Zellen, so sah man eine relativ deutliche, allerdings nicht signifikante Abnahme der Proteinsynthese, wie sie vorher bei keinem anderen Stimulans aufgetreten war.

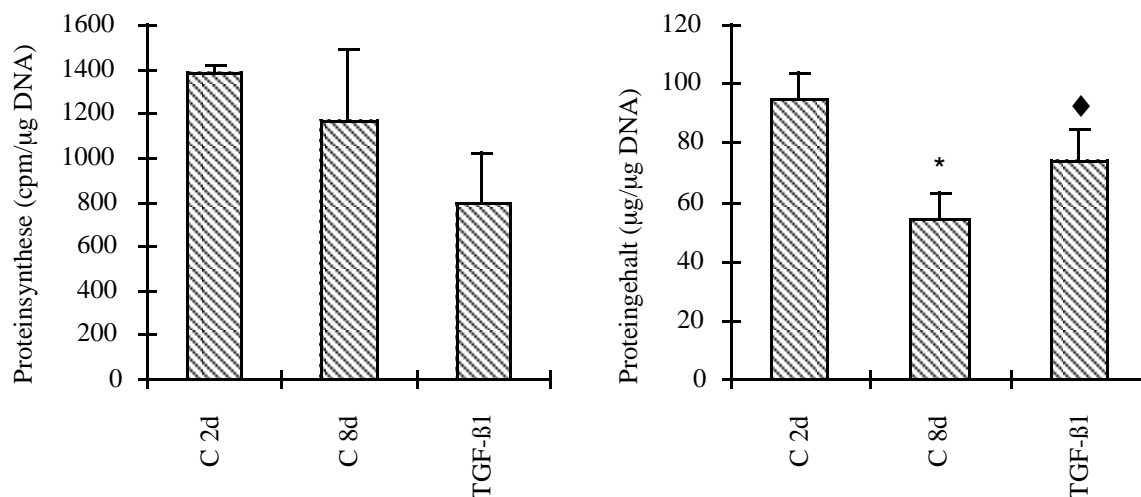


Abbildung 3.10 b&c Proteinsynthese und Gehalt von Myozyten unter dem Einfluß von TGF- β_1 . Man sieht die extrem niedrige Synthese unter TGF- β_1 Zusatz, die allerdings mit einer Präservation des Proteingehalts einhergeht.

Während selbst in der 8 Tage alten Kontrolle (C 2d) noch Werte von $1161,3 \pm 324,7$ cpm / μg DNA erreicht wurden, fanden sich unter Stimulation mit TGF- β_1 nur $797,3 \pm 220,7$ cpm. Bei der Messung des Proteingehalts zeigte sich dann eine andere Situation. 8 Tage alte Kulturen waren von einem 2 Tage-Wert von $95 \pm 8,5$ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA auf einen Wert von $54,3 \pm 9,2$ μg atrophiert. Der Zusatz von TGF- β_1 vermochte diese Atrophie zwar nicht ganz aufzuhalten, bewirkte aber eine gegenüber der 8 Tage alten Kontrolle signifikante Erhöhung des Proteingehalts auf $73,8 \pm 10,8$ μg ($p < 0,05$). TGF- β_1 wirkte also in diesem System eher konservierend auf die Proteine des Myozyten, es wurden wenig Proteine gebildet und noch weniger abgebaut und auch in der Morphologie fand man dazu ein Korrelat, indem die Myozyten sich nicht wesentlich veränderten gegenüber der frischen Kontrolle. Im folgenden Abschnitt 3.2.6 wird nun gezeigt, wie sich diese Eigenschaft des TGF- β_1 im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren (ECGS, ein Wachstumsfaktorengemisch) auf das Verhalten der Myozyten auswirkt.

3.2.7 Der Effekt einer Zugabe von TGF- β_1 auf Kulturen mit ECGS

Unter Zusatz von ECGS war es in den vorangehenden Versuchen zu einer starken Dedifferenzierung und Adaption der Zellen an die Kultur gekommen. Während die IGFs diese Wirkung noch verstärken konnten, ließ das Verhalten von TGF- β_1 -stimulierten Zellen eine gänzlich unterschiedliche Wechselwirkung zwischen diesen Faktoren vermuten. Daher wurde zu ECGS-stimulierten Zellen 10 ng TGF- β_1 hinzugefügt.

Morphologie. Die Ergebnisse dieser Wechselwirkung sieht man in Abbildung 3.11 a. Diese Kombination zeigte eine Präservierung des Zytoskeletts des Myozyten. Die morphologischen Veränderungen durch ECGS wurden durch TGF- β_1 fast vollständig blockiert. Es fand sich keine Vergrößerung der Zelloberfläche, keine Zellausläufer und keine Neuorganisation kontraktilen Materials, soweit die α -Aktinfärbung diese Aussage erlaubt.

Proteinsynthese und Gehalt. Genauso wie TGF- β_1 die morphologischen Veränderungen durch ECGS zu blockieren wußte, reduzierte es auch die Proteinsynthese von einem Wert von $5337,5 \pm 215,5$ cpm / μg DNA für reine ECGS-Stimulation auf $3160,0 \pm 179,5$ cpm (* $p < 0,05$). Zum Vergleich sind in den Abbildungen auch die Werte von IGF-Zusatz mit aufgeführt. Diese Behinderung der Proteinsynthese war aber keineswegs mit einer Atrophie der Zellen verbunden. Der Proteingehalt für die Kombination mit TGF- β_1 unterschied sich keineswegs von denen der anderen ECGS-Kombinationen (~ 110 $\mu\text{g} / \mu\text{g}$ DNA).

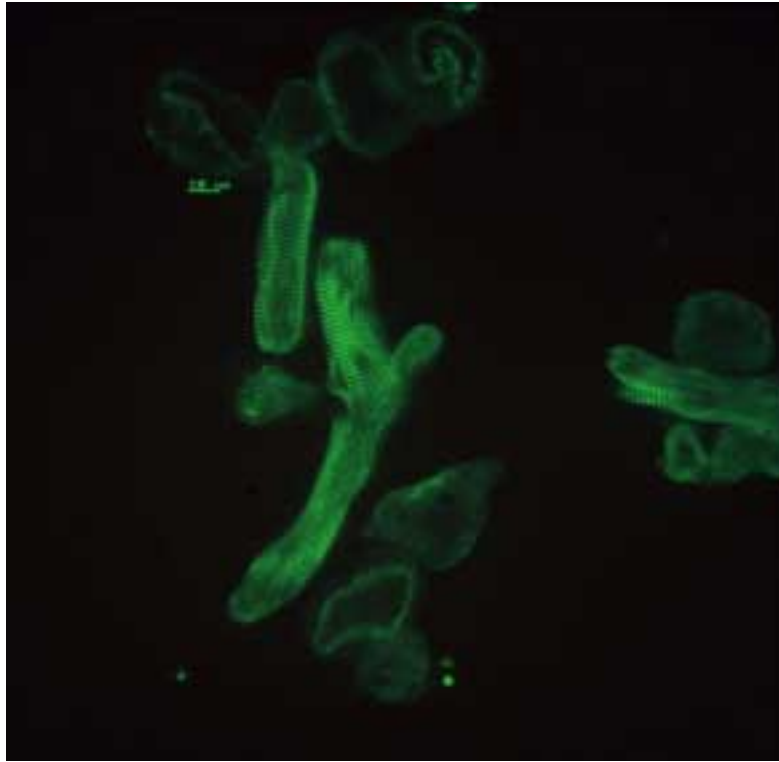


Abbildung 3.11 a ARC unter dem Einfluß von ECGS und TGF- β_1 . Man sieht die Präservierung der Morphologie und die regelmäßige Querstreifung durch die Anfärbung mit α -Aktinin.

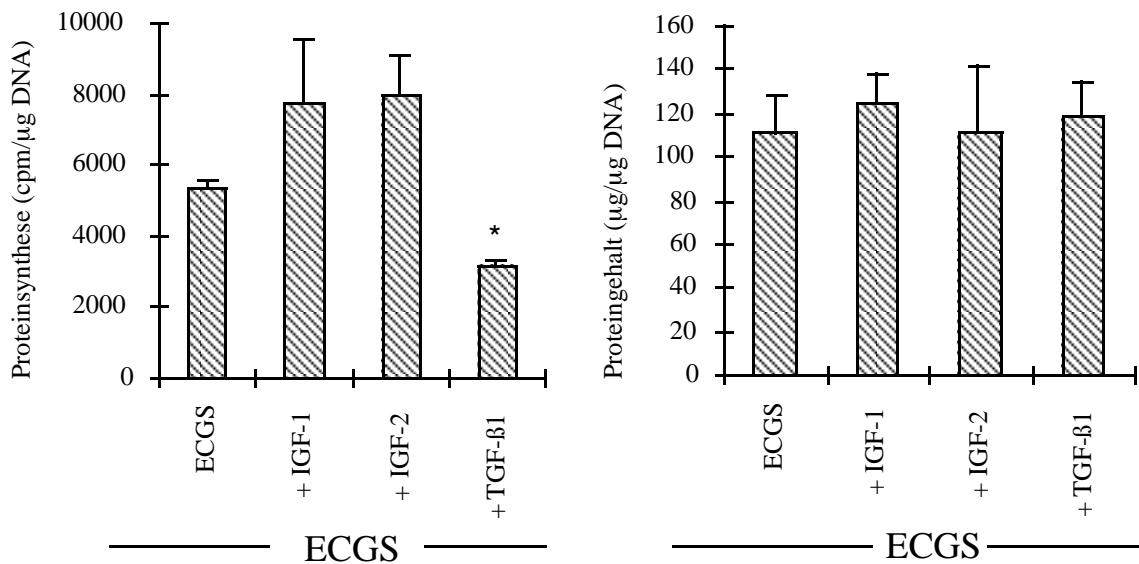


Abbildung 3.11 b&c Proteinsynthese und Gehalt von Zellen unter dem Einfluß von ECGS alleine und in Kombination mit IGF-I, IGF-II und TGF- β_1 . Zu sehen ist die Blockierung der beschleunigten Proteinsynthese unter TGF- β_1 Zusatz mit den konstant hohen Werten für den Proteingehalt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß TGF- β_1 zu einer moderaten Proteinsynthese führt, die sich dann allerdings direkt in einer Zunahme des Proteingehalts niederschlägt, da es die Degradation der Proteine hemmt. Die Präservierung der Proteine zeigt sich somit auch direkt in einer Präservierung der typischen Morphologie. TGF- β_1 wirkt damit als Differenzierungshormon und seine Zugabe zu Myozytenkulturen führt zu einem Ausbleiben der Dedifferenzierung.

3.2.8 Zusammenfassung der Wirkung von Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Synthese	Gehalt	Degradation	Dedifferenzierung	Kontraktion
IGF-I	++ (2,1x)	- (0,7x)	+++	++	+
IGF-II	++ (2,1x)	- (0,7x)	+++	++	+
FGF-1	+ (1,5x)	o (1x)	+	o	o
FGF-2	+ (1,7x)	o (1x)	+	+	o
LIF	+ (1,3x)	- (0,6x)	+	o	o
IL-11	+ (1,3x)	-- (0,4x)	++	o	o
TGF- β_1	- (0,6x)	- (0,8x)	o	o	o
ECGS	++ (3,9x)	+ (1,2x)	+	++	+
ECGS + IGF-I	+++ (5,6x)	+ (1,3x)	+	+++	++
ECGS + IGF-II	+++ (5,8x)	+ (1,2x)	++	+++	++
ECGS + TGF- β_1	++ (2,3x)	+ (1,2x)	+	o	o
20% Serum	+++ (7x)	+ (1,1x)	++	++	++

Tabelle 3.12 Wirkung der WF auf den Proteinumsatz der Kardiomyozyten: Bei der Angabe der Synthese ist “-” < 1x, “o” 1x, “+” 1-2x, “++” 2-5x und “+++” > 5x der 2 Tage alten Kontrolle. Der Gehalt “-” < 1x, “o” 1,0x und “+” > 1,0x der Kontrolle (2 Tage). Die Degradation als Verlust an zellulärem Protein ist jeweils die Differenz zwischen den Werten aus Synthese und Gehalt. Unter “Dedifferenzierung” wird die lichtmikroskopische Restrukturierung der Zellen in der Kultur verstanden. Der morphologische “Dedifferenzierungs Score” fängt mit unveränderten Zellen bei “o” an und geht bis maximale Veränderung “+++”.

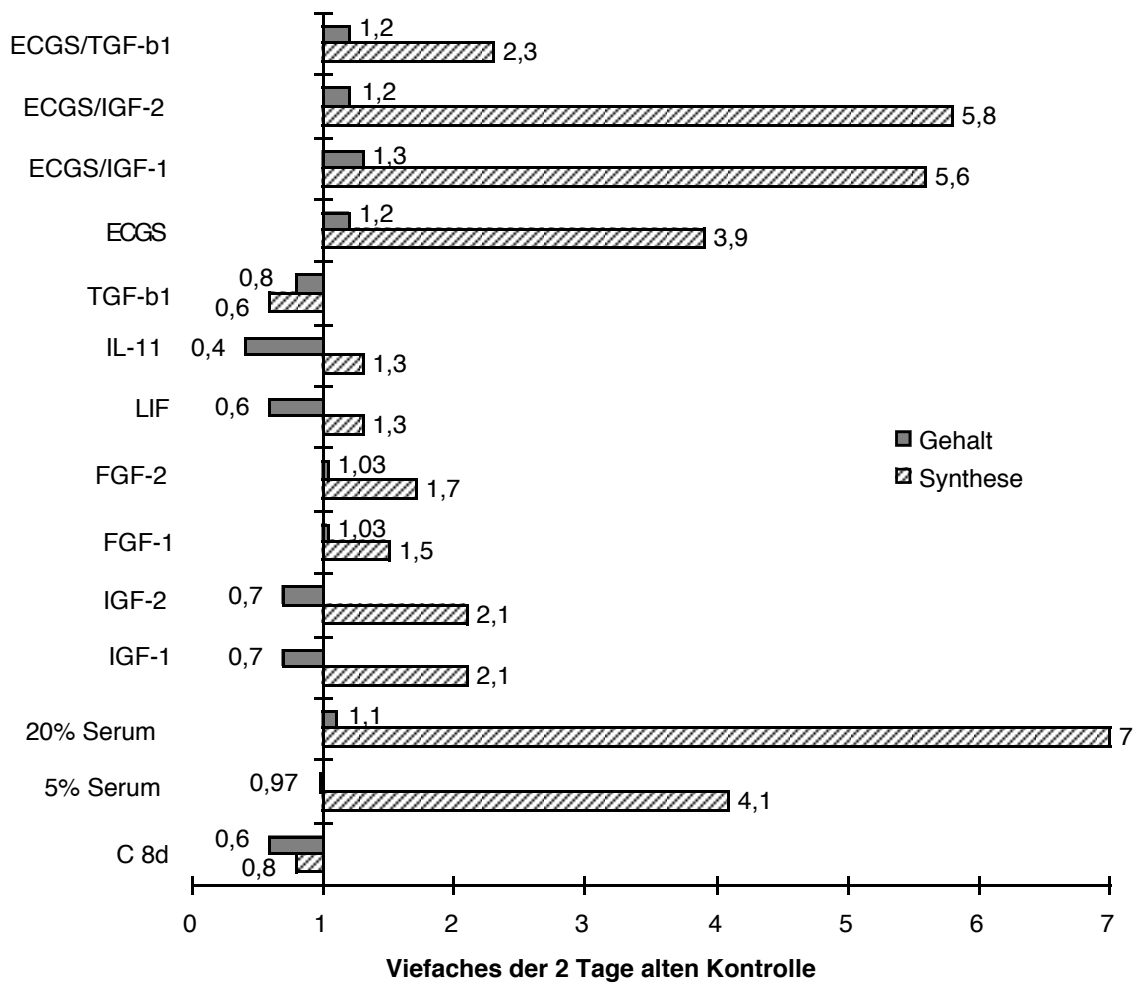


Abbildung 3.12 Graphische Darstellung der Proteinsynthesemessungen am 8. Tag. Werte sind Vielfache der 2 Tage alten Kontrolle (Proteinsynthese und Proteingehalt = 1)

3.2.9 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die kontraktile Aktivität der Myozyten

Unter der Wirkung von IGF I&II, dem Hypophysenextrakt ECGS und Serum kam es zu einer erhöhten Rate an spontanen Depolarisationen / Kontraktionen der Zellen. Diese Erhöhung war besonders gut in Kulturen zu beobachten, die stark dedifferenziert waren. Die Zellen verloren früh ihre typische Morphologie und breiteten sich auf der Zellkulturschale aus. Mit dem vierten Tag in Kultur setzte spontane kontraktile Aktivität ein, die sich später synchronisierte. Es entstand eine rhythmisch kontrahierende Zellschicht mit Querverbindungen unter den Zellen, wie sie für die *in-vivo*-Situation typisch ist. Unter dem Einfluß der Wachstumsfaktoren FGF-1 und 2, sowie LIF und IL-11 waren in dieser Hinsicht keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle zu bemerken. Die Zellen paßten sich von daher nur langsam an die Kulturbedingungen an und erreichten bei weitem nicht den Dedifferenzierungsgrad der Zellen unter Serum oder IGF-Stimulation. War erst einmal spontane Aktivität in den Kulturschalen entstanden, so kam es zu einer beschleunigten Dedifferenzierung der Zellen. In den ersten Tagen nach Isolierung (Tag 1-4) dedifferenzierten die Zellen vor allem unter dem Einfluß von IGF, ECGS und Serum. Setzte mit dem 5. Tag in Kultur spontane Aktivität der Myozyten ein, so kam es zu einem starken Anstieg dieser Dedifferenzierung während der folgenden Tage. Dabei entwickelte sich ein Circulus vitiosus, in dem Dedifferenzierung spontane Kontraktionen der Zellen auslöst, diese das Wachstum fördern und der Dedifferenzierung Vorschub geben.

Der Transformierende Wachstumsfaktor wirkte spontanen Depolarisationen eher entgegen. Zum einen vermochte er die spontane Aktivität der Zellen schon nach Kulturbeginn fast vollständig zu unterbinden, zum anderen hob er die erhöhte kontraktile Aktivität unter der Kombination von ECGS und IGF-I&II auf. Diese Wirkung fand ihr Korrelat in der verminderten Dedifferenzierung von TGF- β_1 behandelten Kulturen.

3.3 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Der apparative Aufbau wird im technischen Anhang (siehe Kapitel 6) näher besprochen. Als Ergebnis der Vorversuche stellte sich die im Teil “Material & Methoden” beschriebene Variante heraus, die in den Versuchen Verwendung fand.

