Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie,
Abteilung für Pharmakologie
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Scholz

Vergleichende Untersuchung von Genexpressionsmustern in zweidimensional und dreidimensional kultivierten Herzmuskelzellen und im intakten Myokard der Ratte.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Matthias Ptak
aus
Hamburg

Hamburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 12.2.2002

Gedruckt mit Genehmigung der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. Wagener

Referent: Prof. Dr. Scholz

Tag der mündlichen Prüfung: 5./7.3.2002

Diese Arbeit ist meinem Patenkind

Phyllis Schierhorn

gewidmet

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

α-/β-MHC	α-/β-Myosin-Heavy-Chain
ADP	Adenosin-5‘-diphosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
BrdU	5-Bromo-2`Deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosin-3‘,5‘-monophosphat
CBFHH	Calcium- und Bicarbonat freies Hanks mit HEPES
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10^{10} Bq)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EHT	engineered heart tissue
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GDP	Guanosin-5‘-diphosphat
Giα-2	α-Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins (Subtyp 2)
Gly	Glycin
Gsα	α-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins
GTP	Guanosin-5‘-triphosphat
IL	Interleukin
l	Liter
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLB	Phospholamban
pmol	Pikomol
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
ppENK	Präproenkephalin
P/S	Penicillin/Streptomycin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
rpm	rate per minute = Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Einheit
SERCA	Ca^{2+}- ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Natriumcitrat-Natriumchlorid-Puffer
TGF	Tumor Growth Factor
tPA	Tissue Plasminogen Activator
tPAI	Tissue Plasminogen Activator Inhibitor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Thyrosin
U	Units
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 3

Inhaltsverzeichnis 5

1. Einleitung 7

2. Methoden 14

2.1. Zweidimensionale Zellkultur 14
2.1.1. Tierhaltung 14
2.1.2. Zellpräparation 15
2.1.3. Zellkultur 17
2.1.4. Frequenzanalyse 17
2.2. Herstellung des engineered heart tissue (EHT) 18
2.3. Gewebepräparation 20
2.4. RNA-Präparation 20
2.4.1. Vorbereitung der zweidimensionalen Zellkulturen 20
2.4.2. Vorbereitung der Gewebe 20
2.4.3. Vorbereitung der EHTs 20
2.4.4. RNA-Präparation 21
2.4.5. Kontrolle der RNA 21
2.5. Teilung des Kardiomyozytenrasens 22
2.5.1. Proteinbestimmung 23
2.5.2. Zellkernzählung 23
2.6. Zusammenfassen der RNA zu RNA-Pools 24
2.7. Northern Blot 26
2.7.1. Northern Blot Herstellung 26
2.8. cDNA Synthese 27
2.8.1. PCR 28
2.8.2. DNA-Agarosegel 28
2.8.3. Ligation der cDNA in das Plasmid 29
2.8.4. Transformation in $DH_{5\alpha}$-Escherichia Coli Bakterien 30
2.8.5. Large Scale 31
2.8.6. Restriktionsverdau 32
2.8.7. Sequenzierung 33
2.8.8. cDNA Isolierung 35
2.9. Hybridisierung 35
2.9.1. Endlabeling 36
2.9.2. Nick Translation 36
2.9.3. Hybridisierung 37
2.9.4. Waschen und Exponieren 37
2.9.5. Entfernung der DNA-Sonde 37
2.10. Substanzen, Lösungen und Materialien 38
2.11. Auswertung und Statistik 47

3. Ergebnisse 48
3.1. Biometrische Daten der Tiere 48
3.2. Frequenzanalyse 48
3.3. RNA-Präparation 50
3.3.1. RNA-Präparation aus dem Gewebe 50
3.3.2. RNA-Präparation der Zellkultur 50
3.4. Zellkernzählung 52
3.5. Proteinbestimmung 53
3.6. Expressionsanalysen 53
3.6.1. 18S-ribosomale RNA 55
3.6.2. Giα-2 57
3.6.3. Gsα 57
3.6.4. Gβ 57
3.6.5. SERCA 59
3.6.6. PLB 59
3.6.7. Quotient aus PLB / SERCA 61
3.6.8. α- und β-MHC Isoformen 63
3.6.9. Quotient aus β-MHC / α-MHC 65
3.6.10. ANP 67
3.6.11. ppENK 67
3.6.12. Korrelation der ANP- mit der ppENK-Expression 69
3.6.13. VEGF 70
3.6.14. Einfluss der Kardiomyozytenisolierung 72
4. Diskussion 73
4.1. Altersabhängige physiologische Genexpression im Rattenventrikel 74
4.2. Einfluss der Kardiomyozyten-Isolierung auf die Genexpression 78
4.3. Zeitverlauf der Genexpression in der zweidimensionalen Zellkultur 80
4.4. Mögliche funktionelle Bedeutung der Unterschiede zwischen Myokard und zweidimensionaler Kultur 85
4.5. Genexpression von Kardiomyozyten in rekonstituiertem Gewebe (EHT) .. 88
4.5.1. Vergleich der EHTs mit den zehn Tage alten zweidimensionalen Kulturen 88
4.5.2. Vergleich der EHTs mit den zwei Monaten alten Ventrikeln 90
5. Zusammenfassung 92
6. Literaturverzeichnis 93
7. Veröffentlichungen 101
8. Danksagung 102
9. Lebenslauf 103
10. Erklärung 104

1. Einleitung

Zahlreiche Modelle stehen für wissenschaftliche Untersuchungen in der Herzkreislaufforschung zur Verfügung. Die Wahl eines Modells wird in erster Linie durch die Fragestellung bestimmt, ob Einflussfaktoren des Gesamtkreislaufes berücksichtigt oder ausgeschaltet sein sollen, ob akute oder langfristige Effekte gemessen, ob Kontraktilität, Relaxation, Herzfrequenz oder Reizleitung untersucht werden oder komplexere Wirkungen auf Zellwachstum, Gewebeorganisation oder die Kreislaufregulation. In Frage kommen lebende Tiere, isolierte Organe oder aufgereinigte Zellen unmittelbar nach der Präparation oder nach Kultivierung. So bieten sich beispielsweise für Messungen akuter, direkter Effekte auf das Kontraktionsverhalten retrograd perfundierte Herzen (sog. „Langendorff-Präparation“), Papillarmuskeln oder ganze Vorhöfe an. In der Langendorff-Präparation lassen sich auch die Reizleitung und indirekte Wirkungen auf das Myokard über die Koronarperfusion untersuchen. Längerfristige Effekte, die die Herzkreislaufregulation berücksichtigen, können am lebenden Tier untersucht werden.

Für die Untersuchung von Effekten unter Ausschluss des Gesamtkreislaufes hat sich die Kultivierung von isolierten Kardiomyozyten als Standardmethode etabliert. Dies gilt insbesondere, wenn zwischen Kardiomyozyten und nichtkardiomyozytären Zellen des Herzens unterschieden werden soll. Zur Kultivierung hat es sich vielfach durchgesetzt, Zellen von neonatalen Ratten im Alter von 0-3 Tagen nach der Geburt zu verwenden (Harary et al. 1960), die gut verfügbar sind und in einem stabil kontrahierenden Verband wachsen. Sie eignen sich besonders zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen, Stoffwechselmechanismen und Genexpressionsanalysen und sind gut zugänglich für pharmakologische Manipulationen oder einen Gentransfer. Den günstigen Eigenschaften des Modells stehen jedoch auch Einschränkungen gegenüber. Die Kardiomyozyten wachsen unphysiologisch in zwei- statt in dreidimensionaler Anordnung, eine Kontraktion findet zwar koordiniert, aber nicht räumlich gerichtet statt und der Kontraktionswiderstand ist ohne extrazelluläre Matrix nicht mit den Bedingungen im intaktem Gewebe vergleichbar. Auch sind Messungen der Kontraktionskraft nicht ohne weiteres möglich. Seit Einführung der prinzipiellen Methoden in den 50er Jahren wurden zahlreiche

Techniken zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten entwickelt (Pinson et al. 1987). Es wurde dadurch deutlich, wie vielfältig die relevanten nichtphysiologischen Einflussgrößen auf die Kardiomyozyten bei der Kultivierung sind. Bei der Zellisolierung erwies es sich als vorteilhaft, die Zellen mit Enzymgemischen in mehrschrittigen Verdauschritten aus dem Gewebeverband zu lösen und in glukosehaltigem Medium zu sammeln (Pinson et al. 1987). Kritisch bei der Kultivierung ist die Zusammensetzung des Kulturmediums mit Aminosäuren, Fettsäuren, Glukose und diversen Wachstumsfaktoren (Lompre et al. 1984, Parker et al. 1990, Ito et al. 1991, Ito et al. 1993, Gadbut et al. 1994, Kiss et al. 1994). Aber selbst die Häufigkeit des Mediumwechsels scheint Einfluss auf die Qualität der Kultur zu haben (Padieu et al. 1978). Der Zusatz von tierischen Seren, die in ihrer Zusammensetzung nicht genau definiert werden können, stellt hierbei eine Variable mit erheblichem Einfluss auf die Zellen dar. Es werden Seren von unterschiedlichen Donoren, nämlich Rind, Kalb oder Pferd, in unterschiedlichen Konzentrationen von 0-20% mit oder ohne Zusatz von embryonalem Extrakt in nativem oder hitzeinaktiviertem Zustand verwendet. Insbesondere für die Konzentration an tierischen Seren wurde nachgewiesen, dass sie für Wachstum und Differenzierung der Zellen in der Kultur von erheblicher Bedeutung ist (Decker et al. 1995, Lubic et al. 1995). Ein weiterer Einflussfaktor, der in verschiedenen Untersuchungen sehr unterschiedlich gewählt wurde (z.B. Fitzgerald et al. 1994, Eble et al. 1998), ist die Zelldichte in der Kulturschale, die deutliche Auswirkungen auf Proteingehalt, Zellwachstum und DNA-Synthese hat (Speicher et al. 1981). Diese Heterogenitäten im experimentellen Vorgehen mit der Zellkultur erschweren die Interpretation und den Vergleich von Daten und können zum Teil als Erklärung für widersprüchliche Ergebnisse dienen. Wenn also selbst innerhalb des Modells der zweidimensionalen Kultur schon eine deutliche Vielfalt hinsichtlich der Methodik besteht, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, so stellt sich um so mehr die Frage nach der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Kultur auf das intakte Herz in vivo.

Eine neue Form der Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten, die dreidimensionale Kultivierung als „Cardiac myocyte-populated matrix“ (Eschenhagen et al. 1997) oder als „Engineered heart tissue“ (EHT) (Fink et al. 2000, Zimmermann et al. 2000), wurde kürzlich eingeführt, die einen Teil der Schwierigkeiten, die auf dem unphysiologischen zweidimensionalen Wachstum beruhen, vermeidet. Die Zellen werden in einer extrazellulären Kollagenmatrix kultiviert, schlagen koordiniert spontan und sind damit regelmäßigen gerichteten Kräften ausgesetzt. Neben den Vorteilen der

zweidimensionalen Kultivierung wie Zellaufreinigung, Reproduzierbarkeit und leichter Zugänglichkeit für pharmakologische und genetische Manipulationen, kann an diesem Zellverband beispielsweise die Kontraktionskraft unter standardisierten Bedingungen gemessen werden. Damit könnte im Vergleich zur 2 dimensionalen Kultur eine Annäherung an die physiologischen Bedingungen im intaktem Herzen erreicht werden.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, diese zwei genannten verschiedenen Kultivierungsarten von isolierten neonatalen Kardiomyozyten als zwei- oder dreidimensionale Kultur miteinander zu vergleichen und dem intakten Gewebe gegenüberzustellen. Dafür wurde auf mRNA Ebene die Expression eines Spektrums von Proteinen untersucht, die für verschiedene Funktionen der Kardiomyozyten von Bedeutung sind. Als Beispiel für Proteine der transmembranären Signaltransduktion waren dies die G-Protein Untereinheiten Giα-2, Gsα und Gβ, an Proteinen, die an der Calciumhomöostase des sarkoplasmatischen Retikulums beteiligt sind, wurden Phospholamban (PLB) und die Calcium ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) untersucht, von den kontraktilen Proteinen die zwei Isoformen der Myosin Heavy Chain (α-MHC und β-MHC), und schließlich wurde die mRNA von Proteinen quantifiziert, denen funktionell gemeinsam ist, dass sie sezerniert werden, nämlich das atriale natriuretische Peptid (ANP), das Präproenkephalin (ppENK) und der Vascular endothelial growth factor (VEGF). Von den letzteren gilt darüber hinaus zumindest das ANP als Marker für Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Um mögliche Konsequenzen, die Änderungen der Expression dieser Proteine für die Funktion und die Integrität der Kardiomyozyten mit sich bringen könnten, zu verstehen, sollen diese untersuchten Proteine zunächst detailliert dargestellt werden.

Die heterotrimeren G Proteine bestehen aus drei Untereinheiten , die als α-, β- und γ-Untereinheit bezeichnet werden. Es sind mindestens 20 α-, 5 β- und 12 γ-Untereinheit kloniert und zum Teil charakterisiert (Gilman 1987, Offermanns 1999). An der Interaktion von heterotrimeren G-Proteinen mit dem ligandengebundenen Rezeptor sind alle drei Untereinheiten beteiligt. Die Funktion der Proteine wird dabei wesentlich durch ihre α-Untereinheiten bestimmt (Neer et al. 1988), doch vermitteln auch die β- und γ-Untereinheiten physiologische Effekte. Nach Bindung eines Agonisten am Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung des G-Proteins. Das im inaktiven Zustand an die α-

Untereinheit gebundene Guanosindiphosphat (GDP) wird durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt, und es kommt zur Dissoziation der α-Untereinheit vom βγ-Komplex. Die α-Untereinheit interagiert in ihrer GTP-Form mit Effektoren (z.B. Adenylylcyclase, Phopholipase C), aber auch der freie βγ-Komplex kann Effektormoleküle beeinflussen (z.B. Phospolipase Cβ, AC, I_{KACh}). Die Aktivierung der G Proteine wird durch die Hydrolyse von GTP an der α-Untereinheit terminiert. Dies führt zur Inaktivierung und zur erneuten Bildung des Heterotrimers aus α-, β- und γ-Untereinheit. Die heterotrimeren G Proteine werden nach ihrer α-Untereinheit in vier Gruppen unterteilt (Gs, Gi/Go, Gq/11 und G12/13). Beispielhaft für die transmembranäre Signaltransduktion über G-Proteine im Sarkolemm wurde die Expression von Gβ untersucht, sowie die der α-Untereinheiten des stimulatorischen und eines inhibitorischen G Proteins, Gsα und Giα2, die auf die Adenylylcyclase antagonistisch wirken.

Von den Proteinen, die an der intrazellulären Calciumhomöostase beteiligt sind, wurden die ATP-abhängige Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) und das regulatorische Protein Phospholamban (PLB) untersucht. Die Calciumpumpe ist verantwortlich für die vorwiegend diastolische aktive, d.h. energieverbrauchende, Wiederaufnahme des intrazellulären Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum. Aufgebaut ist SERCA aus zehn transmembranären Untereinheiten mit zwei großen zytoplasmatischen Loops, die die für die ATP-Bindung und Phosphorylierung notwendigen Elemente bilden (Clarke et al. 1990). Unterschieden werden drei Isoformen, kodiert durch unterschiedliche Gene, wobei die SERCA1 überwiegend im schnellen Skelettmuskel zu finden ist. SERCA2 ist das dominierende Isoenzym im Herzen, in glatten Muskelzellen und im langsamen Skelettmuskel. Größere funktionelle Unterschiede bestehen zwischen den einzelnen Isoformen nicht. Die unterschiedlichen Calciumaffinitäten von SERCA1+2 können durch die An- bzw. Abwesenheit des regulatorischen Proteins Phospholamban (PLB) erklärt werden, das im schnellen Skelettmuskel nicht vorhanden ist (Shigekawa et al. 1976). Die dritte Unterform findet sich in verschiedenen Geweben, wie auch im Herzen und Skelettmuskel. Für SERCA1+2 finden sich zusätzlich zwei Splice-Varianten, die mit a und b gekennzeichnet werden und die wiederum eine unterschiedliche Gewebeverteilung zeigen (Zerain-Herzberg et al. 1990). Die in Kardiomyozyten überwiegend exprimierte Form der SERCA2a wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Vereinfachend wird im weiteren Verlauf nur von SERCA gesprochen.