3.3.1 Verhalten der Zellen unter elektrischer Feldstimulation

Reaktion der Zellen auf den Stromimpuls. Bei Stimulationsbeginn zeigten $> 90\%$ der Zellen keine spontanen Kontraktionen (Abb. 3.13 a). Durch das Einschalten des Stroms konnte bei etwa 80 % der Zellen eine initiale, vergleichsweise starke Kontraktion ausgelöst werden, deren Amplitude bei den nun folgenden Kontraktionen absank und sich auf einem etwas niedrigeren Niveau stabilisierte (Negative staircase). Während ein Teil der Zellen auf jeden Impuls hin kontrahierte, reagierten andere dagegen nur auf jeden zweiten Reiz. Versuche mit einer kreuzweisen Anordnung der Elektroden zeigten, daß die Zellen nur bei dem Elektrodenpaar kontrahierten, bei der die Längsachse der Zelle weitgehend senkrecht zur

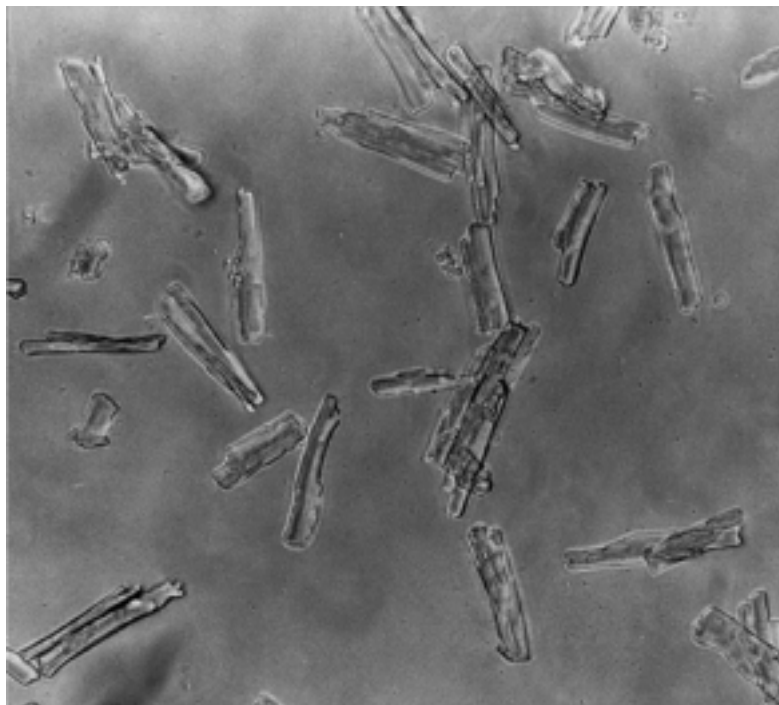


Abbildung 3.13 a Frisch isolierte Myozytenpopulation (160 x Vergrößerung)

Elektrode lag. Nahm man hier alle Zellen zusammen, die evtl. auch nur bei jedem zweiten Impuls kontrahierten, erreichte man mit dieser kreuzweisen Anordnung eine Depolarisation von $> 95\%$ der Zellen. Damit war gezeigt, daß die Ansprechbarkeit für die Depolarisation abhängig war von der Ausrichtung der Zellen im elektrischen Feld. In dem verwendeten Modell mit einem Elektrodenpaar veränderte sich der prozentuale Anteil der kontrahierenden Zellen über 24 h nicht. Zellen die vor Stimulationsbeginn spontane Aktivität gezeigt hatten, wurden durch den Stimulationsimpuls synchronisiert, so daß während der Stimulationszeit keine spontane Kontraktion auftrat. Schaltete man nach Stimulationsende den Strom ab, kamen die Zellen in der Schale zur Ruhe, es fand sich keine Kontraktion ohne Stimulus. Im Anschluß an die Stimulation dauerte es einige Zeit, bis diese spontane Aktivität wieder auftauchte. Ein erneutes Einschalten des Reizes führte dann zur Synchronisation.

Morphologische Veränderungen der Zellen während der EFS. Die Zellen wurden für 24h stimuliert. Dabei konnte ein über einen initialen Schwund hinausgehendes Absterben nicht beobachtet werden. Das galt sowohl für die Stimulations- als auch für die Kontrollschalen. In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Stimulationszeit auf 24 Stunden begrenzt, da die Initiation dieser Ereignisse und nicht so sehr das Endprodukt einer solchen Veränderung interessant war. Nach Ablauf dieser Zeit hatten sich in den Kontrollschalen einige Zellen abgerundet, die zu Beginn des Experiments länglich gewesen waren (Abb. 3.13 b).



Abbildung 3.13 b Myozytenmorphologie nach 24h Kultur (160 x Vergrößerung). Die länglichen Zellen zeigen im Gegensatz zu frischen Zellen abgerundete Zellenden.



Abbildung 3.13 c Myozytenmorphologie nach 24h Stimulation (160 x Vergrößerung). Man sieht ein der Kontrollkultur vergleichbares Bild mit einer Vielzahl an länglichen Myozyten und einigen abgerundeten Zellen.

Die Zahl dieser Zellen lag bei etwa 5 %. In den Schalen, die über 24 Stunden stimuliert worden waren, konnte man einen den Kontrollen entsprechenden Schwund feststellen (Abb. 3.13 c). Ein über dieses Absterben hinausgehende Verminderung der Zellzahl gab es nicht. Die Zellen in der Kontrollschale hat im Vergleich zur frischen Kontrolle, die eher eckig, unmittelbar aus dem Zellverband entfernt aussieht, eher rundere Enden. Die längliche Form ist jedoch gut erhalten. Sieht man sich im Vergleich dazu die Zellen nach 24h Feldstimulation an, so bemerkt man keinen Unterschied hinsichtlich der Morphologie.

3.3.2 Proteinsynthese und -gehalt bei elektrischer Feldstimulation

Zur biochemischen Beschreibung der Umbauvorgänge unter EFS wurde die Synthese und den Gehalt an Protein durch radioaktive Markierung mit Phenylalanin, die totale RNA mit radioaktivem Uridin und den Gehalt an mRNA mittels eines Dot-Blot bestimmt. Die Kulturen sind unter elektrischer Feldstimulation in Anlehnung an die Literatur [1, 79] unter Zusatz von Insulin und Triiodothyronin (T_3) kultiviert und haben so eine höhere basale Proteinsyntheserate als in den Versuchen zur Wachstumsfaktorenwirkung.

Proteinsynthese und Gehalt. Die Proteinsynthese nahm nach 24h Stunden EFS deutlich zu (Abb. 3.14 li.). Der Kontrollwert lag nach 24h EFS noch bei $2744,7 \pm 420,0$ cpm/ μ g DNA, unter EFS war dieser Wert mit $4447,2 \pm 807,2$ signifikant erhöht (* $p < 0,05$). Diese erhöhten Werte für die Proteinsynthese fanden sich allerdings nicht in einem erhöhten Proteingehalt der Zellen nach 24h wieder (Abb. 3.14 re.). Der Wert nahm sogar eher noch leicht ab und betrug unter EFS $87,2 \pm 7,3$ μ g gegenüber $93,6 \pm 17,9$ μ g / μ g DNA bei der entsprechenden Kontrolle.

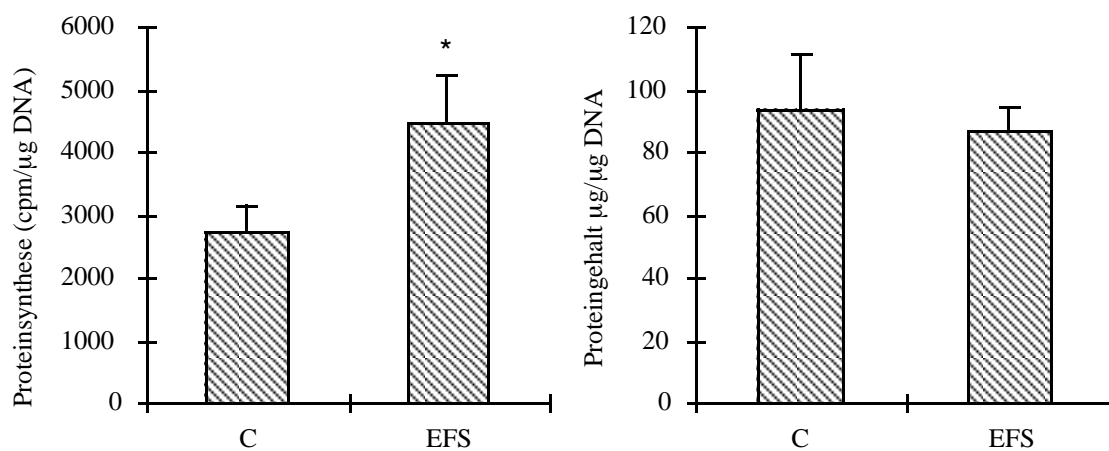


Abbildung 3.14 Unter EFS zeigt sich eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Proteinsynthese (* $p < 0,05$), die allerdings nicht in einem erhöhten Proteingehalt resultiert.

Vergleicht man das Verhalten der Zellen unter EFS mit dem unter Wachstumsfaktoren, so ist die Wirkung am ehesten mit den IGFs zu vergleichen. Eine hohe Syntheseleistung ist mit einer gesteigerten Proteindegradation verbunden und führt in der Summe zu keiner Veränderung im Proteingehalt.

RNA-Synthese und Gehalt. Die Messung der RNA gibt einen Einblick in die synthetische Kapazität der Zellen (Abb. 3.15). Bei der Initiation einer Hypertrophie nimmt zuerst die Synthesekapazität, d.h. der rRNA-Gehalt der Zellen zu, um dann in einer erhöhten Proteinsynthese zu resultieren. Genau dieses Muster beobachtete man hier unter EFS in den ersten 24h nach Stimulationsbeginn (Abb. 3.15 li.). Die RNA-Synthese nahm von einem Wert von $20.313 \pm 1847,4$ cpm auf $26.108,2 \pm 5954,5$ cpm / $\mu\text{g DNA}$ zu und war damit signifikant (* $p < 0,05$). Die erhöhte RNA-Synthese resultierte dann auch direkt in einem erhöhten RNA-Gehalt der Zellen (Abb. 3.15 re.). Hatten die Zellen in den Kontrollschalen noch $0,62 \pm 0,06$ $\mu\text{g RNA} / \mu\text{g DNA}$ so erhöhte sich dieses Verhältnis unter EFS auf $0,74 \pm 0,10$ $\mu\text{g} / \mu\text{g DNA}$ (* $p < 0,01$). Insgesamt ließ sich hier eine erhöhte RNA-Synthese finden, die zu einer Erhöhung des RNA-Gehalts in der Zelle führte.

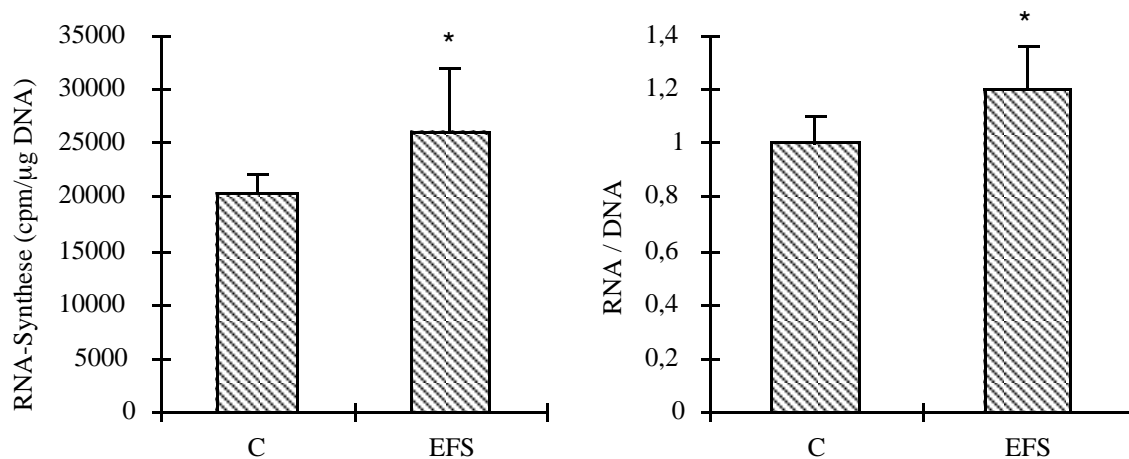


Abbildung 3.15 Der Einfluß der EFS erzeugt eine signifikante Erhöhung der RNA-Synthese ($p < 0,05$). Diese erhöhte Synthese findet sich auch in einem erhöhten RNA-Gehalt der Zellen wieder ($p < 0,01$).

mRNA Gehalt. Die mRNA wird im Zellkern synthetisiert und dient im Zytosol als Matrize für die Synthese der zellulären Proteine. Zur Beurteilung einer insgesamt erhöhten mRNA-Expression wurde im Dot-Blot $1 \mu\text{g}$ totale RNA mit einem Oligomer aus Thyminbasen hybridisiert. Es bindet unter entsprechend stringenten Bedingungen fast ausschließlich an den langen Poly-A-Schwanz der mRNAs. Die Werte wurden im Vergleich zur Gesamt-RNA gemessen, bilden also den relativen Anteil von poly-A+ RNA an der Gesamt-RNA. Der mRNA-Gehalt der Zellen nimmt unter Stimulationsbedingungen leicht ab (Abb. 3.16). Nimmt man den Kontrollwert als 100% ($\pm 12,5$), so finden sich im Vergleich dazu in der Stimulationsschale $84 \pm 3,5\%$ der mRNA wieder. Man sieht also einen leichten, nicht signifikanten Rückgang der mRNA.

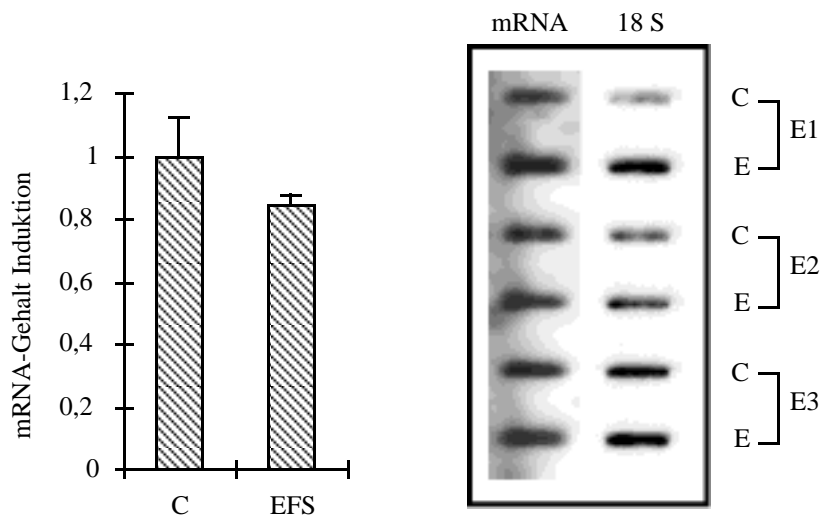


Abbildung 3.16 mRNA-Gehalt nach 24 h EFS. Man sieht einen leicht erniedrigten Wert, der allerdings nicht signifikant ist.

3.3.3 Marker myokardialer Hypertrophie

Zum Nachweis einer eventuellen Hypertrophie unter EFS wurde die mRNA der Zellen mit der cDNA verschiedener Marker hybridisiert. Dabei wurden typische Marker myokardialer Hypertrophie wie atrialer natriuretischer Faktor (ANF) und die Myosine (α - und β -Isoform) untersucht.

Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF)

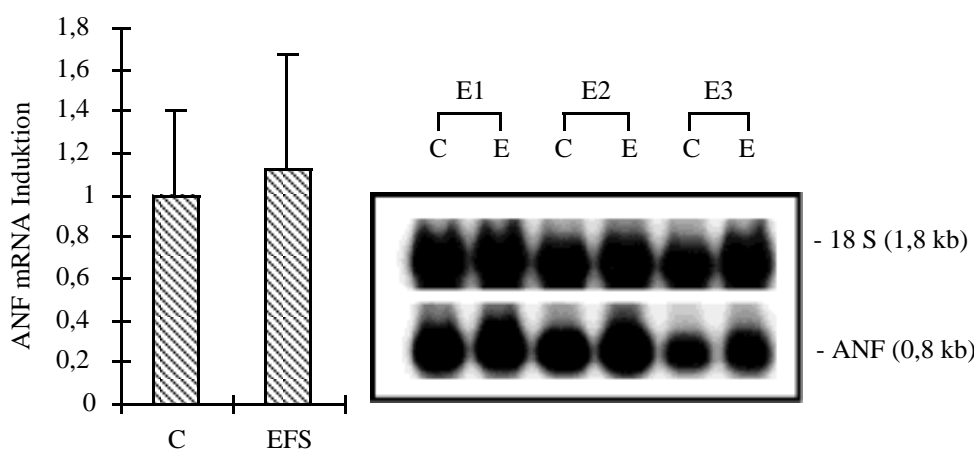


Abbildung 3.17 Nachweis von für ANF spezifischer mRNA. Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg des Signals unter elektrischer Feldstimulation.

Der Atriale Natriuretische Faktor ist ein Protein, das sich im Erwachsenen ausschließlich in Zellen des Vorhofmyokards findet. In den Northern-Blots, die mit einer für das Rattenherz spezifischen Probe für ANF durchgeführt wurde (siehe Kapitel 2.2.8), zeigte sich ein leichter Anstieg des ANF in den stimulierten Myozytenkulturen, wie sie für eine hypertrophe Antwort zu erwarten ist (Abb. 3.17). Im Vergleich zur Kontrolle liegt das Signal für ANF bei 112%, ist allerdings mit diesem Wert noch nicht signifikant ($C 1,0 \pm 0,41$; EFS $1,12 \pm 0,55$).

Die schwere Kette des Myosins (MHC). Ein Wechsel in der schweren Kette des Myosins von α auf β ist kennzeichnend für myokardiale Hypertrophie in der Ratte. Als Kontrolle wurde RNA aus 24 h kultivierten Zellen aufgetragen und diese als Vergleichswert genommen, um die Veränderungen im mRNA-Gehalt der Isoformen zu dokumentieren. Dabei sieht man eine nicht signifikante Abnahme der mRNA für α -Myosin. Einem Kontrollwert von $100 \pm 13,7\%$ steht ein Wert unter EFS von $74,1 \pm 37,9\%$ gegenüber. Für β -Myosin steht einem Kontrollwert von $100 \pm 66,3\%$ steht ein Wert von $64,8 \pm 31,6\%$ unter elektrischer Feldstimulation gegenüber.