PLB ist ein Pentamer aus gleichen Untereinheiten, die im Herzen und im langsamen Skelettmuskel identisch sind, während die Struktur von PLB im glatten Muskel minimal abweicht (Fuji et al. 1987). Im schnellen Skelettmuskel findet sich dagegen kein Phospholamban (Watras et al. 1988). Im Herzen reguliert Phospholamban die Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum durch Modifikation der Ca^{2+}-Affinität der SERCA und der Geschwindigkeit des Ca^{2+}-Transportes (Hicks et al. 1979). Phospholamban hemmt im dephosporylierten Zustand die SERCA. Wird PLB durch die cAMP abhängige Protein Kinase A oder die Phospholipid abhängige Protein Kinase C phosphoryliert, erhöht sich der sarkolemmale Ca^{2+}-Transport durch Dissoziation des Phospholambans von der SERCA. Das führt dazu, dass die Relaxation des Myokards beschleunigt und die Füllung des Herzens verbessert wird (Fuji et al. 1989).

Die kontraktilen Proteine werden durch die zytosolische Calciumkonzentration in ihrer Funktion reguliert. Ihre Bedeutung für die Funktion der Rattenkardiomyozyten wird allein dadurch deutlich, dass die Myofibrillen etwa 50% des Zellvolumens einnehmen. Man unterteilt die Proteine der Myofibrillen in sog. kontraktile Proteine (Aktin und Myosin), in regulatorische Proteine (Tropomyosin und Troponin I, C und T) und in Strukturproteine (C Protein, α-Aktinin, β-Aktinin, und andere). Sie bilden ein dickes (Myosin) und ein dünnes Filament. Myosin, ein hexamerer Proteinkomplex von 480.000 M, das etwa 55-60% des myofibrillären Proteins stellt, kann durch Trypsin gespalten werden. Es entstehen zwei schwere Ketten (myosin heavy chain, MHC) und vier leichte Ketten (myosin light chain, MLC). Von der MHC sind zwei Isoformen bekannt, α- und β-MHC, die im Myosin grundsätzlich in drei verschiedenen Kombinationen als Dimer vorkommen können, als V1 (αα), V2 (αβ) oder V3 (ββ). MHC weist einen „Schwanz“ auf, der das dicke Filament bildet, und einen globulären „Kopf“. Der „Schwanz“ ist aus zwei umeinander gewundenen α-Helices (coiled coil) organisiert. Der "Kopf" des Moleküls ist gepaart, wobei jede Hälfte des Kopfes aus den Enden einer schweren Kette gebildet wird, die am Übergang von „Schwanz“ und „Kopf“ an den flexiblen Stellen des Moleküls von jeweils zwei leichten Ketten (MLC) flankiert wird. Myosin besitzt eine ATPase-Aktivität, die in Gegenwart von Aktin gesteigert ist. Die zwei Isoformen von MHC unterscheiden sich bezüglich dieser ATPase-Aktivität und der Kontraktionsgeschwindigkeit. Die α-MHC Isoform zeigt eine höhere Myosin-ATPase Aktivität und eine schnellere Verkürzungsgeschwindigkeit als die β-Isoform. Bei Nagern ist α-MHC die erwachsene und β-MHC die fetale Isoform. Eine

Hochregulation von β-MHC gilt als typischer Marker des sogenannten „fetalen Genexpressionsprogramms“ bei kardialer Hypertrophie.

Ein in vielen Untersuchungen ebenfalls verwendeter Marker für myokardiale Hypertrophie und/oder Insuffizienz stellt die Expression von ANP dar. Dabei handelt es sich um ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid-Hormon. Der bevorzugte Bildungsort von ANP im erwachsenen Herzen sind die Vorhöfe, in denen unter physiologischen Bedingungen eine 50-300fach höhere Konzentration als in den Ventrikeln zu finden ist (Lachance et al. 1986). Für das fetale und das hypertrophierte erwachsene Herz ist dagegen bekannt, dass in den Ventrikeln die Expression des ANP der in den Vorhöfen gleicht (Kikuchi et al. 1987, Saito et al. 1989). ANP wird in intrazellulären Granula gespeichert und nach extrazellulär sezerniert. Es findet in der Zirkulation seine Zielorgane in der Niere und in glatten Muskelzellen und wirkt durch seinen natriuretischen Effekt an der Niere diuretisch und durch den relaxierenden Effekt an den Gefäßmuskelzellen hypotensiv (de Bold et al. 1981, Currie et al. 1984).

Endogene Opioide sind für die Funktion des Herzens unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen von Bedeutung. Einer der Vorläufer endogener Opioide ist das Präproenkephalin (ppENK). Dabei handelt es sich um ein 263 Aminosäuren zählendes Protein, welches in die Peptide Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin und zusätzliche Signalpeptide wie z. B. Peptid F, Peptid E, 14beta-(bromoacetamido)morphine (BAM) und Metorphinamid gespalten wird. Die aus fünf Aminosäuren aufgebauten Peptidhormone, Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin mit einem Stamm aus Tyr-Gly-Gly-Phe, gefolgt von den namensgebenden Aminosäuren Leucin bzw. Methionin, sind die hinsichtlich ihrer Wirkung auf Herz und Kreislauf am besten untersuchten. Für ppENK wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression im Herzen der ausgewachsenen Ratte höher ist als in jedem anderen Gewebe (Howells et al. 1986) und diese überwiegend im linken, druckbelastetem Ventrikel lokalisiert ist (Weil et al. 1998). Interessanterweise entspricht der Gehalt an Peptiden nicht der ppENK-mRNA Expression. Beispielsweise ist der Gehalt an Leu- und Met-Enkephalin im Gehirn etwa 30fach höher als im Herzen. Zahlreiche Theorien und Hypothesen wurden für dieses Phänomen aufgestellt, die aber noch nicht zur endgültigen Klärung geführt haben (Springhorn et al. 1989). Die Peptide selbst beeinflussen den Calcium-Fluß, die inotrope Antwort und die Adenylylcyclase Aktivität (Laurent et al. 1986). Für verschiedene Gewebe wurde auch gezeigt, dass endogene

Opioide eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielen und im Rattengehirn den Übergang vom hyperplastischen Wachstum zum hypertrophen Wachstum induzieren können, indem sie die Zellproliferation inhibieren und die Differenzierung der Zellen steigern (Zagon et al. 1985, Zagon et al. 1986).

Eine wichtige Familie regulatorischer Proteine der Angioneogenese stellt die des Vascular endothelial growth factors (VEGF A-D) dar. Kodiert werden diese Proteine durch vier Gene, die auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Paavonen et al. 1996, Ferrara et al. 1997, Yamada et al. 1997). Vom VEGF-A Gen werden insgesamt vier verschiedene molekulare Formen durch alternatives Splicing mit Längen von 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren kodiert. Die prädominante molekulare Form in den meisten menschlichen Geweben ist $VEGF_{165}$, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die Isoformen mit 121 bzw. 189 Aminosäuren Länge finden sich ebenfalls in verschiedensten Geweben (Tisher et al. 1991, Houck et al. 1991), während das $VEGF_{206}$-Protein nur in wenigen menschlichen Geweben nachzuweisen ist (Houck et al. 1991). Bei $VEGF_{165}$, das im folgenden vereinfachend nur VEGF genannt wird, handelt es sich um ein basisches Heparin-bindendes homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 Kilodalton (Ferrara et al. 1992). VEGF funktioniert in vivo und in vitro als potenter mitogener Faktor für arterielle, venöse und lymphatische endotheliale Zellen (Connolly et al. 1989). Es erhöht die vaskuläre Permeabilität für Proteine und induziert die Fenestration des Endothels (Roberts et al. 1995). Darüber hinaus induziert es die Expression der Urokinase, der interstitiellen Kollagenase und des tPA sowie seines Inhibitors tPAI, stimuliert den endothelialen Hexose-Transport und führt zu einer Vasodilatation (Pepper et al. 1991, Unemori et al. 1992, Pekala et al. 1990, Ku et al. 1993). Dadurch fördert VEGF die Entstehung eines extravasalen Fibrinsubstrates, das für die Angioneogenese von Bedeutung ist. Auch immunmodulatorische Effekte werden VEGF zugesprochen (Übersicht bei Ferrara 1997). Vermittelt werden diese Wirkungen über verschiedene Rezeptoren, die auf unterschiedlichen Gewebe- und Zellarten gefunden wurden (Vaisman et al. 1990). Unklarheit besteht jedoch weithin über die intrazellulären Signalkaskaden, die die Effekte vermitteln.

Anhand der mRNA Expression dieses Spektrums an Proteinen sollten in der vorgelegten Arbeit isolierte Kardiomyozyten unter zwei- und dreidimensionalen Kulturbedingungen charakterisiert werden. Umfassende systematische Untersuchungen zum Einfluss der

Isolierung, der Kulturdauer und den räumlichen Wachstumsbedingungen von Kardiomyozyten in Kultur hinsichtlich der Genexpression fehlen in der Literatur. So ist weitgehend unbekannt, welchen Einfluss die Isolierung der Zellen selbst hat, wie sich die Genexpression über einen bestimmten Zeitraum verhält und ob die Expression in der Zellkultur parallel zu physiologischen Änderungen verläuft. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich in der Regel nur auf einen definierten Zeitpunkt (Fitzgerald et al. 1994, Vincan et al. 1995, Cui et al. 1996). Ein Zeitverlauf der Expression einzelner Gene wurde dagegen nur isoliert unter Kulturbedingungen oder aber im Gewebe beschrieben (Pegg et al. 1987, Allen et al. 1988, Springhorn et al. 1989, Lompre et al. 1991, Carrier et al. 1992, Ganim et al. 1992, Boluyt et al. 1993, Caffrey et al. 1994, Younes et al. 1995, Moorman et al. 1995, Vetter et al. 1995, Imanaka-Yoshida et al. 1996). Eine vergleichende Untersuchung, die die Zellkultur der physiologischen Entwicklung direkt gegenüberstellt, steht bisher jedoch aus.

Durch den Vergleich der Genexpression von neonatalen Rattenkardiomyozyten unter zwei- und dreidimensionalen Kulturbedingungen mit intaktem Myokard von Ratten unterschiedlichen Alters sollten deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst die Isolierung von Kardiomyozyten per se die Genexpression?
2. Ist die Genexpression unter den Bedingungen der Kultivierung stabil?
3. Stellt sich in kultivierten Kardiomyozyten wieder ein Genexpressionsmuster ein, das identisch ist mit dem neonataler Herzen oder mit Herzen zu einem späteren Zeitpunkt in der physiologischen Entwicklung der Ratten?
4. Lässt sich durch die dreidimensionale Kultivierung ein physiologisches Genexpressionsmuster erreichen?

2. Methoden

2.1. Zweidimensionale Zellkultur

2.1.1. Tierhaltung

Bei der Durchführung der Experimente wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet, die bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin) und Leitungswasser ad libitum gehalten

wurden. Es wurden 919 neonatale Tiere, die innerhalb von drei Tagen postnatal für die Myozytenpräparation verwendet wurden, und 14 vier bis sieben Tage alte, sowie vier zwei Monate alte, Tiere verwendet (siehe 3.1).

2.1.2. Zellpräparation

Zur Isolierung der Kardiomyozyten wurden 14 Präparationen mit insgesamt 919 Herzen durchgeführt, jede einzelne Präparation mit 19-141 Herzen. Die im folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf eine Präparation mit 40 Herzen. Bei abweichender Anzahl der verfügbaren Herzen wurden sie entsprechend angepasst. Soweit nicht ausdrücklich anders betont, wurde bei dieser Präparation mit sterilen, einzeln verpackten Pipetten auf Eis gearbeitet.

Nach der Dekapitation der Tiere, die bei allen Präparationen zur Vermeidung zirkadianer Schwankungen jeweils um 9.00 Uhr begonnen wurde, (Dumont et al. 1991, Witte et al. 1995) wurden die Herzen mit Hilfe einer sterilen Schere und Pinzette unter einer Sterilbank entnommen und in eine Petrischale überführt, die mit PBS gefüllt war. Nach Säuberung der Herzen von nicht kardialem Restgewebe und Abtrennen der Vorhöfe wurden zu diesem Zeitpunkt ca. 10% der Ventrikel einzeln in einem Eppendorfgefäß auf einer Waage gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C bis zur RNA-Präparation gelagert. Die restlichen Ventrikel wurden in Höhe des Septums zweigeteilt und dreimal in einer neuen Petrischale, die mit jeweils 10 ml sterilem CBFHH gefüllt war, gewaschen. Nach dem Abpipettieren der gesamten Flüssigkeit wurden 3 ml CBFHH hinzugegeben und die Ventrikel mit einer sterilen gebogenen Schere in der Petrischale zerschnitten, so dass eine Gewebestückgröße von weniger als 2 mm^3 entstand. Dieser Vorgang dauerte je nach Anzahl der Ventrikel zwischen 15 und 30 Minuten. Die Stücke wurden danach mit einer Wide-bore Pipette in ein 50 ml Falcon Gefäß auf Eis überführt, die Schale noch einmal mit 10 ml CBFHH gespült, und dann ebenfalls in das Falcon Gefäß gegeben. Aus den vorbereiteten Stammlösungen wurden zu diesem Zeitpunkt die Trypsin- und DNase Lösung für den Verdau des Gewebes angesetzt. Die DNA-Lösung verhinderte, dass durch Zellzerfall freiwerdende DNA zur Konglomeratbildung führte und gewährleistete dadurch ein besseres Abziehen der Verdaulösungen. Jeweils 2 ml FCS wurden in drei bis vier 50 ml Falcon Tubes vorgelegt. Nachdem sich die Gewebeteile abgesetzt hatten, wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 10 ml Trypsinlösung, rotierte das Falcon Tube 20 Minuten auf dem Sarstedt-Shaker. Nach dem Absinken der Gewebeteile wurde der Überstand

abgenommen und verworfen, da in diesem Stadium des Verdaues noch zu viele Nicht-Kardiomyozten in der Lösung vorhanden waren. Nach Zugabe von 10 ml Trypsinlösung und Inkubation für 15 Minuten auf dem Shaker wurde der Überstand in ein Sammelgefäß auf Eis überführt. Von der DNaselösung wurden daraufhin 9 ml hinzugegeben und das Gewebe mit einer 10 ml Wide-Bore Pipette 25 mal kräftig auf- und niederpipetiert, um die Entstehung von DNA-Verbänden im Ansatz zu verhindern. Nachdem sich erneut ein Überstand gebildet hatte, wurde dieser ebenfalls in das Sammelgefäß auf Eis überführt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsinlösung zum Gewebe wurde das Gefäß fünf Minuten auf dem Shaker platziert, damit sich erneut ein Überstand bilden konnte. In den folgenden fünf bis sieben Stunden, abhängig von der Anzahl der zu präparierenden Ventrikel, wurden der Suspension intermittierend 10 ml Trypsin zugesetzt, nach fünf Minuten auf dem Shaker der Überstand gesammelt und 9 ml DNase Lösung hinzugegeben. Nach 25maligem Auf- und Abpipettieren wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß gegeben und wieder Trypsin zugegeben. Bei abnehmender Anzahl der Gewebeteile wurden die Trypsin- und DNase Volumina schrittweise auf 7,5 ml bzw. 6,5 ml reduziert. Nachdem kein Gewebe mehr zu erkennen war, wurden die Sammelgefäße in der Beckmann Kühlzentrifuge zehn Minuten bei 200 rpm (50 g) bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 2 ml Kulturmedium gelöst und zusammenpipettiert. Die leeren Sammelgefäße wurden mit je 2 ml Kulturmedium gewaschen, die ebenfalls zur gepoolten Zellsuspension pipettiert wurden. Das Volumen der Zellsuspension wurde mit dem Kulturmedium auf 20 ml ergänzt, 200 µl DNase-Stamm hinzu gegeben und danach durch 25maliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C und 200 rpm (50 g) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet wurde in 32 ml Kulturmedium gelöst. Zur Vorbereitung des "Preplatings" zur Reduktion der Fibroblasten wurden vier 100 mm Falcon Petrischalen unter der Sterilbank bereitgestellt und ein autoklaviertes Zellsieb mit 3 ml Kulturmedium über einer Petrischale gespült. Die 32 ml Zellsuspension wurden zu je 8 ml durch das Zellsieb auf die vier Petrischalen verteilt, und anschließend das Sieb mit 3 ml Medium in eine Schale ausgespült. Die vier Schalen wurden eine Stunde in einem Brutschrank bei 37 °C und einem konstanten pCO_2 von 5 mmHg inkubiert. Nach dem Preplating wurden die Zellen von der Petrischale geerntet, indem das Medium aspiriert und der Zellrasen von der Platte kräftig abgespült wurde. Das Medium wurde im folgenden in einem neuen Falcon Tube gesammelt. Nachdem mit allen Schalen so verfahren war, wurden je 2 ml Medium auf jede Schale gegeben und jede abgedeckte Schale acht mal auf den Tisch der Sterilbank geschlagen. Auf diese Weise