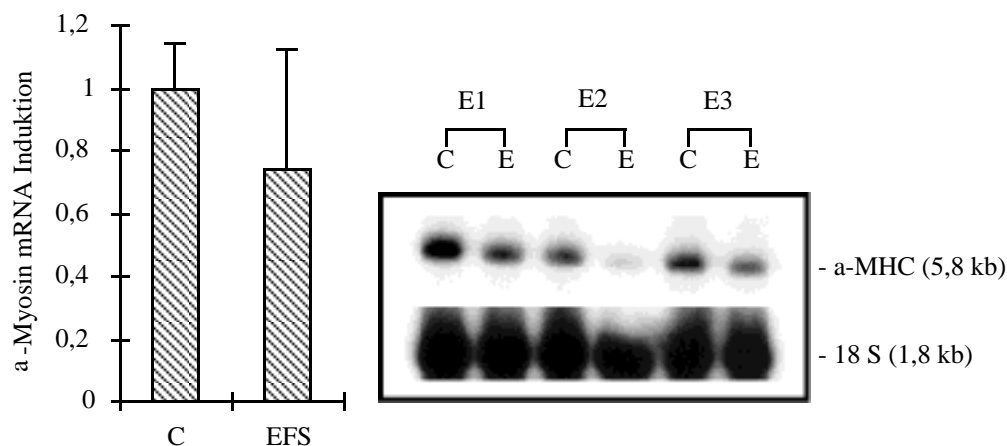


Abbildung 3.18 Nachweis α -Myosin spezifischer mRNA. Man sieht keine Veränderung von α -MHC unter elektrischer Feldstimulation ($n=3$).

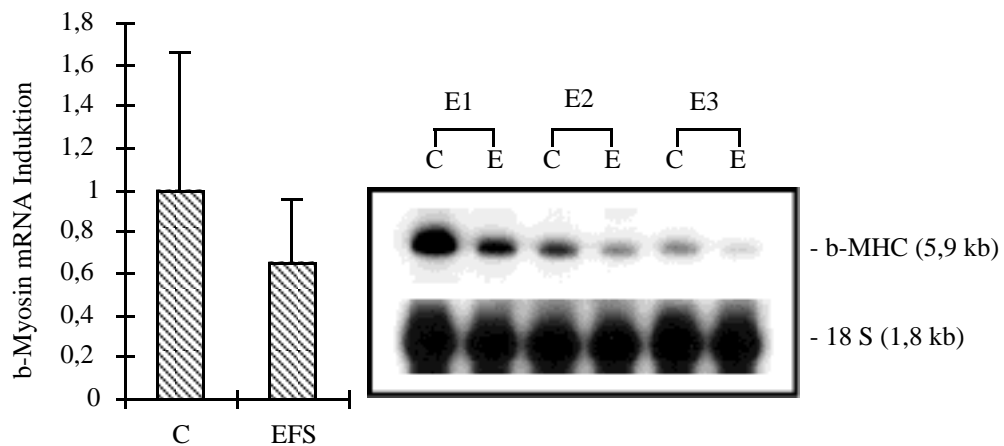


Abbildung 3.19 Nachweis β -Myosin spezifischer mRNA. Auch hier zeigen sich, wie beim α -MHC keine signifikanten Veränderungen (n=3) im Sinne einer Hypertrophie.

3.3.4 Wachstumsfaktoren und elektrische Feldstimulation

Nachweis von FGF-1

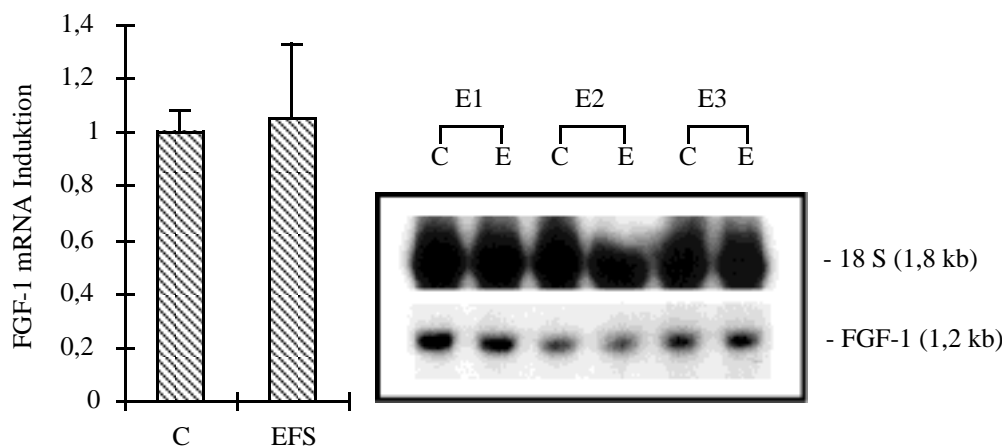


Abbildung 3.20 Nachweis FGF-1 spezifischer mRNA. Auf der rechten Seite der Northern Blot für FGF-1, auf der linken eine quantitative Auswertung des Signals mittels eines Phosphorimagers. Hier fand man keinen Unterschied zwischen den beiden Kulturen (C: 24h Kultur, EFS: 24h elektrische Feldstimulation).

In einem weiteren Experiment haben wurde die Existenz der mRNA für FGF-1 (acidic FGF) nachgewiesen. Dabei konnte sowohl in der Kontrolle als auch unter elektrischer Feldstimulation eine Expression von FGF-1 nachgewiesen werden, die allerdings nicht

signifikant unterschiedlich war. Lag die Expression in der 24 h-alten Kontrollkultur bei $100 \pm 8,4\%$, so findet man unter EFS einen Wert von $104 \pm 28,4\%$.

Nachweis von FGF-2. In einer Publikation von Kaye et al. [1] war eine autokrine Stimulation durch FGF-2 für die Hypertrophie der Zellen unter elektrischer Feldstimulation verantwortlich gemacht worden. Der Nachweis oder der Ausschluß einer Wirkung von FGF-2 war angesichts der Arbeit von Kaye ein besonderes Anliegen. Neben dem Nachweis des mRNA-Signals im Northern-Blot wurde versucht, die Beteiligung von FGF-2 entweder durch eine Unterdrückung (Rezeptorantikörper, Rezeptorblocker Suramin) oder durch Verstärkung des Proteinumsatzes unter Heparin oder unter FGF-2-Zugabe zu zeigen.

Im Northern-Blot waren die Signale für FGF-2 im Verhältnis viel schwächer als die Signale für FGF-1 (Abb. 3.21). Allerdings zeigte sich auch hier keine Wirkung der Feldstimulation auf die Menge der FGF-2 mRNA (+ 5,2 %).

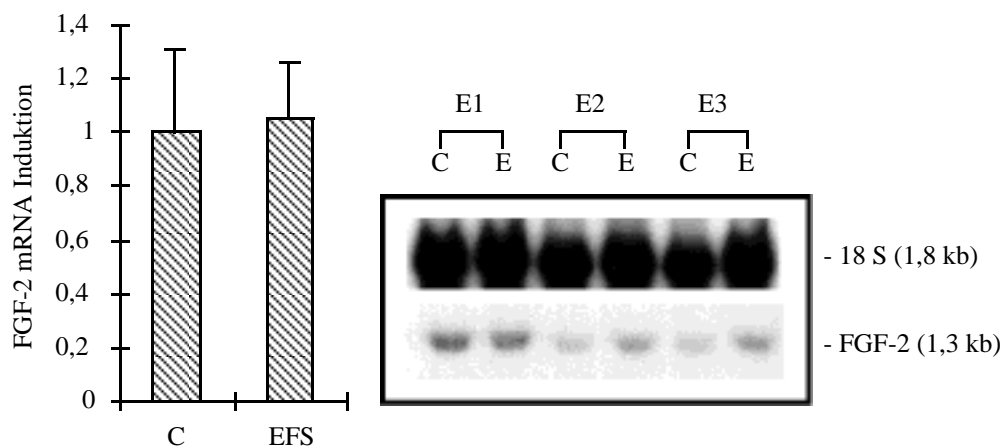


Abbildung 3.21 Nachweis FGF-2 spezifischer mRNA. Auf der linken Seite der Northern Blot, auf der rechten die quantitative Auswertung, die keinen Unterschied zeigte.

24 Stunden Stimulation mit FGF-2 (Abb. 3.22). Die Zellen hatten in den Versuchen über 5-8 Tage ein gutes Ansprechen auf eine Stimulation mit FGF-2 gezeigt. Im Experiment über 24 h war unter der Zugabe von 1, 10 bzw. 100 ng FGF-2 keine Veränderung von Proteinsynthese oder -gehalt zu verzeichnen ($2100 \text{ cpm} / \mu\text{g DNA}$, bzw. $84 \mu\text{g Protein} / \mu\text{g DNA}$).

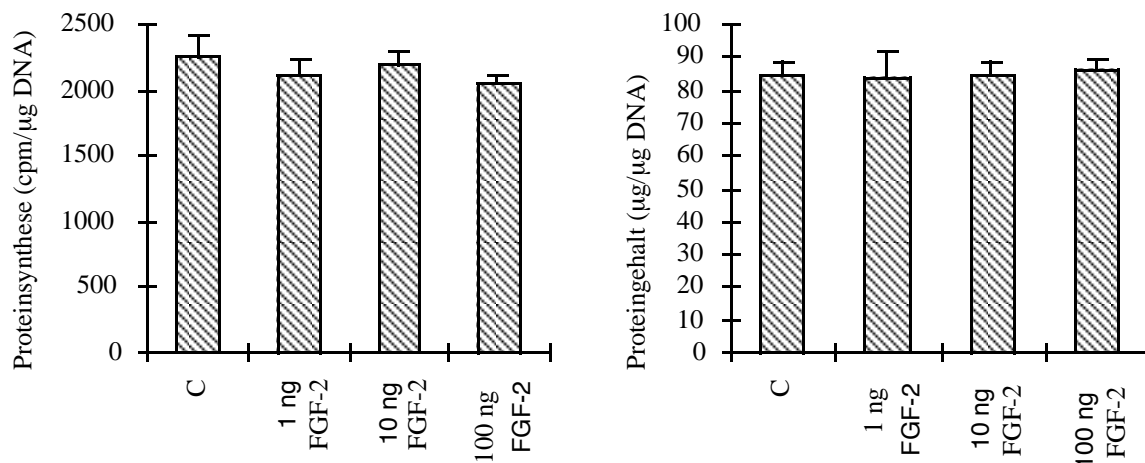


Abbildung 3.22 Proteinsynthese und -gehalt unter dem Einfluß von FGF-2 im Vergleich zur Kontrolle. Messung nach 1 Tag Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen FGF-2, aber ohne EFS.

Einfluß eines spezifischen FGF-2 Antikörpers, des Rezeptorblockers Suramin und Heparin auf den Effekt der elektrischen Feldstimulation (Abb. 3.23). Zur Austestung einer eventuellen FGF-2 Beteiligung an der Signalkaskade, die zu myokardialer Hypertrophie führt, wurde die Proteinsynthese und den Proteingehalt nach 24-stündiger EFS unter Zugabe von Modifikatoren des FGF-Signalwegs gemessen. Die getesteten Substanzen waren ein für nicht denaturiertes FGF-2 spezifischer IgG-Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, der FGF-Rezeptorblocker Suramin in einer Konzentration von 50 µg/ml und Heparin in einer Aktivität von 500 Einheiten / ml.

Als Kontrollexperiment diente eine Paarung aus nichtstimulierten Zellen einerseits und Zellen unter EFS andererseits. Sie bilden in Abbildung 3.23 die jeweils linke Gruppe. Hier ließ sich wie in den vorhergehenden Experimenten der signifikante Anstieg der Proteinsynthese (C 2744,7 ± 196,5 vs. EFS 4447,2 ± 812,5) zeigen, der allerdings zu keiner Veränderung im Proteingehalt führte (C 93,6 ± 0,7 vs. EFS 87,2 ± 5,9).

Bei der Modifikation dieser Bedingungen durch die Zugabe eines FGF-2 Antikörpers konnte man in beiden Kulturen im Rahmen der Proteinsynthese einen leichten Rückgang der Signale bemerken (C 2563,6 ± 357,5 vs. EFS 4181,9 ± 805,6), der allerdings nicht signifikant war. Bei der Messung des Proteingehalts fiel nur ein leichter Abfall des Proteingehalts in der Kontrollgruppe auf (C 84,5 ± 5,0 vs. E 88,0 ± 7,6).

Die Zugabe von Suramin zur Kontrollkombination erzielte in dieser keinen Effekt. War die Proteinsynthese in der Kontrollkultur unter Zugabe von Suramin noch mit der Kontrollgruppe identisch gewesen, gab es einen marginalen Abfall unter EFS, der dazu führte, daß die Zunahme der Synthese unter EFS mit Suramin nicht mehr signifikant war (C 2708,9 ± 575,1

vs. EFS $4151,7 \pm 1136,2$). Auch der Proteingehalt veränderte sich unter Suramin im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht (C $90,2 \pm 12,9$ vs. E $95,7 \pm 5,4$).

Die vermutete Verstärkung des Signals unter Heparinzugabe fiel relativ moderat und nicht signifikant aus. Dennoch lagen die Werte mit C $3221,0 \pm 753,6$ in der Kontrollkultur und EFS $5414,11 \pm 1048,42$ unter EFS in beiden Fällen etwas höher als in der Kontrollgruppe (s.o.), und sie lassen damit auf eine eventuelle Beteiligung heparinbindender Wachstumsfaktoren schließen. Hier war der Proteingehalt insgesamt am höchsten (C $95,4 \pm 12,3$ vs EFS $95,2 \pm 5,4$) und damit in der Kontrollkultur und unter EFS identisch.

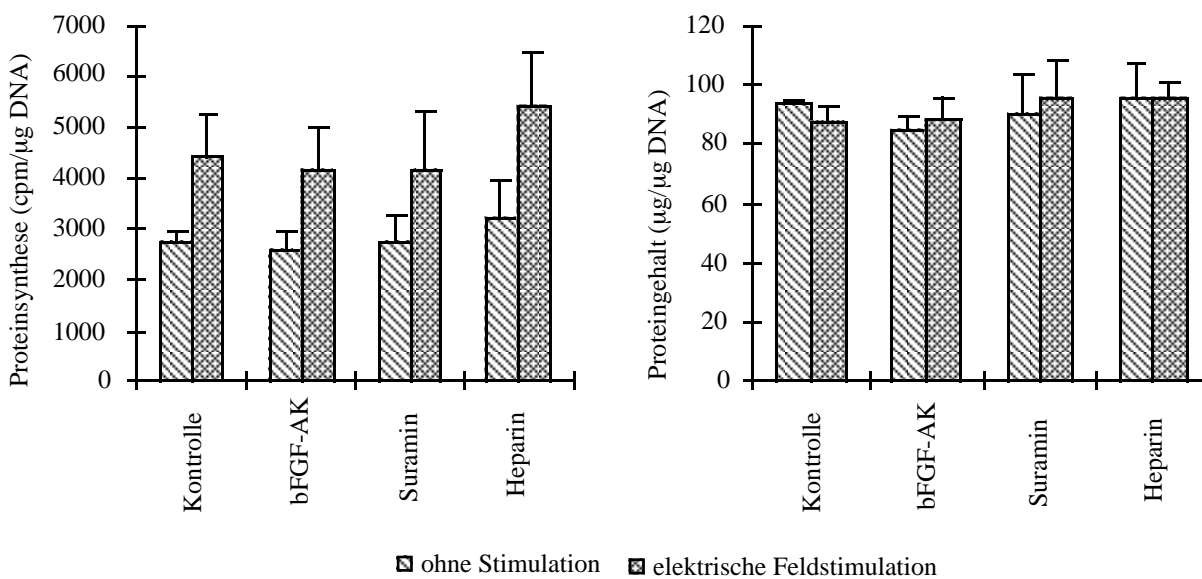


Abbildung 3.23 Proteinsynthese und -gehalt unter dem Einfluß eines spezifischen FGF-2-Antikörpers, von Suramin und Heparin. Dabei zeigte sich kein Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Steigerung der Proteinsynthese unter EFS.

Nachweis des Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (Abb. 3.24). Um eine mögliche Beteiligung von FGF-2 nachzuvollziehen, wurde in diesem Experiment versucht, den FGF-Rezeptor 1 auf Myozyten nachzuweisen. Dieser Rezeptor ist bisher der einzige auf Kardiomyozyten nachgewiesene Rezeptor, er ist für die Interaktion mit FGF-2 bekannt. Von daher war der Nachweis seiner Expression wichtig, um den Signalweg des FGF-2 im Myozyten nachzuvollziehen. Hybridisiert wurde mit einer für den Ratten-FGF-Rezeptor spezifischen Probe (siehe 2. M&M), die sowohl in der Kontrollschale als auch in der Stimulationsschale mRNA für FGF-R1 detektieren konnte. Allerdings war die Expression unter elektrischer Feldstimulation nicht unterschiedlich von der Kontrollkultur mit einem Wert für die Stimulation von $106,2 \pm 13,0\%$ gegenüber der Kontrolle mit $100 \pm 31,3\%$.

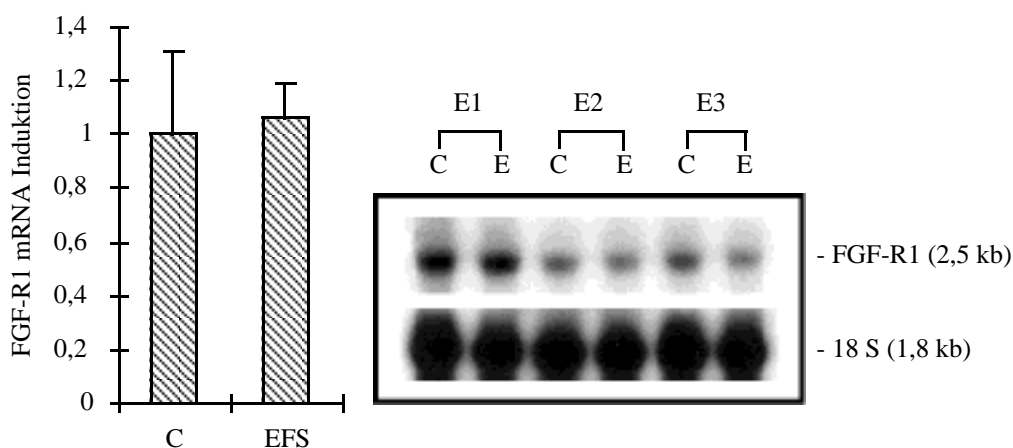


Abbildung 3.24 Nachweis der spezifischen mRNA für den FGF Rezeptors-1. Auf der rechten Seite der Northern Blot, links die quantitative Auswertung mit einem Phosphorimager.

Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor. Neben diesen Wachstumsfaktoren wurde VEGF (Abb. 3.25) untersucht. VEGF ist ebenfalls ein heparinbindender Wachstumsfaktor, der die Gefäßpermeabilität erhöht, Endothelzellproliferation in vitro erhöht und Angiogenese in vivo stimuliert. VEGF enthält eine Signalsequenz und kann von Zellen sezerniert werden. Verglichen mit der Kontrolle zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA dieses Wachstumsfaktors auf $136,6 \pm 9,0\%$ des entsprechenden Kontrollwerts ($100 \pm 10,8\%$). Die Abbildung 3.26 zeigt die Expression von VEGF, auf der linken Seite die Werte aus den Northern-Blot-Experimenten und auf der rechten Seite die Werte bezogen auf den RNA-Gehalt der Zellen.

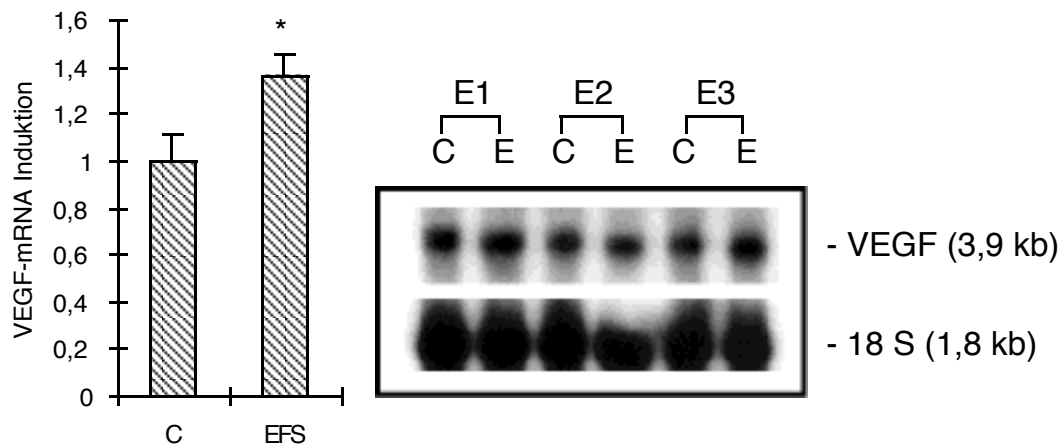


Abbildung 3.25 Nachweis einer signifikanten Erhöhung der VEGF spezifischen mRNA (* $P < 0,05$). Hybridisierung mit einem VEGF-spezifischen Insert auf der rechten Seite, quantitative Darstellung auf der linken.

Zusammenfassung der Wirkung von 24h elektrischer Feldstimulation

Messwert	Kontrolle	EFS	
Proteinsynthese	o	+	$p < 0,05$
Proteingehalt	o	o	
RNA-Synthese	o	+	$p < 0,05$
RNA-Gehalt	o	+	$p < 0,01$
mRNA-Gehalt	o	o	
Marker	Kontrolle	EFS	
ANF	o	o	
a-MHC	o	o	
b-MHC	o	o	
Expression von	Kontrolle	EFS	
FGF-1	o	o	
FGF-2	o	o	
FGF-R1	o	o	
VEGF	o	+	$p < 0,05$

Tabelle 3.26 Wirkung von 24h elektrischer Feldstimulation. ("o" Nachweis der Expression / Ausgangswert, "+" signifikante Veränderung, "-" fehlender Nachweis der Expression.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden kultivierte kardiale Myozyten der Ratte dem Einfluß von Wachstumsfaktoren ausgesetzt und das Verhalten der Zellen biochemisch und morphologisch beschrieben. Keiner der getesteten Wachstumsfaktoren war in der Lage, eine Hypertrophie in den Zellen auszulösen (Proteingehalt / DNA nach 8 Tagen: IGF 77%, FGF 102%, LIF 64%, IL-11 40%, TGF- β_1 78% der frischen Kontrolle). Erst die Kombination von Wachstumsfaktoren wie sie in FCS und ECGS vorliegt, konnte einen Anstieg an zellulärem Protein bewirken (FCS 110%, ECGS 118%). Die Zellen in Kulturen mit hoher Syntheseleistung (Proteinsynthese: IGF 212%, ECGS 385%, FCS 700%) veränderten ihre Morphologie sehr stark, indem sie abflachten und die Oberfläche vergrößerten. Zellen mit niedriger Syntheseleistung gelang diese Adaption nur in weit geringerem Maße (FGF 162%, LIF 135%, IL-11 133%, TGF- β_1 57%); ihre längliche Form blieb weitgehend erhalten. Eine Sonderstellung in diesem Zusammenhang nahm TGF- β_1 ein. Hatte es bei alleiniger Zugabe einen nur geringen Einfluß auf die Morphologie der Zellen, zeigte es in Kombination mit ECGS eine Suppression der ECGS-typischen adaptiven Wirkung. Basierend auf der Beobachtung, daß sich die Dedifferenzierung der Zellen mit dem Einsetzen von spontanen Kontraktionen beschleunigt, wurde ein System etabliert, adulte kardiale Myozyten in Kultur zur Kontraktion anzuregen. In Kulturen von Kardiomyozyten, die elektrisch stimuliert wurden, war die RNA-Synthese (128,5%), der RNA-Gehalt (119,4%) und die Proteinsynthese erhöht (162%). Der Proteingehalt veränderte sich nicht (94%). Die Transkriptionsraten von FGF-1, FGF-2 und FGF-R1 blieben durch die elektrische Stimulation unbeeinflusst, die von VEGF erhöhte sich auf 136,6% der Kontrolle.

4.1 Stimulation zellulären Wachstums

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf das Verhalten der Zellen in Kultur zu beschreiben. Einer der gebräuchlichsten Termini bei der Beschreibung der Wirkung von Wachstumsfaktoren ist die Hypertrophie [14, 66, 81]. Unter Hypertrophie versteht man die Größenzunahme eines Gewebes oder Organs durch Zellvergrößerung bei konstanter Zellzahl und -struktur, wobei es zu einem Nettogewinn an zellulärem Protein kommt. Sie ist damit gegenüber der Hyperplasie abzugrenzen, die mit einer Erhöhung der Zellzahl einhergeht. Hypertrophie in der Kultur wird als Volumenzunahme einzelner Zellen definiert [66]. Das Zellvolumen von adulten Kardiomyozyten ist allerdings schwer zu bestimmen. Daher wird die Hypertrophie von Myozyten in Kultur oft durch den zellulären Proteingehalt charakterisiert. Dieser Parameter

wird als Proteingehalt pro Kulturschale [98], Proteingehalt pro Zellzahl [99], oder als Ratio von zellulärem Protein zu DNA-Gehalt gemessen [100].

Eine Zunahme des Proteingehalts von adulten Kardiomyozyten kann entweder auf eine erhöhte Syntheserate oder eine verminderte Degradation zurückzuführen sein. Man kann diese Vorgänge auseinanderhalten, indem der zelluläre Aminosäurepool mit radioaktiv markiertem Phenylalanin oder Tyrosin markiert wird [101]. In Experimenten, in denen in die neu gebildeten Proteine radioaktiv markierten Aminosäuren eingebaut werden, kann man die Netto-Proteinsynthese bestimmen. Um Proteindegredation zu messen wird der Proteinpool radioaktiv markiert und der Verlust von Radioaktivität über die Zeit gemessen [102].

Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF I&II). Die Zellen zeigten unter Stimulation mit IGF nach 8 Tagen einen gegenüber der zwei Tage alten Kontrolle auf 77% erniedrigten Proteingehalt / DNA (IGF-I 77,3%; IGF-II 77,5%). Eine Kombination beider Faktoren war nicht additiv (IGF-I & IGF-II 64,6%). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Daten aus der Literatur (58 - 70), in der in serumhaltigen Kulturen gezeigt wurde, daß IGF-I eine Erhöhung des Proteingehalts bewirkt. Außerdem ist der IGF-I Rezeptor unter Serum-induzierter Hypertrophie heraufreguliert [35]. Von daher konnte IGF-I in diesen Kulturen zu einer Steigerung des Proteingehalts führen. Waren die Kulturen in unseren Experimenten mit dem Wachstumsfaktorengemisch ECGS vorbehandelt, kam es ebenfalls zu einem erhöhten Proteingehalt (siehe Abbildung 3.9 d&e).

Die Proteinsynthese war in den mit IGF behandelten Kulturen erhöht (IGF-I 211,4%; IGF-II 214,4% der 2 Tage alten Kontrolle). Ähnliche Befunde erhoben Fuller et al. 1992 in serumfreien Suspensionen von adulten Rattenkardiomyozyten [36]. Die Zugabe einer Dosis von 50-100 nM hatte zu einer um 70% gesteigerten Proteinsynthese geführt. Niedrigere Dosierungen von 10 ng/ml hatten in Untersuchungen von Decker et al. zu einer Erhöhung der Proteinsynthese um 42 (IGF-I) bzw. 14,5 % (IGF-II) geführt. Diese Zellen waren vorher eine Woche lang mit Serum kultiviert worden. Wir können beide Autoren auch in Ihren Befunden bestätigen, wonach eine Kombination beider Faktoren zu keiner weiteren Steigerung der Synthese führt.

Die erhöhte Proteinsynthese führte zu einer ausgedehnten strukturellen Neugliederung der Zelle mit einer vergrößerten Oberfläche (siehe Abbildung 3.6 a&b) im Sinne einer Dedifferenzierung. In den Kulturen von Eppenberger und Harder et al. [16, 37] vergrößerte sich das Zellvolumen auf das zweifache. Die Form der Zellen war allerdings im Gegensatz zu den Kulturen mit oder ohne Zusatz von IGF-I vergleichbar. Sie kultivierten die Zellen auf einem Kissen aus 0,1% Gelatine und gaben in der ersten Woche 20% Serum in das Medium. Diese vorstimulierten Zellen waren schon vor der Zugabe des Wachstumsfaktors weitgehend an die Kultur adaptiert (siehe auch Abbildung 3.5b), eine eventuelle Wirkung des IGF

modulierte nur noch die vorhandene Morphologie. In unseren Versuchen, in denen IGF zu den mit ECGS stimulierten Kulturen gegeben wurde (Abbildung 3.9a-c), zeigten sich entsprechend auch nur geringe morphologische Veränderungen.

Es konnte erstmals gezeigt werden, daß IGFs in der Lage sind, die Adaption der Zellen an die Kulturbedingungen zu fördern und ein Überleben der Zellen auch in serumfreien Kulturen zu ermöglichen. Die Auslösung einer Hypertrophie konnte allerdings nicht gesehen werden. Allerdings ist IGF in serumfreien Kulturen ein starker dedifferenzierender Faktor.

Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF 1&2) Über 8 Tage mit FGF 1 oder 2 stimulierte Zellen zeigten im Vergleich zur zwei Tage alten Kontrolle eine erhöhte Proteinsynthese (FGF-1 150,6%; FGF-2 173,6%), hatten aber einen unveränderten Proteingehalt (103% bzw. 100%). Dieser Wachstumsfaktor wirkte damit nicht hypertroph. Diese Daten stehen im Widerspruch zur Literatur (58-64) und zu den Untersuchungen von Fuller et al. [36]. Er hatte in seinem Modell (serumfreie Zellen in Suspension) die frisch isolierten Zellen mit 50 ng/ml FGF stimuliert und keine Steigerung der Syntheserate gesehen. Ähnliche Ergebnisse fand Decker et al. [103] an Kaninchenmyozyten (Laminin, 10% Serum, 1 Woche Kultur, dann Exposition unter Serumentzug). Die Zellen wurden mit jeweils 10 ng/ml FGF-1 oder FGF-2 stimuliert und hier wiederum keine Steigerung der Syntheserate festgestellt. Eine Erklärung für diese deutlichen Unterschiede ist in der Dauer der FGF-Exposition und nicht alleine in der Kulturdauer zu suchen. In unseren Experimenten zeigte erst die Stimulation der Zellen über 24h hinaus eine Steigerung der Proteinsynthese. Bei kürzerer FGF-Stimulation war die Proteinsynthese nicht verändert (Abbildung 3.22). Die FGF-stimulierten Zellen zeigten über einen Zeitraum von 8 Tagen keinen Verlust an Protein, während die entsprechende Kontrollgruppe einen Abfall um 42,8% zu verzeichnen hatte.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Arbeiten aus dem Labor Eppenberger [16, 37], so bekommt man bei ihnen einen anderen Eindruck von der Rolle des FGF-2. In ihren Kulturen führte, nach einem anfänglichen Zusammenbruch des kontraktilen Materials, die Zugabe von FGF-2 zu einem Anwachsen der Zellen auf das vierfache Ausgangsvolumen (Serum und IGF-1 zweifach). Diese Stimulation kann jedoch immer nur eine Modulation ihrer Serumwirkung sein, die durch die hohen Konzentrationen sehr dominant ist.

Zusammenfassend verhinderten FGFs die Zellatrophie und erhöhten die Proteinsynthese, die allerdings nicht zu einer Akkumulation von Protein führte. Diese Wirkung trat erst bei Zellen auf, die länger als 24 h in Kultur sind oder bei denen gleichzeitig andere Faktoren zugefügt wurden [16, 37].

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und Interleukin-11 (IL-11). In den über 8 Tage mit LIF / IL-11 stimulierten Kulturen wurde eine Steigerung der Proteinsynthese unter LIF (134,9%)

und IL-11 (132,8%) gegenüber den 2 Tage alten Kontrollen beobachtet, allerdings fand sich diese Steigerung nicht in einem erhöhten Proteingehalt der Zellen wieder (LIF 63,6%, IL-11 40,1%). LIF und IL-11 wurden als Stimuli verwendet, da sie in eine Gruppe von Cardiotrophin-ähnlichen Faktoren gehören, die an neonatalen Rattenmyozyten eine Hypertrophie auslösen konnten. An neonatalen Rattenmyozyten hatten Pennica et al. 1995 [58] den Wachstumsfaktor Cardiotrophin-1 beschrieben und die Wirkung verschiedener Cardiotrophin-ähnlicher Faktoren charakterisiert. Sie hatten die Zellen 24h nach Isolierung für zwei Tage mit den verschiedenen Zytokinen stimuliert. Auf einem Score von 3-7, auf dem 3 keine Hypertrophie und 7 maximale Hypertrophie darstellt (wie etwa unter 0,1 nM Phenylephrin), hatte die Zugabe von 2,5 nM LIF einen Score von 6, IL-11 in einer Konzentration von 2,0 nM einen von 5,5 erreicht. Die Daten in der vorliegenden Arbeit können diese Befunde nicht bestätigen, zeigen sie doch eine fast unbehinderte Atrophie der Zellen, wie sie auch unter unstimulierten Bedingungen vorkommt.

Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, daß neonatale Myozyten andere Rezeptoren als adulte Kardiomyozyten exprimieren und sich daher die Sensitivität der Zellen für die einzelnen WF unterscheidet [31, 104, 105]. In unseren Versuchen konnten wir keine Hypertrophie induzierende Wirkung von LIF und IL-11 sehen.

Transforming Growth Factor β_1 (TGF- β_1). Bei der Stimulation von kultivierten Zellen über 8 Tage durch Zugabe von 10 ng/ml TGF- β_1 war die Proteinsyntheserate (57% der 2 Tage alten Kontrolle) als auch der Proteingehalt (77,7% der 2 Tage alten Kontrolle) niedriger als in den Kontrollen; es zeigten sich keine morphologischen Veränderungen. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Daten aus der Arbeit von Long [14] an neonatalen Rattenkardiomyozyten. Sie hatten diese Zellen über 72h mit verschiedenen Isoformen von TGF- β (0,1 pg – 50 ng/ml) stimuliert und bei 10 ng/ml ein Maximum mit dem Anstieg der Proteinsynthese auf etwa 150% der Kontrolle gesehen. Diese Unterschiede könnten auf die Art der Zellen zurückzuführen sein (neonatal vs. adult).

In einem *in-vitro* Experiment hatten Decker et al. [103] an mit Serum kultivierten Kaninchenmyozyten die Wirkung von exogenem TGF- β getestet. Sie fanden neben einer erhöhten Proteinsynthese keinen Einfluß auf die Degradierung der Proteine. Hier ist eine Modulation der Serumstimulation naheliegend, die die Wirkung von TGF- β erlaubt. Andere Autoren fanden eine Inhibition der Proliferation von neonatalen Rattenkardiomyozyten und eine verringerte Proteinsyntheserate von Skelettmuskelmyoblasten [70] und bestätigten damit die hier vorliegenden Daten.

Der Zusatz von TGF- β_1 zu einer Kultur von mit ECGS-stimulierten Zellen blockierte den strukturellen Umbau unter ECGS (siehe Abbildung 3.11 a vs. 3.9 a) und legt damit eine Rolle als Differenzierungshormon nahe. Die Zellen adaptierten sich nicht an die Kultur und blieben

länglich. Die Proteinsyntheserate unter Zusatz von TGF- β_1 war viel niedriger als unter ECGS allein (ECGS 384,5%; ECGS+TGF β 227,7% jeweils gegenüber der 2 Tage alten Kontrolle). Trotzdem war der Proteingehalt mit den ECGS-stimulierten Zellen vergleichbar (ECGS 117,5% vs. ECGS+TGF β 115,8%). Hier fällt die Hemmung der Proteinsynthese und der Degradation vergleichsweise stark aus.

Ähnliche Daten hatten Schlüter et al. [66] für die Interaktion von β -adrenerger Stimulation und TGF- β Exposition beschrieben. Sie machten die TGF- β -induzierten Kopplung des β -Adrenorezeptors an die Proteinsynthese für diese Beobachtung verantwortlich [106]. Langzeitexposition von Kardiomyozyten mit TGF- β induzierte eine Ansprechbarkeit und hypertrophe Antwort von Zellen als Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation.

Diese Interaktion von TGF- β mit anderen Stimulantien ist eine Besonderheit dieses Wachstumsfaktors. Die Kombination von ECGS mit IGF-I und IGF-II hatte dagegen eine additive Wirkung. Die Morphologie veränderte sich im Vergleich mit der drastischen Wirkung von TGF- β nur geringfügig (Abbildungen 3.9 a-c, 3.11 a).

Elektrische Feldstimulation (EFS). Die Zellen nach 24h elektrischer Feldstimulation hatten eine erhöhte Proteinsynthese (162,0 % gegenüber der 24h alten Kontrollkultur) bei unverändertem Proteingehalt (93,2 %).