lösten sich noch ungelöste Kardiomyozyten, während Fibroblasten auf dem Schalenboden haften blieben. Es wurden jetzt die 2 ml aus jeder Schale aspiriert und dem Falcon Tube mit den Kardiomyozyten zugegeben. Die vier Petrischalen wurden ein letztes Mal mit insgesamt 4 ml Medium gewaschen. Nachdem die Zellsuspension durch vorsichtiges auf- und niederpipettieren gleichmäßig durchmischt worden war, wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Zeiss Mikroskop wurden 4x16 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert, multipliziert mit 10^4, ergab die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Dieser Wert, multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Suspension ergab die Gesamtzellzahl. Die Zellausbeute lag bei $2{,}0 \times 10^6 \pm 0{,}2$ Zellen pro Ventrikel. Auf jede 100 mm Falcon Kulturschale wurden $8{,}5 \times 10^6$ Zellen ausplattiert, auf einer 60 mm Schale 3×10^6. Das Volumen der Kulturschalen wurde mit Kulturmedium auf 10 ml ergänzt und alle Schalen bis zur RNA-Präparation im Kulturschrank (37 °C, 5 mmHg pCO_2, 95 mmHg O_2) inkubiert. Die Kulturschalen mit jeweils $8{,}5 \times 10^6$ Kardiomyozyten wurden in drei Gruppen aufgeteilt, wobei aus einem Drittel der Schalen im Anschluss an die Zellpräparation RNA präpariert wurde, während das zweite Drittel drei Tage und das letzte Drittel zehn Tage in Kultur gehalten wurde.

2.1.3. Zellkultur

Je nach Anzahl der präparierten Ventrikel ergaben sich pro Präparation für jede Bedingung zwischen zwei und sieben Kulturschalen. Alle Schalen wurden täglich für kurze Zeit aus dem Brutschrank genommen und unter dem Zeiss Mikroskop gleichmäßiges Wachstums, regelmäßige Kontraktionen der Kardiomyozyten und Hinweisen auf Infektionen mit Mikroorganismen kontrolliert. Das Kulturmedium der Schalen wurde alle zwei Tage gewechselt, so dass sich für die drei Tage wachsenden Zellen ein, für die zehn Tage wachsenden vier Medienwechsel ergaben. Am Tage des fünften Mediumwechsels wurden die Zellen geerntet und die RNA präpariert. Beim Mediumwechsel selbst wurden die Schalen gleicher Bedingung aus dem Brutschrank genommen, und unter der Sterilbank wurde das Kulturmedium steril, vorsichtig abpipettiert. Daraufhin wurden die Schalen mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem PBS gespült und 10 ml neues Kulturmedium (37 °C) wurden auf die Kulturschalen pipettiert.

2.1.4. Frequenzanalyse

An acht Schalen einer Präparation wurde in den ersten sechs Tagen täglich, danach alle zwei Tage, am sechsten, achten und zehnten Tag, eine Aufzeichnung der Frequenz vorgenommen. Dazu wurden die Kulturschalen einzeln aus dem Brutschrank genommen

und auf eine Heizplatte, die auf 37 °C vorgeheizt war, gelegt. Unter dem Leitz Mikroskop wurde die Schlagfrequenz der Kulturen mit Hilfe des Videoanalysers untersucht. Das mikroskopische Bild wurde auf einen Monitor übertragen, auf dem das Fadenkreuz des Videoanalysers Helligkeitsänderungen registrierte und auf einen Schreiber übertrug. Das Fadenkreuz wurde auf eine besonders kontrastierte Stelle des mikroskopischen Bildes eingestellt, z. B. auf den Plasma/Kern Übergang, um sicher auswertbare Aufzeichnungen zu erhalten. Am sechsten Tag der Untersuchungen wurde bei einer Platte aufgrund einer Infektion auf die Auswertung verzichtet, so dass ab dem sechsten Tag anstatt acht noch sieben Platten verblieben.

2.2. Herstellung des engineered heart tissue (EHT)

Direkt nach der Zellzählung wurde die Zellkonzentration auf eine Standardkonzentration von $5{,}4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium eingestellt. Dieses erfolgte entweder durch erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 220 rpm (12 g) und anschließender Volumenreduktion oder durch Zugabe von Medium zur Verdünnung. Pro EHT wurden $2{,}5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Alle Pipettierschritte wurden mit vorgekühlten Pipetten und auf Eis mit vorgekühlten Substanzen und Lösungen durchgeführt. In gekühlten sterilen Reaktionsgefäßen (10 ml Greiner) wurde auf Eis 850 µg Kollagen (ubi) vorgelegt. Daraufhin wurde das gleiche Volumen 2 fach konzentriertes, Serum supplementiertes Kulturmedium dazu pipettiert und gut vermischt. Der bis dahin stark saure pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH Lösung auf pH 7,4 angehoben. Anschließend wurden 10 Volumenprozent Matrigel (EHM, Tebü) zugegeben. Die volumenangepaßte Zellsuspension wurde zu der Kollagenmischung pipettiert und durch mehrmaliges Triturieren gut vermischt.

Pipettierplan für zwei EHTs:

Kollagen (3,6 mg/ml)	470 µl
Kulturmedium	470 µl
NaOH 0,1 N	64 µl
EHM	200 µl
Zellsuspension (5,4x10^6 Zellen/ml)	930 µl

Am Tag zuvor wurden 10 cm Kulturschalen mit Silicon ausgegossen. In das Silicon jeweils für insgesamt sechs EHTs sechs Wannen mit den Maßen 1,7x1,3 cm eingeschnitten. Durch einen Metallbügel wurden zwei mit Klettband beklebte Silicon-Schläuche auf definiertem Abstand von 1,2 cm gehalten. Am Tage der Zellpräparation und EHT Herstellung wurden diese Schalen komplett autoklaviert. Nach Vermischung von Kollagen und Zellen wurden 1067 µl davon zügig zwischen die Klettband bestückten Silicon-Schläuche pipettiert. Danach wurden die Kulturschalen umgehend in einen Brutschrank bei 37 °C, 95% O_2, 5% CO_2, gestellt, um eine Auspolymerisierung des Kollagen-Zell-Gemisches zu erleichtern. Nach einer Stunde wurden dann 20 ml Kulturmedium zu den EHTs pipettiert.

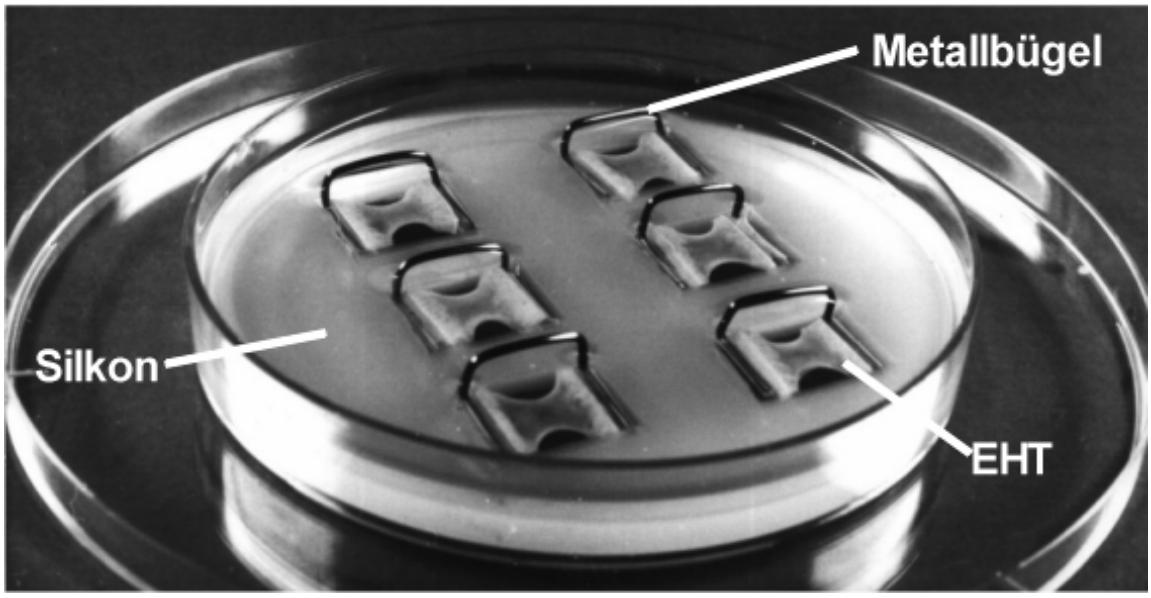


Abbildung 1: Silicon ausgegossene Kulturschale mit sechs EHTs durch Metallbügel aufgespannt.