Dagegen fanden Kato et al. [86] über einen Zeitraum von 7 Tagen eine signifikante Steigerung der Proteinsynthese und des Proteingehalts der Zellen. War am ersten Tag nach 24h Stimulation der Proteingehalt noch gleich der Kontrolle gewesen, so stieg dieser bis zum 7 Tag um 52% signifikant an. Diese Befunde lassen sich sehr gut mit den Daten in der vorliegenden Arbeit vereinbaren.

Im Vergleich kamen Kaye et al. zu einem anderen Ergebnis [1]. Sie fanden eine Steigerung des Proteingehalts / μg DNA von fast 100% innerhalb von 24 h nach Einsetzen der EFS. Diese Steigerung des Proteingehalts wurde durch eine Steigerung der Proteinsynthese von etwa 1200 auf 4500 cpm ermöglicht (Zunahme auf 375 % der Kontrolle).

Die Morphologie der Zellen nach 24h EFS zeigte keine auffallenden Unterschiede zu den Veränderungen in den gleich alten Kontrollkulturen. In beiden Ansätzen kam es zu einer für Kulturen typischen Abrundung der Zellenden. Diese Daten sind vergleichbar mit den Arbeiten von Berger als auch Kaye et al. [1, 79]. Sie beobachteten bis zu einer Stimulationsdauer von 72h ebenfalls keine Unterschiede in der Morphologie der Zellen zwischen der Kontrollkultur und den Zellen unter EFS. Eine Adaption der Zellen setzte erst mit dem 4 Tag der EFS ein. Diese führte am fünften Tag zu ersten Ausläufern, die am siebten Tag dann relativ stark ausgeprägt waren. Sie dokumentierten darüber hinaus, daß die

Sarkomeren in der Phasenkontrastaufnahme weitaus organisierter erscheinen, als in den entsprechenden Kontrollzellen.

Einigkeit besteht in der Beobachtung, daß elektrische Feldstimulation das Wachstum myokardialer Zellen fördert. Während unsere Messungen wie auch die von Kato et al. [86] eine nur langsame Reaktion der Zellen auf die Kontraktionen sehen, verläuft diese in den Experimenten von Kaye et al. [1] sehr rasant. Kato et al. sahen nach 24 h Stimulation weder eine Steigerung des Proteingehalts noch der Proteinsynthese, Kaye et al. dagegen eine Verdopplung des Proteingehalts und eine Vervierfachung der Proteinsynthese. Ob dieser Unterschied allein durch die verwendete Spezies (Kato et al. Katze, Kaye et al. Ratte) oder durch die unterschiedliche Stimulationsfrequenz (1 bzw. 3 Hz) erklärt werden kann, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. In unseren Experimenten (Ratte, 2,5 Hz) konnte keine Steigerung des Proteingehalts und eine 60% ige Steigerung der Proteinsynthese gesehen werden.

Daß es im Rahmen solcher Experimente zu entsprechenden Veränderungen in der Proteinsynthese kommen muß, ist unbestritten. Morgan et al. fanden, daß in allen experimentellen Modellen kardialer Hypertrophie die Proteinsynthese mit entsprechenden Veränderungen in der mechanischen Last einhergeht [107].

Fetales Kälberserum / Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS). Der Effekt einer Kultivierung von adulten Kardiomyozyten unter 20% Serum zeigten eine für Serumkulturen typische Morphologie. Die Zellen waren nach 8 Tagen auf die doppelte Oberfläche angewachsen. Der Zellkörper war groß, rund und hatte kurze Ausläufer. Die Proteinsynthese, nach zwei Tagen noch etwa doppelt so hochgewesen war wie in den Kontrollzellen, verneunfachte sich bis zum 8. Tag in Kultur und ging mit einem erhöhten Proteingehalt der Zellen einher (110%). Diese Morphologie war typisch für serumhaltige Kulturen adulter Rattenkardiomyozyten und wurde in gleicher Weise auch vom Eppenberger als auch Harder et al. beschrieben [16, 37]. Nach Degeneration der Zellen in den ersten Tagen, begannen die Myofibrillen aus der perinukleären Region in die Zelle vorzuwachsen und füllten teilweise die gesamte Zelle aus. Die Zellen wuchsen, bis sie Kontakt zueinander fanden und dann synchron anfangen zu kontrahieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Decker et al. [103] berichtet, wo diese Versuche an Kaninchenmyozyten durchgeführt wurden. Sie fanden ein Wachstum der Zellen von etwa 5% am Tag unter Einfluß von 20% FCS. Entzog man diesen Zellen das Serum, so setzte umgehend eine Atrophie der Zellen ein.

ECGS wurde in unseren Versuchen in einer Konzentration von 250 µg/ml zu den Kulturen gegeben. In dieser Konzentration war ECGS in der Lage, die Bildung von Zellausläufern zu induzieren. Die Zellen waren vergleichbar mit Zellen, die in Gegenwart von 20% fetalem

Kälberserum (FCS) kultiviert wurden, und wiesen eine typische Morphologie mit ihren langen, verzweigten Zellausläufern und relativ großen Zelleibern auf. Ein Vergleich des Proteinumsatzes unter diesen verschiedenen Kombinationen von Wachstumsfaktoren bestätigte diese Daten. Unter der Stimulation mit ECGS war Proteinsynthese und Akkumulation in etwa in der Balance, bei einer Proteinsyntheserate von etwa 5000 cpm lag der Gehalt bei 110% des frischen Ausgangswerts, während die entsprechende Kontrolle auf 50% abgefallen war.

4.2 Das Modell der elektrischen Feldstimulation (EFS)

Für die Untersuchung von kontrahierenden Muskelzellen finden sich in der Literatur drei grundlegende Ansätze. Während viele Gruppen mit Kulturen von fetalen Myozyten arbeiten, die spontan kontrahieren [108-110], gibt es seit der erfolgreichen Isolierung von intakten adulten Myozyten Versuche, sie durch elektrische Stimulation zur Kontraktion anzuregen [111, 112]. Adulte Kardiomyozyten werden einerseits in Suspension von frisch isolierten Zellen untersucht (besonders in der Elektrophysiologie) [111-113], andererseits in Monolayer-Kulturen zur Kontraktion angeregt [79, 86]. Monolayer sind unbedingt erforderlich, um adulte Kardiomyozyten in Kultur zu halten, sie sind von einer Anheftung abhängig ("anchorage dependent"). In der jetzt vorliegenden Untersuchung wurde die elektrische Feldstimulation (EFS) an Monolayer-Kulturen etabliert und im Kontext der Wachstumsfaktor-induzierten Adaption adulter Kardiomyozyten an die Kultur zur Anwendung gebracht. Sie erlaubte die Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Myozyten unter EFS, deren Dedifferenzierung und die Untersuchung der Wachstumsfaktorproduktion dieser Zellen.

Elektrische Feldstimulation *in vitro* als Modell für kardiale Kontraktionen *in vivo*. Es gibt offensichtliche Unterschiede zwischen dem isolierten Myozyten in der Kulturschale und dem Myozyten im Synzytium des Herzens. Während die Zelle im Herzen eine sich verändernde Last über die Zeit erfährt, ist der isolierte kardiale Myozyt keiner Vorspannung ausgesetzt. Von daher ist die Situation *in vivo* eine Mischung aus Dehnung und Kontraktion. *In vitro* dagegen werden die Zellen nicht gedehnt und kontrahieren nur gegen interne elastische und visköse Komponenten [125]. Diese Konstellation ist problematisch wenn man von der Zellverkürzung unter Stimulation auf die Kraftentwicklung schließen will. Es gibt bis heute keine Daten oder Modelle, die eine vorhersagbare Beziehung zwischen Zellverkürzung *in vitro* und der Kontraktilität herstellen [126]. Auf der anderen Seite ist die Trennung zwischen Dehnungs- und Kontraktions induzierter Regulation zellulären Wachstums nur *in vitro* möglich. Während Untersuchungen zur Dehnung von Herzmuskelzellen vorwiegend auf

Silikonträgern vorgenommen werden, können Untersuchungen zur Kontraktions vermittelten Wachstumssteuerung mit Hilfe der elektrischen Feldsimulation durchgeführt werden.

Kardiale Transkriptionsrate. Shimizu et al. beschrieben die Erhöhung der RNA-Synthese als die am meisten beeindruckende und beständigste Veränderung in hypertrophen Herzen [114]. Daher wurde in unserem Versuchsansatz nach 24 h EFS die Synthese von totaler RNA in den Kulturen gemessen und eine Steigerung um 41,2 % gefunden. Diese fand ihren Niederschlag in einem erhöhten totalen RNA-Gehalt der Zelle (+ 21 %). Hingegen veränderte sich mRNA-Gehalt der Zellen nicht signifikant. Unsere Befunde bestätigten Untersuchungen von McDermott et al. [115]. An fetalen Rattenkardiomyozyten fanden sie in kontrahierenden Zellen einen erhöhten Gehalt an rRNA, der durch eine erhöhte rRNA-Synthese erzeugt wurde. Nach 3 Tagen war die RNA-Synthese in kontrahierenden Zellen um 59% (18S) bzw 53% (28S) erhöht.

Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF). Adulte Myozyten aus dem Ventrikel des Herzens sollten die mRNA für ANF nicht, oder nur in geringer Menge, transkribieren. Nach einem hypertrophen Stimulus wird die ANF-mRNA dagegen innerhalb von 6-20h nach Exposition der Zellen heraufreguliert [81]. Im Rahmen unserer Versuche, in dem der Einfluß der EFS auf die Transkription von ANF untersucht wurde, kam es zu einer Erhöhung des mRNA-Signals für ANF auf 112 % der unstimulierten Kontrolle (nicht signifikant). McDonough et al. hatten Kulturen von neonatalen Rattenmyozyten elektrisch stimuliert und den Einfluß dieses Stimulus auf die Transkription von ANF untersucht [116]. Nach 3 Tagen fanden sie dabei eine 5-10-fache Steigerung der mRNA-Expression von ANF. Die Unterschiede im Grad der ANF-Transkription dürfte durch eine schon basal erhöhte Rate in den Kontrollkulturen liegen. Diese Expression kann ein Resultat der Kulturbedingungen sein, dessen Medium durch einen Zusatz von Insulin und Triiodothyronin gekennzeichnet ist [81].

Die schwere Kette des Myosins (MHC). Im Modell der EFS wurde keine signifikante Veränderung der mRNA-Transkription für die schwere Kette des Myosins gefunden. Die Literatur zur Expression von Myosinen im Rahmen der Hypertrophie ist nicht einheitlich. Während einige Autoren einen Wechsel der Isoformen vom adulten α - zum fetalen β -MHC sehen [16, 108, 109], können andere Gruppen diese Beobachtungen an ihren Modellen nicht nachvollziehen [117-119].

In der hypertrophen Reaktion ist die Expression der strukturellen Proteine nicht immer in ähnlicher Weise reguliert, sondern kann je nach Stimulus verschieden sein [81]. Samarel et al. hatten eine verstärkte Expression der kontraktilen Proteine in mechanisch aktiven Zellen gegenüber einer mit KCl-depolarisierten Kontrolle gesehen [108, 109]. Susic et al. fanden,

Hypertrophie, ein Wechsel der Isoformen war allerdings nicht mehr zu beobachten [119]. Diese Daten weisen darauf hin, daß ein Wechsel der Isoformen vor allem mit dem Ausmaß der Laständerung der myokardialen Zellen korreliert ist. Andererseits fanden Bauer et al. auch keine Änderung der Myosinisoformtranskription in einem Modell des pulmonalen Banding [117, 118].

Ein methodischer Grund für den fehlenden Wechsel zwischen den Isoformen könnte der Zusatz von Triiodothyronin zu den Kulturen wie in diesem Modell (0,1 nM) sein.. Steigende Konzentrationen von T₃ beeinflusst die Transkription von MHC zugunsten des α -MHC [81].

Wachstumsfaktorproduktion unter EFS. Die Untersuchung von FGF wurde angeregt durch die Berichte von Kaye et al. [1], die die autokrine Stimulation der Zellen durch FGF-2 für die unter EFS auftretende Hypertrophie verantwortlich gemacht hatten. Sie postulierten das Auftreten transienter, nicht letaler Lecks in der Zellmembran, die die Freisetzung von FGF ermöglichen. In unseren Versuchen konnte keine Beteiligung von FGF-2 an den Veränderungen des Proteinmetabolismus unter 24-stündiger EFS gezeigt werden. Weder auf RNA-, noch auf Proteinebene ließ sich eine Beteiligung von FGF-2 an den Veränderungen unter EFS nachweisen. Im Northern Blot konnte die mRNA von FGF-1, FGF-2 und des FGF-R1 nachgewiesen werden, sie war aber unabhängig von der EFS transkribiert. Die externe Zugabe von 1-100 ng/ml FGF-2, die Blockade einer FGF-2 Wirkung durch monoklonale Antikörper oder die Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors Suramin zu elektrisch stimulierten Kulturen konnte die gezeigten Veränderungen auf Proteinebene nicht modulieren.

Die Möglichkeit einer Freisetzung von FGF-2 unter mechanischer Aktivität über eine transiente Erhöhung der Membranpermeabilität war schon in früheren Publikationen durch McNeil und Clarke angedeutet worden. Diese Versuche waren an Skelettmuskulatur *in vitro* [120] bzw. an gefrorenen Gewebsschnitten [121] durchgeführt worden und zeigten die Möglichkeit einer Penetration größerer Moleküle (Albumin) durch die Zellmembran einer intakten Zelle.

Eine andere Theorie favorisiert einen energieabhängigen Prozess, der zur Freisetzung von FGF führt. Mit FGF-2 DNA transfizierte COS-Zellen waren in der Lage, FGF-2 über einen Energie-abhängigen Prozess zu sezernieren, der vom klassischen ER / Golgi-Weg unabhängig war, und damit eine Alternative zum bekannte Protein-Sekretionsweg nahelegt [47].

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). In den Experimenten zur EFS ließ sowohl in den Kontrollschalen, als auch unter Stimulation die Expression von VEGF nachweisen. Die Zellen unter EFS exprimierten dabei signifikant mehr mRNA für VEGF. Ähnliche Befunde publizierte auch Hang et al. [122], die die Expression von VEGF-mRNA in stimulierter Skelettmuskulatur *in vivo* untersuchten. Sie führten diese Versuche bis zu einem Zeitraum

von 21 Tagen durch und fanden am vierten Tag einen vierfachen Anstieg der mRNA für VEGF, der in den folgenden Tagen graduell absank. Begleitend zum Anstieg des VEGF kam es zu einem Anstieg der totalen RNA, so daß, normalisiert zur Menge an Gesamt-RNA, ein Anstieg des VEGF auf den sechsfachen Kontrollwert zu verzeichnen war. Sie führten diesen Anstieg des VEGF auf eine stimulationsinduzierte Hypoxie des Gewebes zurück, die mit zunehmendem kapillären Wachstum wieder zurückging.

Eine andere Erklärung für den Mechanismus eines VEGF-Anstiegs fanden Levy et al. [25]. In neonatalen Rattenmyozyten fanden sie, daß neben einem hypoxischen Trigger auch das depolarisierende Veratridin einen sechsfachen Anstieg der mRNA-Expression auslöste. Diese Induktion konnte durch Verapamil, einen Ca^{2+} -Kanal-Blocker wieder aufgehoben werden. Verapamil alleine hatte keinen Effekt.

Eine durch TGF- β - vermittelten Anstieg von VEGF hielten Li et al. [123] in ihrer Arbeit zu myokardialer Infarzierung für denkbar. Durch die Plazierung eines intraventrikulären Ballons hatten sie eine 6-fache Erhöhung der VEGF-mRNA ausgelöst. Koronarvenöses Blut war in der Lage, die VEGF-Expression in normalen Herzen zu induzieren. Die Inhibition der TGF- β -Aktivität, aber nicht die Inhibition von Endothelin und Angiotensin II, eliminierte diese Induktion.

Insgesamt bieten sich sehr unterschiedliche Erklärungsansätze für die Steuerung der VEGF-Expression in kardialen Myozyten. Unter der Vorstellung einer kontinuierlichen rhythmischen Depolarisation der Zellen scheint eine Induktion durch den erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt durchaus wahrscheinlich.

4.3 Vergleich von Wachstumsfaktor- und elektrischer Feldstimulation

In den Untersuchungen zur Wirkung der EFS auf den Proteinumsatz der Zellen, zeigte sich ein mit den Wachstumsfaktoren vergleichbares Bild. Speziell die Stimulation mit FGF (FGF-1 1,5 x, FGF-2 1,7 x) war mit der 1,6-fach erhöhten Proteinsynthese unter EFS vergleichbar. Weder unter FGF- noch unter EFS-Stimulation ging diese erhöhte Synthese allerdings in einen erhöhten Proteingehalt der Zellen über (FGF 1x, EFS 0,9x), sondern war im Falle der EFS eher leicht erniedrigt. Allerdings erreichte diese Abnahme nicht Werte anderer Wachstumsfaktoren mit 0,7 x für IGF I&II, 0,6 x für LIF und 0,4 x für IL-11. Der Proteingehalt von Wachstumsfaktorengemischen wie ECGS und Serum war dagegen erhöht (1,1 - 1,3 x). Diese Daten sprechen für eine trophische Wirkung der EFS, wie sie auch unter Wachstumsfaktoren beobachtet wird. Allerdings geht diese Stimulation im Beobachtungszeitraum nicht mit einem Gewinn an Protein einher, so daß man in diesem Fall nicht von einer Hypertrophie sprechen kann. Die Daten zeigen eher die Möglichkeit auf, daß sich die Zellen unter Feldstimulation schneller dedifferenzieren. Ob diese Anpassung über die

autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren gesteuert wird, konnte im Rahmen dieser Experimente allerdings nicht geklärt werden. Bei der Untersuchung der Expression von Wachstumsfaktoren unter diesen Bedingungen wurden keine Veränderungen für die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren nachgewiesen. Alleine die mRNA für den Vascular Endothelial Growth Factor stieg unter Stimulation signifikant an (136,6%).

4.4 Zusammenfassung

Das detaillierte Verständnis der Effekte und Interaktionen der Wachstumsfaktoren ist Voraussetzung für einen möglichen klinischen Einsatzes von Wachstumsfaktoren in der Kardiologie. Die Testung von rekombinanten Wachstumsfaktoren kann man in serumhaltigen als auch serumfreien Kulturen von adulten Kardiomyozyten durchführen (für Reviews siehe [29, 39, 81]). Serumfreie Kulturen sind nach meiner Ansicht für diese Fragestellung am besten geeignet, da sie die präzise Beschreibung der Wirkung einzelner oder kombinierter Wachstumsfaktoren erlauben.