2.3. Gewebepräparation

Zur Vorbereitung auf die RNA-Präparation wurden vier erwachsene Wistar-Ratten durch Genickbruch getötet, die Herzen mit Schere und Pinzette herauspräpariert, die Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel mit PBS gewaschen.
Von 14 weiteren Tieren im Alter zwischen vier bis sieben Tagen wurden nach der Dekapitation die Ventrikel präpariert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden alle auf der Mettler-Waage gewogen und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

2.4. RNA-Präparation

2.4.1. Vorbereitung der zweidimensionalen Zellkulturen

Bei den Zellkulturen wurde sofort nach der Präparation, nach drei oder nach zehn Kulturtagen die RNA präpariert. Die Zellen, bei denen sofort nach ihrer Präparation die RNA gewonnen wurde, wurden in einem Falcon Tube bei 200 rpm (50 g) und 4 °C in der Beckmann Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dem gewaschenen Zellpellet wurden 200 µl RNAzol® (4 °C) pro 10^6 Zellen zugegeben, um die Zellen darin zu lysieren. Bei den Kulturschalen wurde das Kulturmedium unter der Sterilbank abpipettiert, die Schalen zweimal mit 2 ml PBS pro Schale gespült, und ebenfalls 200 µl RNAzol®/10^6 Zellen, entsprechend 1,7 ml RNAzol®, auf die Kulturschale pipettiert. Die Kulturschalen wurden daraufhin abgedeckt, für 15 Minuten auf dem Sarstedt-Shaker platziert, und nach Ablösen des Kardiomyozytenrasens mit einem sterilen Zellschaber wurden die Zellen in ein auf Eis vorgekühltes Sarstedt-Röhrchen pipettiert.

2.4.2. Vorbereitung der Gewebe

Die bei –80 °C gelagerten erwachsenen, null bis drei Tage alten und vier bis sieben Tage alten Ventrikelgewebe wurden einzeln auf flüssigem Stickstoff zermörsert und in vorbereitete Sarstedt-Röhrchen überführt, in denen auf Eis 2 ml RNAzol®/100 mg Gewebe vorgelegt waren. Das Gewebe wurde auf Eis mit einem Polytron zweimal 20 Sekunden mit einer Minute Pause homogenisiert.

2.4.3. Vorbereitung der EHTs

Die bei –80 °C eingefrorenen EHTs wurden auf Eis aufgetaut und mit je 0,5 ml eiskaltem RNAzol® inkubiert. Dieses entspricht 200 µl RNAzol® auf 1x10^6 Zellen. Parallel wurden die

EHTs mit einem Polytron auf Stufe fünf für drei mal 15 Sekunden aufgeschlossen. Die Proben wurden dabei ununterbrochen auf Eis gehalten und zwischen den Homogenisierungsschritten wurde jeweils eine Minute gewartet um zu starke Erwärmung vermeiden.

2.4.4. RNA-Präparation

Alle weiteren Schritte sind sowohl für die RNA-Präparation aus isolierten Kardiomyozyten als auch für die Präparation aus Gewebe identisch und werden hier zusammen aufgeführt.

Dem Gewebe bzw. den isolierten Kardiomyozyten wurden 10% des RNAzol® Volumens, abhängig von der Zellzahl, an Chloroform zugesetzt und das Röhrchen 15 Sekunden gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation auf Eis wurde die Probe 15 Minuten bei 4 °C in der Christ-Zentrifuge auf Stufe acht zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Sarstedt-Röhrchen überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol, Durchmischen und 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen 40 Minuten lang bei 4 °C in der Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 20minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abdekantiert, und das Sarstedt-Röhrchen wurde mit autoklavierten Wattestäbchen und bei Raumtemperatur ca. 15 Minuten getrocknet. Das so erhaltene trockene RNA-Pellet wurde in Aqua ad injectabilia aufgenommen, so dass sich eine Konzentration von 1-2 µg/µl ergab. In dem Sarstedt-Röhrchen wurde das RNA-Pellet bei 56 °C im Wasserbad für zehn Minuten gelöst, kurz in der Christ-Zentrifuge anzentrifugiert, und die RNA-Lösung wurde vollständig in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde nach einem Nullabgleich mit TE-Puffer die RNA 1:80 mit TE-Puffer in der Küvette verdünnt und die optische Dichte (OD) der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm, und die OD von Protein Verunreinigungen bei 280 nm in Dreifachbestimmung gemessen. Aus dem errechneten Mittelwert der gemessenen OD bei 260 nm wurde die Konzentration der RNA-Probe berechnet Dabei entspricht eine OD von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Als Reinheitskontrolle wurde die OD 260 nm / OD 280 nm Ratio errechnet. Eine Ratio von >1,75 wurde als ausreichend rein angesehen.

2.4.5. Kontrolle der RNA

Zur Kontrolle der Qualität und der Konzentration der präparierten RNA wurde diese auf einem kleinen Agarosegel (Maniatis T. et al. 1982) elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür

wurden 300 mg Agarose mit 29 ml 1xMOPS in einer handelsüblichen Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach Abkühlen auf 50 °C wurden 1,62 ml säurefreies Formaldehyd (30%) und 1 µl Ethidiumbromid zugesetzt und durch Schwenken gut vermischt und in einen gereinigten, mit handelsüblichem Tesafilm abgedichteten Gelträger gegossen. 5 µg RNA wurden auf Eis in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert, zwei Volumen Denaturierungspuffer wurden dazugegeben und das Volumen mit Aqua ad injectabilia auf 15 µl aufgefüllt. Nach zwei minütiger Denaturierung bei 95 °C in einem Heizblock wurde 1 µl Ladepuffer dazupipettiert. Die Lösung wurde anzentrifugiert, gemischt und erneut anzentrifugiert. Das polymerisierte Gel wurde in 1xMOPS als Laufpuffer 10-20 Minuten bei 60 Volt vorinkubiert. Die RNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Die RNA wurde bei 40 Volt (10 Minuten) und anschließend 60 Volt (60 Minuten) aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel unter UV-Beleuchtung auf Polaroid Film fotografiert.

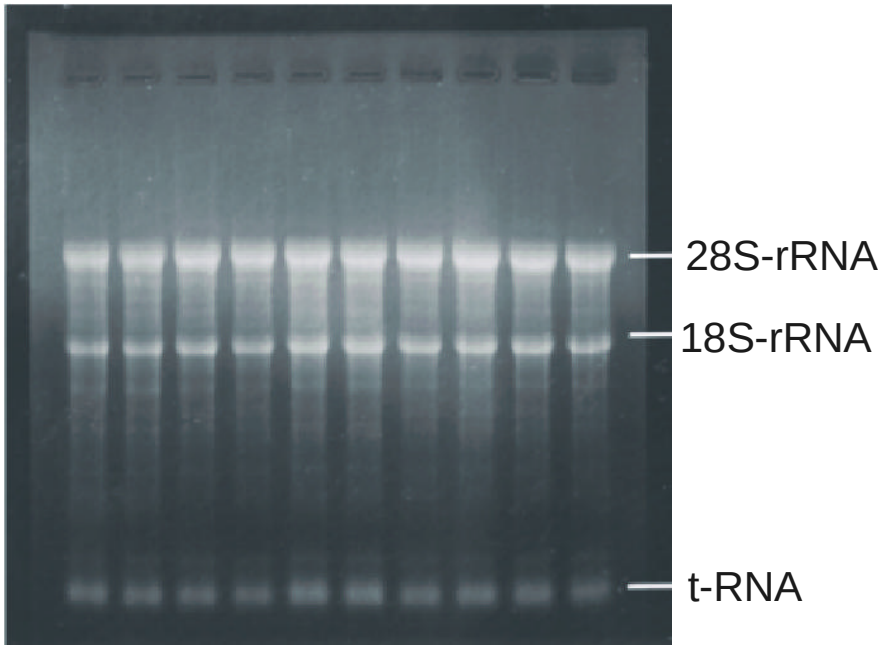


Abbildung 2: Ethidiumbromid gefärbtes Agarose Gel mit zehn Spuren verschiedener Gesamt-RNA (5 µg / Spur), das nach der Gel Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert wurde. Die Integrität der RNA ist intakt, zu erkennen an der abgrenzbaren 18S, 28S und t-RNA.

2.5. Teilung des Kardiomyozytenrasens

Um in einer Kulturschale gleichzeitig RNA-, Proteingehalt und Anzahl der Zellkerne zu bestimmen, wurden 8 Schalen am Präparationstag in getrennte Bereiche unterteilt. Dafür

wurde ein aus Messing hergestelltes Dreieck, dessen Grundfläche exakt $^1/_{16}$ der Grundfläche (4,9 cm^2) der 100 mm Kulturschale entsprach (78,5 cm^2), benutzt. Zur Vorbereitung der Zellkulturen wurden diese wie unter 2.4.1 beschrieben mit PBS gespült. Daraufhin wurde das Dreieck mit einer handelsüblichen Schraubzwinge auf der Kulturschale fixiert. Mit einem Skalpell wurde von innen und außen am Dreieck entlang der Plastikboden der Schale eingeritzt, das Dreieck wurde wieder abgenommen und der Boden mit Silicon eingerieben. Hinterher wurde das Dreieck wieder auf den mit dem Skalpell markierten Bereich gesetzt und behutsam mit der Zwinge fixiert. Der Zellrasen konnte wie unter 2.4.1 beschrieben um das Dreieck herum gelöst werden. Nachdem der Zellrasen gelöst und mit dem RNAzol® möglichst vollständig in Sarstedt-Röhrchen pipettiert wurde, wurde der äußere Bereich zweimal gründlich mit 0,1 M Zitronensäure gespült und luftgetrocknet. Das Dreieck wurde entfernt, das verbliebene $^1/_{16}$ der Zellen auf der Schale mit je 500 µl 0,1 M Zitronensäure pro Kulturschale fünf Minuten inkubiert, mit einem Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Vollständigkeit der Entfernung der Zellen wurde danach unter dem Zeiss Mikroskop kontrolliert.

2.5.1. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde mit dem Protein Assay von Biorad bestimmt. Das Testprinzip beruht hierbei auf der Bildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes (Coomassie-Brillant-Blau-Reagenz G-250), dessen Extinktionsmaximum zwischen 465 nm und 595 nm liegt. Zur Bestimmung des Gesamt-Proteingehaltes in den Kardiomyozyten der Kultur wurde zu den unter Abschnitt 2.5 aliquotierten Zellen ein Volumen 10% Trichloressigsäure (TCA) zugegeben, die Probe durchmischt und 15 Minuten bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Nachdem der Überstand abdekantiert war, wurden die Zellen in 500 µl 2 N NaOH resuspendiert und für 30 Minuten bei 56 °C in einem Heizblock inkubiert. Für die Proteinbestimmung wurde die Lösung mit 500 µl 2 N HCl neutralisiert. 100 µl des resuspendierten Präzipitates 1 : 10 wurden mit Aqua ad injectabilia verdünnt, in Mikroküvetten gegeben und nach Zugabe von Bio-Rad®-Reagenz im UV-Photometer bei 578 nm gemessen. Zur Eichung des Photometers wurde zuvor in Doppelbestimmung eine Standardkurve mit Bovinem Serum-Albumin gemessen. (21,4; 10,7; 5,4; 2,7; 1,3; 0,7 µg/ml)

2.5.2. Zellkernzählung

Von den in Abschnitt 2.5 gepoolten Zellaliquots wurden 500 µl in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß zur Lyse des Sarkolemms mit 13,3 µl Triton X-100 für 10 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusetzen von 0,5 µl Hoechst 33258 DNA-Fluoreszenzfarbstoff wurden in 10 µl der Lösung in einer Neubauer Zählkammer unter dem Fluoreszenz Mikroskop die Zellkerne wie unter 2.1.2 ausgezählt (siehe Abbildung 3).

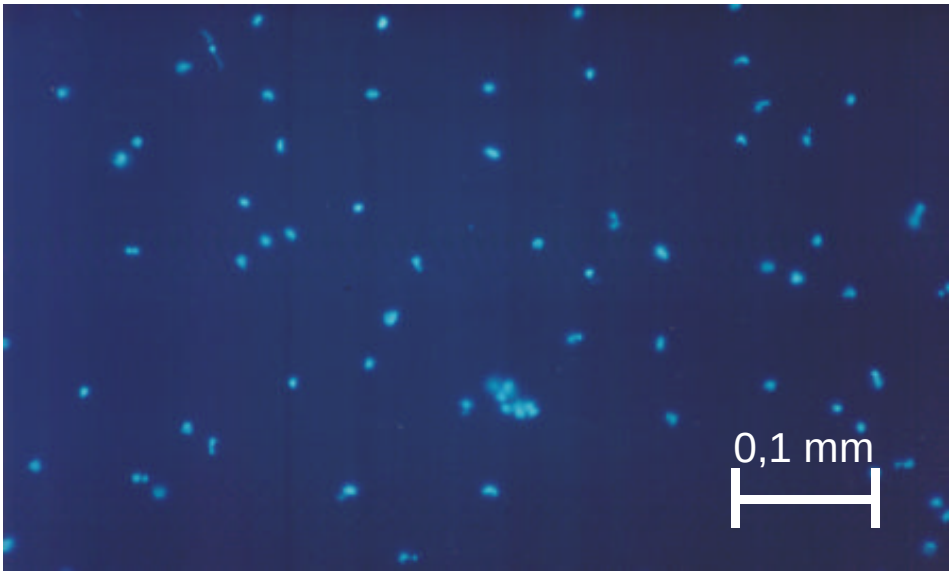


Abbildung 3: Darstellung der mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellkerne von Kardiomyozyten bei 400facher Vergrößerung unter dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

2.6. Zusammenfassen der RNA zu RNA-Pools

Aus den 12 Kardiomyozyten Präparationen ergaben sich für die null, drei und zehn Tage alten Kulturen 36 verschiedene RNA-Proben mit jeweils 12 Proben pro Bedingung. Sie wurden zu vier Pools zusammenpipettiert, wie in Tabelle 1 dargestellt. Um analoge RNA-Mengen für die null bis drei Tage alten und vier bis sieben Tage alten Ventrikel zu erhalten, wurden jeweils die RNA-Proben von vier Ventrikeln (von einem Präparationstag) für einen Pool zusammenpipettiert, entsprechend jeweils 16 null bis drei Tage alten und vier bis sieben Tage alten Ventrikeln. Für die RNA erwachsener Ventrikel reichte die präparierte RNA-Menge eines Ventrikels für jeweils einen Pool.

Pool	N1					
Alter	0 T		3 T		10 T	
	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil
	2	7,8	1	12,0	1	4,1
	3	1,5	3	1,9	2	8,2
	4	6,2	4	4,3	4	16,4
	6	17,2	6	21,9	10	1,6
	8	0,9	8	1,1	11	69,7
	11	66,3	10	1,9		
			11	56,9		

Pool	N2					
Alter	0 T		3 T		10 T	
	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil
	2	6,8	1	10,5	1	3,6
	3	11,2	3	11,5	2	7,2
	4	1,7	6	19,2	3	9,9
	6	15,1	7	3,7	4	10,6
	7	3,7	8	1,0	7	3,7
	8	0,8	10	54,1	10	53,8
	10	52,5			11	11,2
	11	8,3				

Pool	N3					
Alter	0 T		3 T		10 T	
	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil
	1	3,9	1	3,9	1	3,9
	2	28,3	2	28,3	2	28,3
	5	16,1	5	16,1	5	16,1
	6	9,4	6	9,4	6	9,4
	8	3,0	8	3,0	8	3,0
	9	39,3	9	39,3	9	39,3

Pool	N4					
Alter	0 T		3 T		10 T	
	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil	Präp.Nr.	% Anteil
	1	2,9	1	2,9	1	2,9
	5	12,1	5	12,1	5	12,1
	6	7,1	6	7,1	6	7,1
	8	2,3	8	2,3	8	2,3
	12	75,6	12	75,6	12	75,6

Tabelle 1: Zusammenfassung der RNA zu RNA-Pools. 0 T, 3 T, 10 T kennzeichnet das Alter der Kardiomyozyten, entsprechend neonatalen, drei Kulturtage und zehn Kulturtage alten Kardiomyozyten. N1-N4 kennzeichnet den fertigen RNA-Pool. Präp.Nr. ist die Kardiomyozytenpräparationsnummer. % Anteil gibt den prozentualen Anteil einer Präparation am Gesamtpool einer Altersstufe wieder.