Die getesteten humoralen und mechanischen Stimuli beeinflussten nur Teile des Proteinumsatzes in kardialen Myozyten. Sie stimulierten in der Regel die Proteinsynthese, führten aber über eine erhöhte Proteindegradation nicht zur Akkumulation zellulären Proteins und damit nicht zur Hypertrophie im eigentlichen Sinn. Dieses Wirkungsprofil erlaubte die Dedifferenzierung der Zellen in Kultur. Kombinationen vermochten sich dabei entweder gegenseitig zu verstärken (ECGS und IGF I oder II) oder, wie im Falle des TGF- β_1 gezeigt, zu behindern. Erst die Kombination von Wachstumsfaktoren führte in einigen Fällen zur myokardialen Hypertrophie (ECGS, FCS). Neben diesen Peptiden hatte auch die kontraktile Aktivität der Zellen eine trophische Wirkung und ist deswegen als Wachstumsfaktor einzuordnen.

In einem Artikel von 1996 stellte Long Faktoren zusammen, die eine zelluläre Hypertrophie hervorrufen [14]. In diesem Artikel war Hypertrophie durch eine erhöhte Zelloberfläche, den Proteingehalt oder den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in einem *in-vitro*-system definiert (siehe auch Tabelle 1.1-1.3). Die meisten der untersuchten Faktoren (FGFs, TNF α , TGF- β , PDGF, NGF, IGFs, LIF/CDF, VEGF, CT-1, NMDGF, IL-1/-6, Endothelin-I, Angiotensin II und Katecholamine) waren in der Lage, an neonatalen oder adulten Zellen eine Hypertrophie hervorzurufen. Die in meiner Arbeit beschriebenen Daten können das nicht bestätigen. Problematisch ist die Zuordnung zur Hypertrophie, wenn man nur Einzelkriterien zur Einstufung heranzieht. Ist die Zellgröße an sich ein valider Parameter, so ist die Einschränkung der Messung auf die sichtbare Zelloberfläche nicht zulässig. Die Zellen, die

bei Etablierung der Kultur relativ kompakt und dick sind, flachen in den meisten Kulturen ab und zeigen eine vergrößerte Oberfläche. Diese Veränderung ist aber nicht als Hypertrophie, sondern als strukturelle Anpassung an die Kulturbedingungen oder auch Dedifferenzierung zu verstehen. Der Proteingehalt kann durchaus konstant bleiben oder sogar sinken. Der Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren ist eine sehr gute Methode für die Messung der Proteinsynthese. Diese Proteinsynthese darf allerdings nicht mit zellulärer Hypertrophie gleichgesetzt werden, da dieser in manchen Kulturen (IGF I&II) eine starke Proteindegradation gegenübersteht.

Aus der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, daß es keine allgemeine "hypertrophe Reaktion" nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren gibt. Die Wirkung der verschiedenen Faktoren greift auf der Ebene der Signaltransduktion (siehe Abbildung 1.1) ineinander und bildet ein Geflecht von intrazellulären Signalen. *In vivo* kann daher die externe Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht als Dosis-Wirkungs Beziehung begriffen werden, sondern als Eingriff in die Balance der verschiedenen Faktoren im Herzen. Diese Balance wird durch die Überdosierung eines Faktors verschoben.

5. LITERATUR

1. Kaye D., D. Pimental, S. Prasad, T. Mäki, H.J. Berger, P.L. McNeil, and T.W. Smith. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. *J. Clin. Invest* **97**: 281-291, 1996.
2. Anversa P., R. Ricci, and G. Olivetti. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol* **7**: 1140-1149, 1986.
3. Marian A.J. and R. Roberts. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **92**: 1336-1347, 1995.
4. Swinghedauw B. Cardiac hypertrophy and heart failure. 1990, London: Inserm, Libbey Eurotext LTD.
5. van Bilsen M., and K.R. Chien. Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res* **27**: 1140-1149, 1993.
6. Swinghedauw B. Developmental and functional adaption of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* **66** (3): 710-771, 1986.
7. Nag A.C. and M. Cheng. Biochemical evidence for cellular dedifferentiation in adult rat cardiac muscle cells in culture: expression of myosin isozymes. *Biochem and Biophys Res Commun* **137** (2): 855-862, 1986.
8. Eppenberger M.E., I. Hauser, T. Baechli, M.C. Schaub, U.T. Brunner, C.A. Dechesne, and H.M. Eppenberger. Immunocytochemical analysis of the regeneration of myofibrils in long-term cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Dev Biol* **130**: 1-15, 1998.
9. Eppenberger-Eberhardt M., M. Messerli, H.M. Eppenberger, and M Reinecke. New occurrence of atrial natriuretic factor and storage in secretorally active granules in adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term culture. *J Mol Cell Cardiol* **25** (7): 753-757, 1993.
10. Eppenberger-Eberhardt M., S. Aigner, M.V. Donath, V. Kurer, P. Walther, C. Zuppiger, M.C. Schaub, and H.M. Eppenberger. IGF-I and bFGF differentially influence atrial natriuretic factor and α -smooth muscle actin expression in cultured atrial compared to ventricular adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2027-2039, 1997.
11. Eid H., D.M. Larson, J.P. Springhorn, M.A. Attawia, R.C. Nayak, T.W. Smith, and R.A. Kelly. Role of Epicardial Mesothelial Cells in the Modification of Phenotype and

-
- Function of Adult Rat Ventricular Myocytes in Primary Coculture. *Circ Res* **71** (1): 40-50, 1992.
12. Eppenberger-Eberhardt M., I. Flamme, V. Kurer, and H.M. Eppenberger. Reexpression of alpha-smooth muscle actin isoforms in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev Biol* **139**: 269-278, 1990.
 13. Liu L., K.B.S. Pasumarth, R.R. Padua, H. Massaeli, R.R. Fandrich, G.N. Pierce, P.A. Cattani, and E. Kardami. Adult cardiomyocytes express functional high-affinity receptors for basic fibroblast growth factor. *Am J Physiol* **268**: H1927-H1938, 1995.
 14. Long C.S. Autocrine and paracrine regulation of myocardial cell growth in vitro - the TGF β -paradigm. *Trends Cardiovasc Med* **6** (7): 217-226, 1996.
 15. Mitcheson J.S., J.C. Hancox, and A.J. Levi. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* **39** (2): 280-300, 1998.
 16. Eppenberger H.M., C. Hertig, and M. Eppenberger-Eberhardt. Adult rat cardiomyocytes in culture: A model system to study the plasticity of the differentiated cardiac phenotype at the molecular and cellular levels. *Trends Cardiovasc Med* **4**: 187-193, 1994.
 17. Corda S., A. Mebazaa, M.P. Gandolfini, C. Fitting, F. Marotte, J. Peynet, D. Charlemagne, J.M. Cavaillon, D. Payen, L. Rappaport, and J.L. Samuel. Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res* **81** (5): 679-687, 1997.
 18. Fujita M., M. Ikemoto, M. Kishishita, H. Otani, R. Nohara, T. Tanaka, S. Tamaki, A. Yamazato, and S. Sasayama. Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation* **94** (4): 610-613, 1996.
 19. Hewlett G. Strategies for serum-free media (Review). *Cytotechnology* **5**: 3-14, 1991.
 20. Maurer H.R. Adaption of cells from serum-containing to serum-free and chemically defined cultures, in *Animal Cell Culture*, R.I. Freshney, Editor. Oxford University Press: New York. 39-41, 1992.
 21. Thompson N., F. Bazoberry, E.H. Speir, W. Casscells, V.J. Ferrans, K.C. Flanders, P. Kondaiah, A.G. Geiser, and M.B. Sporn. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* **1**: 91-99, 1998.
 22. Flanders K.C., T.S. Winokur, M.G. Holder, and M.B. Sporn. Hyperthermia induces expression of transforming growth factor-beta s in rat cardiac cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **92**: 404-410, 1993.

23. Ladoux A., and C. Frelin. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 1005-1010, 1993.
24. Takahashi N., A. Calderone, N.J. Izzo, T.M. Maki, J.D. Marsh, and W.S. Colucci. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* **94**: 1470-1476, 1994.
25. Levy A.P., N.S. Levy, J. Loscalzo, A. Calderone, N. Takahashi, K.T. Yeo, G. Koren, W.S. Colucci, and M.A. Goldberg. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res* **76**: 758-766, 1995.
26. Schwartz K., J.J. Mercadier, and B. Swynghedauw. Modifications of gene expression in cardiac myocyte hypertrophy. *Heart Failure* **4**: 154-163, 1998.
27. Simpson P.C., C.S. Long, L.E. Waspe, C.J. Henrich, and C.P. Ordahl. Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **21** (Suppl V): 79-89, 1989.
28. Blakesley V.A., A. Scrimgeour, D. Esposito, and D. le Roith. Signaling via the insulin-like growth factor receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* **7**: 153-159, 1996.
29. Schlüter K.D., B.C. Millar, B.J. McDermott, and H.M. Piper. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* **269**: C1347-C1355, 1995.
30. Guse A.H., W. Kiess, B. Funk, U. Kessler, I. Berg, and G. Gercken. Identification and characterization of insulin-like growth factor receptors on adult rat cardiac myocytes: linkage to inositol 1,4,5-trisphosphate formation. *Endocrinology* **130** (1): 145-151, 1992.
31. Gu X.H., R.C. Ou, D.J. Casley, M.J. Daly, and W.G. Nayler. Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J Cardiovasc Pharmacol* **19** (5): 764-769, 1992.
32. Fuller S.J., C.J. Gaitanaki, and P.H. Sugden. Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. *Biochem J* **266**: 727-736, 1990.
33. Wahlander H., J. Isgaard, E. Jennische, and P. Friberg. Left ventricular insulin-like growth factor I increases in early renal hypertension. *Hypertension* **19** (1): 25-32, 1992.
34. Engelmann G.L., K.D. Boehm, and J.F. Haskell. Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats. *Mol Cell Endocrinol* **63**: 1-14, 1989.

-
35. Donath M.Y., J Azpf, M. Eppenberger-Eberhardt, and H.M. Eppenberger. Insulin-like growth factor 1 stimulates myofibril development and decreases smooth muscle α -actin of adult cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci* **19**: 1686-1690, 1994.
 36. Fuller S.J., J.R. Mynett, and P.H. Sugden. Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem J* **282**: 85-90, 1992.
 37. Harder B.A., M.C. Schaub, H.M. Eppenberger, and M. Eppenberger-Eberhardt. Influence of fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor (IGF-I) on cytoskeletal and contractile structures and on atrial natriuretic factor (ANF) expression in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 19-31, 1996.
 38. Ito H., Y. Hirata, S. Adachi, M. Tanaka, A. Kioke, A. Nogami, F. Marumo, and M. Hiroe. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* **92**: 398-403, 1993.
 39. Hefti M.A., B.A. Harder, H.M. Eppenberger, and M.C. Schaub. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2873-2892, 1997.
 40. Parker T.G., K.-L. Chow, R.J. Schwartz and M.D. Schneider. Positive and negative control of the skeletal alpha-actin promoter in cardiac muscle. *J Biol Chem* **267** (5): 3343-3350, 1992.
 41. Quinkler W., M. Maasberg, S. Bernatot-Danielowsky, N. Luthe, H.S. Sharma, and W. Schaper. Isolation of heparin-binding growth factors from bovine, porcine and canine hearts. *Eur J Biochem* **181**: 67-73, 1989.
 42. Sasaki H., H. Hoshi, Y.M. Hong, T. Suzuki, T. Kato, H. Sasaki, M. Saito, H. Youki, K. Karube, S. Konno, M. Onodera, T. Saito, and S. Aoyagi. Purification of acidic fibroblast growth factor from bovine heart and its localization in the cardiac myocytes. *J Biol Chem* **264**: 17606-17612, 1989.
 43. Speir E., V. Tanner, A.M. Gonzalez, J. Farris, A. Baird, and W. Casscells. Acidic and basic fibroblast growth factors in adult rat heart myocytes. Localization, regulation in culture, and effects on DNA synthesis. *Circ Res* **71**: 251-259, 1992.
 44. Ullrich A., and I. Schlessinger. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212, 1990.
 45. Johnson D.E. and L.T. Williams. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* **60**: 1-41, 1993.
 46. Friesel R.E., and T. Maciag. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *Faseb J* **9**: 919-925, 1995.
 47. Florkiewicz R.Z., R.A. Majack, R.D. Buechler, and E. Florkiewicz. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* **162** (3): 388-399, 1995.

-
48. Mignatti P., T. Morimoto, and D.B. Rifkin. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* **151**: 81-93, 1992.
 49. Bastagli L., T. Lazzarotto, C.M. Caldarera, C. Guarnieri, C. Ventura, G. Pepe, and P. Puddu. Presence of basic fibroblast growth factor in cultured rat cardiomyocytes and its release in culture medium. *Ann NY Acad Sci* **752**: 417-421, 1995.
 50. Logan A. Intracrine regulation at the nucleus - a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol* **125**: 339-343, 1990.
 51. Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine & Growth Factor Rev* **7** (4): 311-325, 1996.
 52. Lathrop B., E. Olson, and L. Glaser. Control by fibroblast growth factor of differentiation in the BC3H1 muscle cell line. *J Cell Biol* **100**: 1540-1547, 1985.
 53. Olwin B.B., and S.D. Hauschka. Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. *Biochemistry* **25**: 3487-3492, 1986.
 54. Hilton D.J. and N.M. Gough. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J Cell Biochem* **46** (1): 21-26, 1991.
 55. Hilton D.J. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* **17** (2): 72-76, 1992.
 56. Hilton D.J., N.A. Nicola, N.M. Gough, and D. Metcalf. Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *J Biol Chem* **263** (19): 9238-9243, 1998.
 57. Metcalf D., N.A. Nicola, and D.P. Gearing. Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* **76** (1): 50-56, 1990.
 58. Pennica D., K. King, K. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S.M. Luoh, E.C. Darbonne, D.S. Knutzon, R. Yen, K.R. Chien, J.B. Baker, and W.I. Wood. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* **92** (4): 1142-1146, 1995.
 59. Lawrence D.A. Transforming growth factor- β : an overview. *Kidney Int Suppl* **49**: S19-23, 1995.
 60. Massague J., S. Cheifetz, M. Laiho, D. Ralph, F.M. Weis, and A. Zentella. Transforming Growth factor- β . *Cancer Surv* **12**: 81-103, 1992.
 61. Engelmann G.L., K.D. Boehm, M.C. Birchenall-Roberts, and F.W. Ruscetti. TGF- β 1 in heart development. *Mech Dev* **38**: 85-98, 1992.
 62. Jakolew S.B., J. Cubert, D. Danielpour, M.B. Sporn, and A.B. Roberts. Differential regulation of the expression of TGF- β mRNAs by growth factors and retinoic acid in

- chicken embryo chondrocytes, myocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol* **150**: 377-385, 1992.
63. Potts J.D., E.B. Vincent, R.B. Runyan, and D.L. Weeks. Sense and antisense TGF- β 3 mRNA levels correlate with cardiac valve induction. *Dev Dyn* **193**: 340-345, 1992.
64. Ross J., D.R. Janero, and D. Hreniuk. Identification and molecular characterization of a high-affinity cardiomyocyte transforming-growth- β 2 receptor. *FEBS Letter* **320**: 229-234, 1993.
65. Roberts A.B., N.S. Roche, T.S. Winokur, J.K. Burmester, and M.B. Sporn. Role of transforming growth factor beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest* **90**: 2056-2062, 1992.
66. Schlüter K.D., X.J. Zhou, and H.M. Piper. Induction of hypertrophic responsiveness to isoprenaline by TGF- β in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* **269**: C1311-C1316, 1995.
67. Villarreal F.J. and W.H. Dillmann. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- β 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* **262**: H1861-H1866, 1992.
68. Sadoshima J., and S. Izumo. Molecular characterization of ANG-II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* **73**: 413-423, 1993.
69. Massague J., S. Cheifetz, and T. Endo. Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8206-8210, 1986.
70. Blachowski S., T. Motyl, A. Orzechowski, K. Grzelkowska, and B. Interewicz. Comparison of metabolic effects of EGF, TGF- α , and TGF- β in primary culture of fetal bovine myoblasts and rat L6 myoblasts. *Int J Biochem* **25**: 1571-1577, 1993.
71. Watson P.A. Mechanical activation of signaling pathways in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* **6**: 73-79, 1996.
72. Komuro I., T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, Y. Katoh, E. Hoh, F. Takaku, and Y. Yazaki. Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* **265** (7): 3595-3598, 1990.
73. Komuro I., Y. Katoh, T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, E. Hoh, F. Takaku, and Y. Yazaki. Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem* **266** (2): 1265-1268, 1991.
74. Sadoshima J., and S. Izumo. Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *J Recept Res* **13** (1-4): 777-794, 1993.
75. Sadoshima J., T. Takahashi, L. Jahn, and S. Izumo. Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early

- gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci* **89** (20): 9905-9909, 1992.
76. Yamazaki T., I. Komuro, S. Kudoh, Y. Zou, I. Shiojima, T. Mizuno, H. Takano, Y. Hiroi, K. Ueki, K. Tobe, T. Kadowaki, R. Nagai, and Y. Yazaki. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* **77**: 258-265, 1995.
77. Kent R.L., and P.J. McDermott. Passive load and angiotensin II evoke differential responses of gene expression and protein synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* **78**: 829-838, 1996.
78. Piper H.M., I. Probst, P. Schwartz, J.F. Htter, and P.G. Spieckermann. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **14**: 397-412, 1982.
79. Berger H.J., S.K. Prasad, A.J. Davidoff, D. Pimental, Ø Ellingsen, J.D. Marsh, T.W. Smith, and R.A. Kelly. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol* **266**: H341-H349, 1994.
80. Gostelli-Peter M.A., B.A. Harder, H.M. Eppenberger, J. Zapf, and M.C. Schaub. Triiodothyronine induces over-expression of α -smooth muscle actin, restricts myofibrillar expansion and is permissive for the action of basic Fibroblast Growth Factor and Insulin-like Growth Factor I in Adult Rat Cardiomyocytes. *J Clin Invest* **98**: 1737-1744, 1996.
81. Schaub M.C., M.A. Hefti, B.A. Harder, and H.M. Eppenberger. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* **75** (11-12): 901-920, 1997.
82. Parker T.G., S.E. Packer, and M.D. Schneider. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* **85**: 507-514, 1990.
83. Schmidt M.F., and S.B. Kater. Depolarization and laminin independently enable bFGF to promote neuronal survival through different second messenger pathways. *Dev Biol* **168**: 235-246, 1995.
84. Powell T., D.A. Terrar, and V.W. Twist. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol* **302**: 131-153, 1980.
85. Piper H.M., A. Volz, and P. Schwartz. Adult ventricular heart muscle cells, in Tissue culture techniques in heart and vessle research, H.M. Piper, Editor. Berlin Heidelberg. 36-60, 1992.
86. Kato S., C.T. Ivester, G. Cooper IV, M.R. Zille, and P.J. McDermott. Growth effects of electrically stimulated contraction on adult feline cardiocytes in primary culture. *Am J Physiol* **268**: H2495-2504, 1995.

-
87. Cesarone C.F., C. Bolognesi, and L. Santi. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* **100**: 188-197, 1979.
 88. Flynn T.G. The elucidation of the structure of atrial natriuretic factor, a new peptide hormone. *Can J Physiol Pharmacol* **65**: 2013-2020, 1987.
 89. Schiaffino S., J.L. Samuel, D. Sassoon, A.M. Lompré, I. Garner, F. Marotte, M. Buckingham, L. Rappaport, and K. Schwartz. Nonsynchronous Accumulation of α -Skeletal Actin and β -Myosin Heavy Chain mRNAs During Early Stages of Pressure-Overload-Induced Cardiac Hypertrophy Demonstrated by In Situ Hybridisation. *Circ Res* **64**: 937-948, 1988.
 90. McNally E.M., K.M. Gianola, and L.A. Leinwand. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for α cardiac myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res* **17**: 7527-7528, 1989.
 91. Kraft R., M. Bravo-Zehnder, D.A. Taylor, and L.A. Leinwand. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for rat β cardiac myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res* **17**: 7529-7530, 1989.
 92. Goodrich S.P., and G.C. Yan, K. Bahrenburg, and P.E. Mansson. The nucleotide sequence of rat heparin-binding growth factor 1. *Nucleic Acids Res* **17** (17): 7, 1989.
 93. Shimazaki S. Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its RNA. *Biochim Biophys Res Comm* **157**: 256-263, 1988.
 94. Yazaki N., F. Hiroko, O. Mitsuhiro, K. Toshisuke, and I. Nobuyuki. The structure and expression of the FGF receptor-1 mRNA isoforms in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* **1172**: 37-42, 1993.
 95. Qian S.W., P. Kondaiah, A.B. Roberts, and M.B. Sporn. cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor-beta 1. *Nucleic Acids Res* **18**: 3059, 1990.
 96. Yamada Y., J. Nezu, H. Shimane, and Y. Hirata. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* **42** (3): 483-488, 1997.
 97. Sharma H.S., Z.H. Tang, B.C. Gho, and P.D. Verdouw. Nucleotide sequence and expression of the porcine vascular endothelial growth factor. *Biochim Biophys Acta* **1260** (2): 235-238, 1995.
 98. Clark W.A. Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthetic capacity of intact adult hearts. *Am J Physiol* **264** (33): H573-H582, 1993.
 99. Volz A., H.M. Piper, B. Siegmund, and P. Schwartz. Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* **23**: 161-173, 1991.

-
100. Schlüter K.D., M. Weber, and H.M. Piper. Parathyroid hormone induces protein kinase C but not adenylate cyclase in adult cardiomyocytes and regulates cyclic AMP levels via protein kinase C-dependent phosphodiesterase activity. *Biochem J* **310**: 439-444, 1995.
 101. Morgan H.E., D.C.N. Earl, A. Broadus, E.B. Wolpert, K.E. Giger, and L.S. Jefferson. Regulation of protein synthesis in the heart muscle. *J Biol Chem* **246**: 2152-2162, 1971.
 102. Frelin C. The regulation of protein turnover in newborn rat heart cell cultures. *J Biol Chem* **255**: 11149-11155, 1980.
 103. Decker R.S., M.G. Cook, M. Behnke-Barclay, and M.L. Decker. Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading. *Circ Res* **77**: 544-555, 1995.
 104. Schaffer W., and R.S. Williams. Age-dependent changes in expression of α 1-adrenergic receptors in rat myocardium. *Biophys Res Commun* **138**: 387-391, 1986.
 105. Takahashi T., H. Schunkert, S. Isoyama, J.Y. Wie, B. Nadall-Ginard, W. Grossman, and S. Izumo. Age-related differences in the expression of proto-oncogenes and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J Clin Invest* **89**: 939-946, 1992.
 106. Rampe D., A.E. Lacerda, R.C. Dage, and A.M. Brown. Parathyroid hormone: an endogenous modulator of cardiac calcium channels. *Am J Physiol* **261** (30): H1945-H1950, 1991.
 107. Morgan H.E., E.E. Gordon, Y. Kira, B.H.L. Chua, L.A. Russo, C.J. Peterson, P.J. McDermott, and P.A. Watson. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol* **49**: 533-543, 1987.
 108. Samarel A.M., G.L. Engelmann. Contractile activity modulates myosin heavy chain- β expression in neonatal rat heart cells. *Am J Physiol* **261**: H1067-H1077, 1991.
 109. Samarel A.M., M.L. Spragia, V. Maloney, S.A. Kamal, and G.L. Engelmann. Contractile arrest accelerates myosin heavy chain degradation in neonatal rat heart cells. *Am J Physiol* **263**: C642-C652, 1992.
 110. Xia Y., M. Buja, and J.B. McMillinM. Change in expression of heart carnitine palmitoyltransferase I isoforms with electrical stimulation of cultured rat neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem* **271** (20): 12082-12087, 1996.
 111. Krueger J.W., D. Foretti, and B.A. Wittenberg. Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells. *J Gen Physiol* **76**: 587-607, 1980.
 112. Haworth R.A., D.R. Hunter, and H.A. Berkoff. The isolation of Ca^{2+} -resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* **12**: 715-724, 1980.

-
113. Haworth R.A., D.R. Hunter, H.A. Berkhoff, R.L. Moss. Metabolic cost of the stimulated beating of isolated adult rat heart cells in suspension. *Circ Res* **52**: 342-351, 1983.
 114. Shimizu N., B. Camoretti-Mercado, and S. Jakovic. RNA Transcription in Heart Muscle, in *The Heart and Cardiovascular System*, F.e. al., Editor. Raven Press: New York. 1525-1538, 1992.
 115. McDermott P.J., L.L. Carl, K.J. Conner, and S.N. Allo. Transcriptional regulation of ribosomal RNA synthesis during growth of cardiac myocytes in culture. *J Biol Chem* **266** (7): 4409-4416, 1991.
 116. McDonough P.M. and G.C. Glembotski. Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction. *J Biol Chem* **267** (17): 11665-11668, 1992.
 117. Bauer E.P., S. Kuki, M. Arras, R. Zimmermann, and W. Schaper. Increased growth factor transcription after pulmonary artery banding. *Eur J Cardiothorac Surg* **11** (5): 818-823, 1997.
 118. Bauer E.P., S. Kuki, R. Zimmermann, and W. Schaper. Upregulated and downregulated transcription of myocardial genes after pulmonary artery banding in pigs. *Ann Thorac Surg* **66** (2): 527-531, 1998.
 119. Susic D., E. Nunez, E.D. Frohlich, and O. Prakash. Angiotensin II increases left ventricular mass without affecting myosin isoform mRNAs. *Hypertension* **28**: 265-268, 1996.
 120. McNeil P.L., and R. Khakee. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. *Am J Path* **140** (5): 1097 - 1109, 1992.
 121. Clarke M.S.F., R.W. Caldwell, H. Chiao, K. Miyake, and P.L. McNeil. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* **76**: 927-934, 1995.
 122. Hang J., L. Kong, J.W. Gu, and T.H. Adair. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **269**: H1827-H1831, 1995.
 123. Li J., T. Hampton, J.P. Morgan, and M. Simons. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* **100**: 18-24, 1997.
 124. Harada K., I. Komuro, Y. Zou, S. Kudoh, K. Kijima, H. Matsubara, T. Sugaya, K. Murakami, Y. Yazaki. Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice. *Circ Res*, 82(7): 779-785, 1998.
 125. Niggli E., and W.J. Lederer. Restoring forces in cardiac myocytes insight from relaxations induced by photolysis of caged ATP. *Biophys J* **59**: 1123-1135, 1991.
 126. Brady A.J. Mechanical properties of isolated cardiac myocytes. *Physiol Rev* **71**: 413-428, 1991.

6. Technischer Anhang

Es gibt aus den Jahren '94 und '95 zwei Publikationen über die Methode der elektrischen Feldstimulation. In diesen beschreiben Berger et al. [79] und Kato et al. [86] zwei verwandte Methoden, adulte Kardiomyozyten der Ratte bzw. der Katze mittels eines elektrischen Feldes *in vitro* zur synchronen Kontraktion anzuregen. Sie verwendeten zu diesem Zweck Graphitelektroden, die sie am Rande der Schale ins Medium tauchten und auf der anderen Seite mit einem Stimulator verbanden.

6.1 Geeignete Elektrodenanordnung

Für die Versuche zur elektrischen Feldstimulation wurden verschiedene Elektrodenanordnungen getestet, die sich zum Teil als nur bedingt brauchbar erwiesen. Die jeweiligen Elektrodenpaare wurden dabei mit Impulsen wechselnder Polarität beschickt, um den Aufbau von Ladungen in dem elektrischen Feld entgegenzuwirken. Dabei war es wichtig, eine Fläche zu stimulieren, auf der sich genug Myozyten für eine molekularbiologische Untersuchung kultivieren ließen.

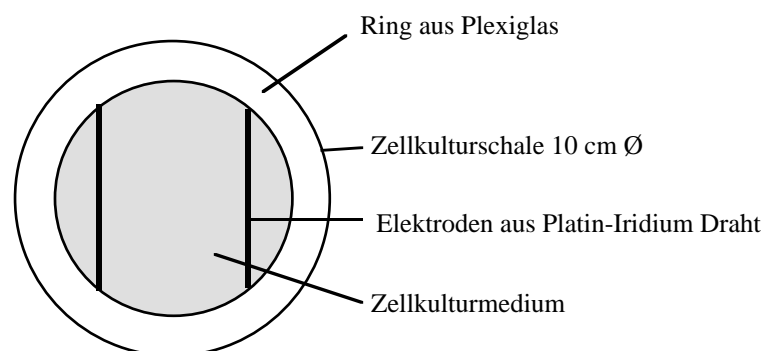


Abbildung 6.1 Zwei Platinelektroden in runder Schale

Abbildung 6.1. Dafür wurden am Anfang runde Zellschalen von Costar mit einem Durchmesser von 10 cm benutzt. Die Anordnung von zwei Platindrähten, die in paralleler Anordnung ein etwa rechteckiges Feld stimulieren, war in der Lage, die Zellen in der Mitte zwischen den beiden Elektroden zur Kontraktion anzuregen. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich durch diese Anordnung stimulieren ließ, war sehr hoch (>90%). Allerdings war, bedingt durch die runde Form der Schale, ein relativ großes Areal der Zellschale (etwa 50%) im Bereich außerhalb des elektrischen Feldes nicht stimuliert, so daß bei Ernte der Zellen ein großer Teil der Zellen während des Experiments unstimuliert geblieben war. Des weiteren starben eine große Anzahl von Zellen im Laufe eines längeren, etwa 8 Stunden

dauernden Experiments ab, da die Elektrolyse an den Platin-Iridium Drähten bei den verwendeten relativ hohen Strömen über die Zeit zu hoch war.

Abbildungen 6.2 a&b. Unter der Vorstellung, daß die Ausrichtung des Myozyten im elektrischen Feld die Schwelle zur Depolarisation bestimmt, wurde das nächste Modell (Abb. 6.2a) gebaut. Hierbei wurden in den auch vorher verwendeten Plexiglasring zwei Elektrodenpaare eingesetzt. Diese wurden in ständigem Wechsel aktiviert, so daß die positive Elektrode jeweils im Uhrzeigersinn um diesen Ring lief und die jeweils gegenüberliegende Elektrode negativ geladen war. Diese Anordnung führte dazu, daß die verwendete Stromstärke zur Auslösung einer Kontraktion niedriger wurde als in dem vorher getesteten Modell, was zu einer zeitlich verlängerten Stimulierbarkeit der Zellen führte. Allerdings war das Areal, in dem die Zellen optimal mit Strom versorgt wurden, sehr inhomogen.

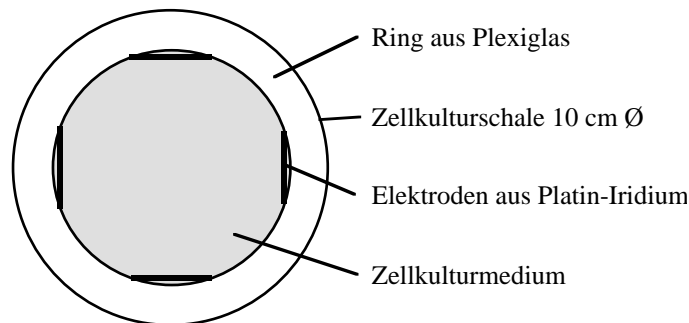


Abbildung 6.2 a Vier Platinelektroden in runder Schale

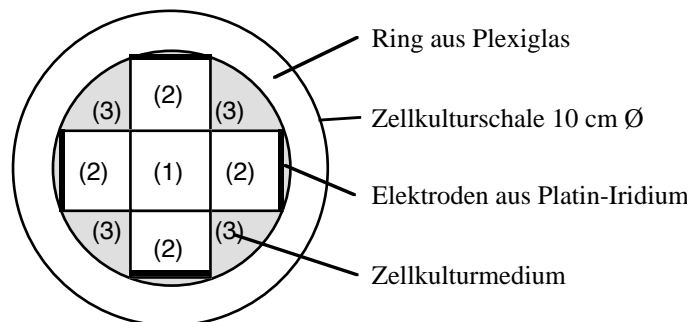


Abbildung 6.2 b Verteilung des elektrischen Feldes

Das quadratische Feld in der Mitte, das von beiden Elektroden optimal versorgt wurde, war relativ klein (1) (Abb 6.2b). Es entsprach in Höhe und Breite den Maßen der Elektroden. Die Areale zwischen diesem optimal versorgten Feld und den Elektroden selbst (2) war wesentlich schlechter stimulierbar, und die Areale an den Seiten (3) zwischen zwei

benachbarten Elektroden waren bei den verwendeten Strömen nicht stimuliert (Abb. 6.2b). Allein durch die Inhomogenität des elektrischen Feldes war dieses Modell so nicht für weitergehende Untersuchungen geeignet.

Abbildung 6.3. Diese Versuche implizierten die Verwendung von rechteckigen Schalen für die Feldstimulation, da die stimulierbare Fläche maximal und die nicht nutzbare Fläche relativ begrenzt ist. Dazu wurden nach dem Modell von Berger die Zellkulturflaschen EZIN™ von Nunc benutzt, von denen der Deckel entfernt werden kann (Abb. 6.3). Man hatte so von oben einen einfachen Zugriff auf die Schale und konnte die Elektroden gut einsetzen. Sie durchzogen die Längsseite der Schale und bildeten so ein sehr homogenes elektrisches Feld. Mehr als 80% der Schale war direkt optimal stimulierbar und damit für die molekularbiologischen Untersuchungen zu verwenden. Zwei offensichtliche Nachteile hatte auch diese Schale. Zum einen hatte das Areal, auf dem die Myozyten wuchsen, einen "Erker" hin zum Flaschenhals, so daß das Stimulationsareal nicht ganz so homogen war, wie es in einem rechteckigen Feld zu erwarten wäre, andererseits verwirklicht sie nicht die Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten, in denen sich überkreuzte Elektrodenpaare als sinnvoll erwiesen hatten.

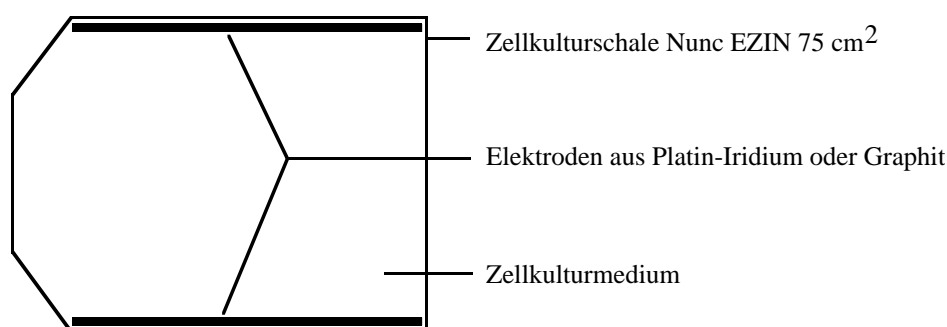


Abbildung 6.3 EZIN™ Schalen von Nunc

Abbildung 6.4. Auf der Suche nach einer praktikableren Lösung für nicht so zellintensive Experimente wurde dann das Modell von Kato angewandt. Sie hatten ähnliche Vierwellschalen wie die QUADRIPERM™ -Schalen von Heraeus verwendet (Abb. 6.4). Hier ist das elektrische Feld homogen durch ein exakt rechtwinkeliges Stimulationsfeld. Die einzelnen Kammern sind in Reihe geschaltet, und die Polarität dreht mit jedem Impuls wie auch in den Modellen zuvor.

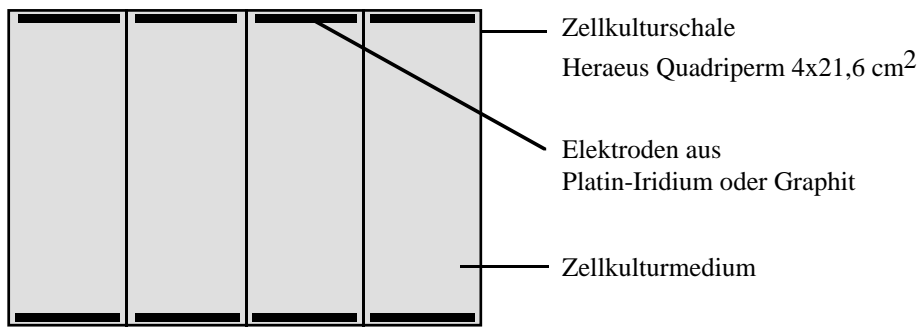


Abbildung 6.4 QUADRIPERM™ Schalen von Heraeus

Abbildung 6.5. Die vielleicht ideale Schale für die elektrische Feldstimulation ist im Handel bisher nicht zu finden (Abb 6.5). Sie wäre in etwa 100 cm² groß, um ausreichend Zellen für die Molekularbiologie bereitzustellen und würde dann mit zwei Elektrodenpaaren bestückt. Dadurch hätte man ein homogenes elektrisches Feld, wenig nicht stimulierbare Areale und eine relativ niedrige Reizschwelle.

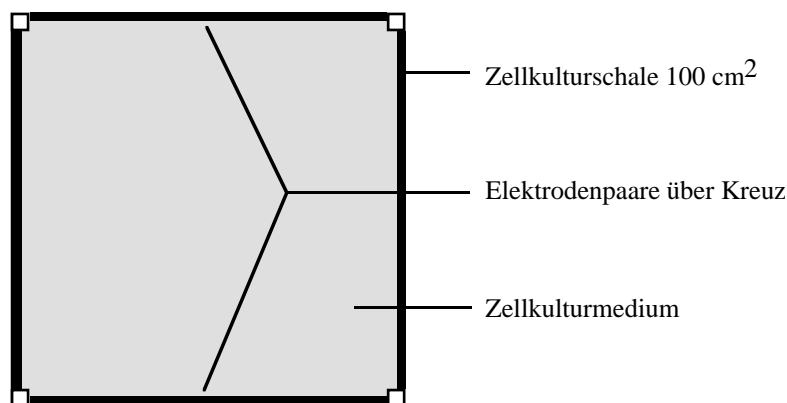


Abbildung 6.5 Idealisierte Schale.

6.2 Geeignetes Elektrodenmaterial

Auf der Suche nach geeignetem Elektrodenmaterial standen Platin-Iridium Draht, Silberchloriddraht und Graphit zur Verfügung. Alle drei Materialien waren von verschiedenen Autoren schon zur Durchführung der elektrischen Feldstimulation verwendet worden. Während der Vorversuche mit den verschiedenen Schalen fiel auf, daß sich während der Stimulation an dem Draht aus Platin-Iridium Luftblasen bildeten und zum Teil bei längeren Stimulationszeiten sogar Proteine ausflockten. Während kurzzeitiger Stimulation war das Medium in der Lage, diese Elektrolyse zu kompensieren. Über längere Stimulationszeiten hinweg jedoch färbte sich das Medium, das mit dem Indikator Phenolrot versetzt war, im

Bereich der Elektroden gelb, ein Zeichen für einen sauren pH-Wert. Die Zellen, die sich in diesem Bereich befanden, wurden blasig und rundeten sich ab. Im Anschluß daran verloren sie den Kontakt zur Zellkulturschale. Man konnte den Grad der Elektrolyse sehr stark durch die Menge des verwendeten Stroms beeinflussen. Der Strom selbst jedoch mußte eine ausreichende Stärke haben, um die Zellen zur Kontraktion anzuregen.

Graphit leitet relativ gut und ist in Stäben in verschiedenen Dicken erhältlich. In den Versuchen wurden Stäbe mit einem Durchmesser von 1/4 inch verwendet. Sie waren zum einen dick genug, um eine ausreichende Oberfläche für den Stromaustritt zu bieten, passten aber noch sehr gut in die 75 cm² EZIN™-Schalen von Nunc und in die QUADRIPERM™-Schalen von Heraeus. An ihnen ist während des gesamten Experiments keine Elektrolyse zu sehen, und das Medium behält auch bis zum Abschluß der Stimulation seinen pH von 7,4.

Beim Erwerb der Elektroden sind diese in aller Regel poliert (Goodfellow, Ladd Research Industries). Diese Politur entsteht beim Pressen der Elektroden dadurch, daß sich der feine Staub in die natürliche Porosität des Graphit einlagert, und so die Dichte in den Außenschichten der Elektroden höher ist als in der Mitte des Stifts. Dadurch nimmt der Stift an den Außenseiten relativ schlecht Flüssigkeit an, sie perlt ab. Durch ein leichtes Anschleifen der Graphitstäbe erreichte man, daß die Stäbe bei Benetzung mit Aqua dest. oder Medium die Flüssigkeit besser in sich aufsaugten. Die Oberfläche war so um ein Vielfaches höher als die rein rechnerische Oberfläche der Elektroden.

6.3 Detaillierte Konstruktion der Elektroden

Für die elektrische Feldstimulation mußten für die zwei Modelle zwei ganz unterschiedliche Konstruktionen für die Elektroden benutzt werden. Zum einen sollte in den EZIN™-Flaschen ein großes gleichförmiges Feld erzeugt werden. Die QUADRIPERM™-Schale erforderte einen ganz anderen Aufbau, da sie aus vier in Reihe geschalteten elektrischen Feldern besteht. Bei der Konstruktion und Zusammenstellung der Elektroden mußten zwei Bedingungen erfüllt werden. Zum einen sollte der Graphitstift über seine ganze Breite für den Übertritt des Stroms zur Verfügung stehen, da die Oberfläche, durch die der Strom austritt, das Ausmaß der Elektrolyse bestimmt. Zum anderen durfte die Stromzuleitung nicht mit dem Medium in Kontakt kommen, da an dem dünnen Platindraht sofort Elektrolyse entsteht.

Zur Erfüllung dieser beiden Voraussetzungen wurden bei den beiden Modellen ähnliche, aber nicht identische Wege beschritten. In dem EZIN™-Modell wurde die Elektrode, die jeweils an der Längsseite der Schale liegt, in der Mitte von oben her angebohrt und mit einem Gewinde versehen. In dieses Loch wurde dann eine Halterung eingedreht, die die Elektrode

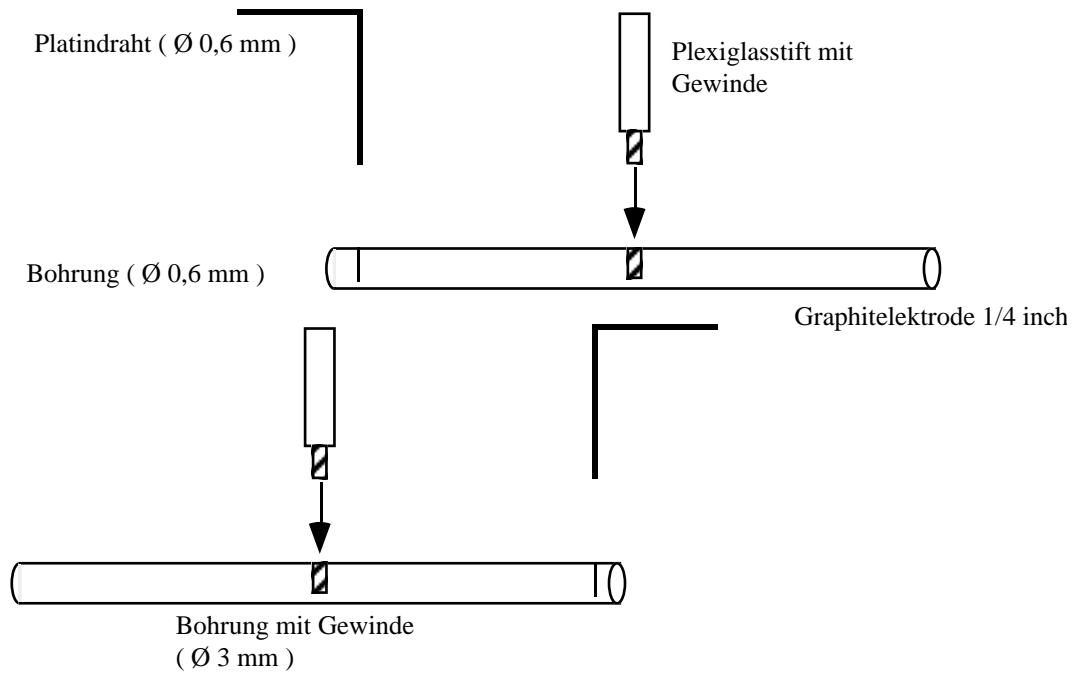


Abbildung 6.6 Elektroden für die EZIN™-Schalen von Nunc.

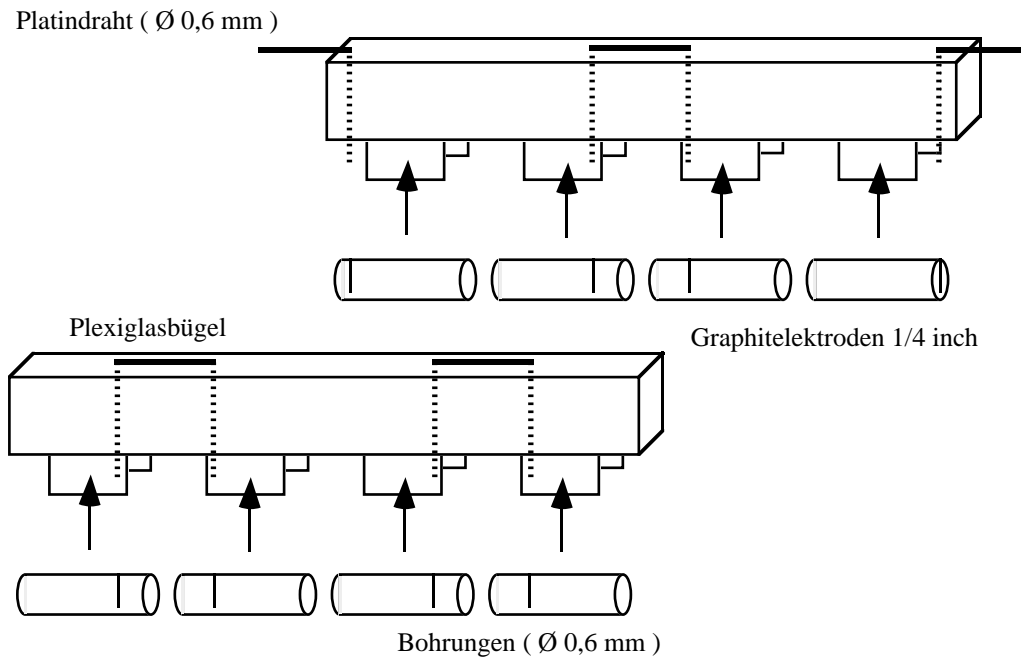


Abbildung 6.7 Elektroden für die QUADRIPERM™-Schalen von Heraeus

mit dem Deckel verbindet. Eine weitere 0,6 mm starke und 5 mm tiefe Bohrung an den jeweils gegenüberliegenden Enden der Elektroden nahm die zuführenden Platindrähte auf. Dadurch konnte der Kontakt zwischen Elektrode und Medium verhindert und eine sehr gute Überleitung des Stroms in die Elektrode gewährleistet werden. Der Platindraht wurde aus der Stimulationsschale herausgeleitet und dann über Steckverbindungen mit dem Gerät für die elektrische Feldstimulation verbunden.

Für die QUADRIPERMTM-Schalen von Heraeus galten die gleichen Voraussetzungen, wie für die Schalen von Nunc. Allerdings ließ sich eine Elektroden-Halterung, wie die oben beschriebene, in diesem Modell aus rein geometrischen Gründen nicht verwenden. Hier wurde einen Plexiglasbügel über die Elektrodenschale gelegt, in die in den einzelnen Wells spangenartige Halterungen für die Elektroden eingefräst wurden. Die Weite dieser Spangen entspricht knapp der der Graphitstifte. Dadurch ließ sich die Elektrode jeweils durch leichten Druck in diese Spange pressen und saß dadurch fest. Die Zuführung des Stroms erfolgte wie bei den EZINTM-Schalen durch eine kleine Bohrung an den jeweils gegenüberliegenden Enden der Stifte. Die Platindrähte wurden dann über korrespondierende Bohrungen im Plexiglasbügel nach außen geführt und mit der nächsten Elektrode oder mit dem Stimulationgerät verbunden.

6.4 Die Verteilung des elektrischen Feldes bei verschiedenen Elektroden

Die Verwendung runder Elektroden birgt eine Gefahr. Betrachtet man das elektrische Feld einer runden Elektrode in einem Leiter wie Wasser oder Medium, ergibt sich eine sehr unterschiedliche Verteilung der elektrischen Feldstärke in unmittelbarer Nachbarschaft der Elektrode, wie man der nächsten Graphik entnehmen kann.

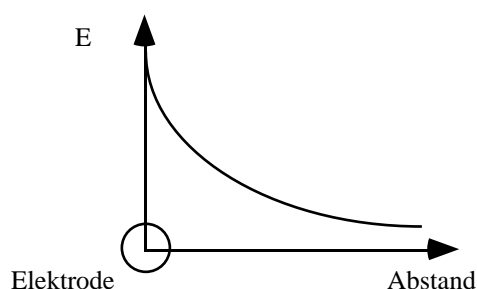


Abbildung 6.8 Verteilung des elektrischen Feldes an den Elektroden

In unmittelbarer Nähe der Elektrode befindet sich ein starkes elektrisches Feld, das mit der Entfernung von der Elektrode immer mehr abnimmt. Übertragen auf dieses Modell zeigte sich in Nachbarschaft der Elektroden ein starkes Absterben der Zellen in einem Zeitraum von 24

Stunden, während die Zellen, die am weitesten von beiden Elektroden entfernt waren, ein Vielfaches der Zeit intakt waren.

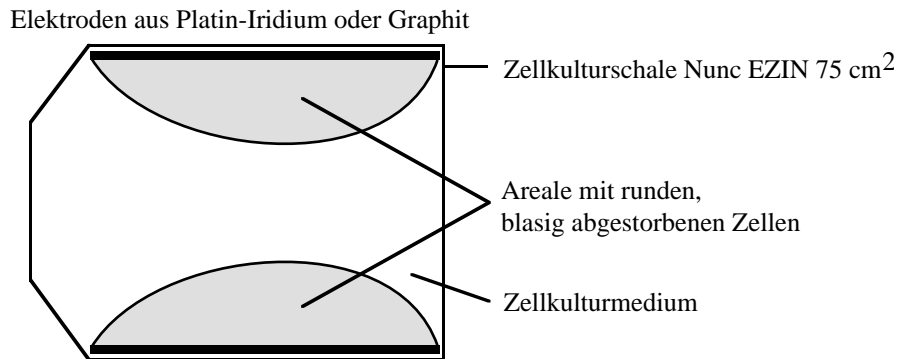


Abbildung 6.9 Areal mit runden, blasig abgestorbenen Zellen.

Reduzierte man nun den applizierten Strom, so verkleinerte sich dieses Feld zusehends und verschwand ab einer Stromstärke, die allerdings nicht mehr ausreichte, die Zellen zu stimulieren.

6.5 Das Volumen des Mediums

Das Anlegen eines bestimmten Stroms über die definierte Oberfläche einer Elektrode produziert über die Zeit eine bestimmte Menge Elektrolyse. Andererseits ist ein bestimmter Strom pro cm² Mediumsquerschnittsfläche erforderlich, um die Zellen zur Kontraktion anzuregen. Fließt nun Strom durch das Medium, der sich nicht an der Erzeugung einer Depolarisation beteiligt, ist dieser für die Zellen nicht nur nicht nützlich, sondern nur schädlich. Daher wurde die Mediumsmenge reduziert, damit ein möglichst großer Teil des applizierten Stroms zur Depolarisation der Zelle beiträgt. Theoretisch wäre eine Mediumsmenge, die in der Höhe genau den Myozyten entspricht, ideal gewesen, praktisch allerdings sollten auch Reserven vorhanden sein, wenn Teile des Mediums verdunsten. In den nun folgenden Versuchen wurde 7,5 ml Medium verwendet. Die Elektroden, die ja nicht mehr vom Medium bedeckt waren, hatten allerdings nach wie vor eine große Kontaktfläche zum Medium, da sich Flüssigkeit an der Elektrode und zwischen Schalenwand und Elektrode hochzog und so schätzungsweise fast 70% der Elektrode bedeckte. Im Verhältnis zum applizierten Strom floß jetzt allerdings viel weniger Strom pro cm² Elektrodenoberfläche, ein Umstand, der zu einer Verminderung der Elektrolyse führte. Es konnte somit eine Stromdichte im Bereich der Myozyten erzeugt werden, die zur Depolarisation der Zellen ausreichte, andererseits nicht durch technische Mängel zu einem Absterben der Zellen führte.

CURRICULUM VITAE

Name: Peter Bramlage
Geboren: 06. Mai 1969, in Essen in Oldenburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung und Ersatzdienst

1975 bis 1988 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Cloppenburg
5/1988 Allgemeine Hochschulreife
1988 bis 1990 Ersatzdienst und Ausbildung zum Rettungsassistenten beim DRK in
Cloppenburg

Studium

1990 bis 1997 Justus-Liebig-Universität Giessen
4/1992 Physikum
1992-93 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie,
Giessen, Prof. Dr. E. Zeissberger
4/1993 I. Staatsexamen
1993-94 Universität Wien, Österreich
4/1996 II. Staatsexamen
2-6/1997 PJ Innere Medizin in Columbia, MO, USA
Prof. Dr. K.T. Weber
10/1997 III. Staatsexamen, Approbation

Promotion

1994 bis 1996 Durchführung der experimentellen Arbeiten zur Promotion bei
Prof. Dr. W. Schaper in der Abteilung für experimentelle Kardiologie
des Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung,
Bad Nauheim

Ärztliche Tätigkeit

1998 bis 1999 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Kardiologie, Angiologie und
Pulmonologie bei Prof. Dr. G. Baumann, Charite Berlin
seit 01.10.1999 Assistenzarzt bei Prof. Dr. G. Baumann

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Schaper für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit und die Ruhe und Geduld, die er aufbrachte, um mich durch alle Höhen und Tiefen meiner Arbeit zu tragen. Ich habe sehr viel von ihm gelernt.

Frau Prof. Dr. J. Schaper danke ich für ihre fachliche als auch persönliche Hilfe, die ich sehr geschätzt habe. Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Dr. D. Scholz, dessen Unterstützung auf dem Gebiet der Histologie unverzichtbar war.

Herrn Dr. T. Kubin und Frau Dr. D. Westernacher danke ich für die vielen interessanten Gespräche und die Unterstützung bei scheinbar unlösbaren Problemen.

Den Mitarbeitern der Werkstatt unseres Hauses, hier vor allem Herrn Langsdorf und Herrn Bingel sage ich Dank für ihre Unterstützung bei der Konstruktion der Stimulationskammern. Sie haben mir auch über ihre dienstlichen Pflichten hinaus mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitarbeitern des Instituts, die durch ihre zahlreichen kleinen Hilfestellungen diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Vielen Dank auch an meine Freundin Svenia. Sie hat mir bei der Korrektur dieser Arbeit sehr geholfen. Durch sie scheint in meinem Leben jeden Tag die Sonne.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Maria und Josef Bramlage, die mir durch ihre Toleranz, ihre Empathie und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung dieses Studium und die Promotion ermöglicht haben. Ich habe sehr von Ihnen profitiert und werde diesen Profit an die nächste Generation weiterreichen.