Um die Expression auf einen Standard beziehen zu können, wurde eine Standard-RNA aus möglichst vielen in den Analysen verwendeten RNA-Proben zusammen pipettiert. Der Standard bestand aus 58% Gewebe- und 42% Kardiomyozyten-RNA. Die Gewebe-RNA setzte sich zusammen zu 26% aus RNA von erwachsenen Rattenventrikeln, von allen vier verwendeten Ventrikeln und zu je 16% aus RNA von vier bis sieben Tage alten und neonatalen Gewebe. Die Kardiomyozyten-RNA stammte zu 2% von zehn Tage alten, 8% drei Tage alten und 32% null Tage alten Kardiomyozyten.

2.7. Northern Blot

2.7.1. Northern Blot Herstellung

Zum quantitativen und qualitativen Nachweis der mRNA-Expression der zu untersuchenden Proteine wurden Northern Blots hergestellt. Dazu wurde ein großes RNA-Agarosegel mit der unter 2.7.1 beschrieben Zusammensetzung hergestellt. Dafür wurde diesmal 1 g Agarose mit 99 ml 1xMOPS aufgekocht, nach dem Abkühlen 5,67 ml Formaldehyd und 2 µl Ethidiumbromid zugesetzt und auf den vorbereiteten Gelträger mit einem 10-Spuren-Kamm gegossen. Insgesamt wurden acht Northern Blots hergestellt, bei denen jeweils 20 µg der zu untersuchenden RNA und 10, 20, und 25 µg Standard-RNA aufgetragen wurden. Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden zur Vermeidung systemischer Fehler jeweils in unterschiedlicher Reihenfolge aufgetragen, wobei jeweils zwei Blots als Doppelbestimmung die identische RNA enthielten und alle Blots von jeder Bedingung jeweils eine RNA enthielten. Daraus folgte, dass auf jedem Agarosegel jeweils 20 µg RNA von null, drei und zehn Tage alten Zellkulturen, sowie von null bis drei Tage alten, vier bis sieben Tage alten und erwachsenen Ventrikelgeweben und EHTs neben den drei Standard-RNA-Proben aufgetragen wurde. Die RNA-Proben wurde wie unter 2. 3. 4) zum Auftragen vorbereitet, wobei die jeweilige RNA Menge mit Apotheken Wasser auf 15 µl ergänzt und mit 30 µl Denaturierungpuffer denaturiert wurde, um sie anschließend mit 2 µl Ladepuffer aufzutragen. Nach der 15minütigen Vorlaufzeit wurde eine Einlaufspannung von 60 Volt angelegt, die dann bei einer Laufzeit von zwei bis drei Stunden pro Gel auf 100 Volt gesteigert wurde. Nach der Fotodokumentation der elektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA mit Hilfe des Kapillarblot-Verfahrens über Nacht auf eine Nylonmembran mit 20xSSC als Transfermedium übertragen. Anschließend wurde die RNA auf der getrockneten Nylonmembran mittels UV-Bestrahlung kovalent fixiert und die Positionen der ribosomalen 18S- und 28S-RNA mit Kugelschreiber am Rand der Membran markiert.

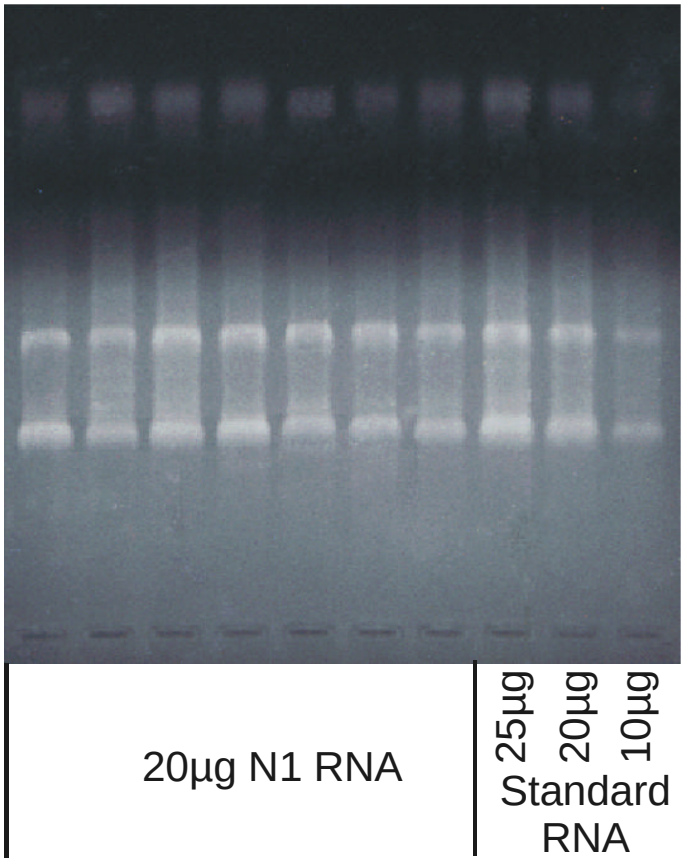


Abbildung 4: Darstellung eines 1% Agarosegels, fotografiert unter UV-Licht (in diesem Fall beispielhaft mit RNA des N1-Pools) mit 10, 20 und 25 µg Standard-RNA und weiteren sieben Spuren die jeweils 20 µg RNA der verschiedenen Kulturdauern, des Gewebes zum Zeitpunkt 0 T, 4-7 Tagen und 2 Monaten bzw. von EHTs enthielten.

2.8. cDNA Synthese

Die Synthese der cDNA zum Nachweis spezifischer mRNA auf den Northern Blots soll an dieser Stelle am Beispiel der cDNA für das atriale natriuretische Peptid (ANP) dargestellt werden. Die Oligonukleotide der 18S-rRNA, α- und β-MHC-cDNA wurden bei der Firma MWG-Biotech bestellt und synthetisiert (Chan et al. 1984). Plasmide mit den Inserts von Giα-2 und Gsα wurden von Dr. Ranmdalf, John Hopkins Universität, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt (Jones 1987) . Die Gβ kodierende cDNA wurde im Plasmid von Dr. P. Gierschik, Deutschland, zum Gebrauch überlassen. Die Sonde von $VEGF_{165}$ wurde in unserem Institut von cand. med. Ralf Bendorf synthetisiert. Dr. E. G. Lakatta und Dr. M. O. Boluyt stellten dem Institut das von Dr. S. L. Sabol angefertigte Plasmid mit der ppENK-Sequenz zur Verfügung.

2.8.1. PCR

Das Insert mit der komplett kodierenden Region des ANP der Ratte, die ca. 700 Basenpaare lang ist, wurde von Micheal T. Crow, Gerontology Research Center, Laboratory of Cardiovascular Science, Baltimore, USA, synthetisiert (Oikawa et al. 1984, Masatoshi et al. 1984), und dem Institut zur Verfügung gestellt. Ebenso wurden die für die PCR notwendigen Primer mit der Sequenz:

Sense: ACC AGA GAG TGA GCC GAG AC

Antisense: CCC AAC TGC TTT CTG AAA GG

zur Verfügung gestellt.

Zur Synthese der cDNA wurden 1 µl des Inserts (0,1 mg/ml in Aqua Bidest) mit 2 µl Sense- und Antisense Primermix in 47 µl Aqua Bidest und 50 µl 2xCetus Puffer in ein 500 µl PCR-Tube pipettiert und nach mischen und anzentrifugieren mit PCR-Mineral-Öl abgedeckt. Im Thermocycler wurde die Probe fünf Minuten bei 94 °C denaturiert. Anschließend würden bei einer Haltetemperatur von 65 ºC 2 µl Taq-Polymerase zugesetzt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt (Denaturierung 95 °C, Annealing 55 °C, Synthese 72 °C).

PCR-Programm:

10 Zyklen:	95 °C für 30 Sekunden
	55 °C für 45 Sekunden
	72 °C für 60 Sekunden
10 Zyklen:	95 °C für 30 Sekunden
	55 °C für 45 Sekunden
	72 °C für 90 Sekunden
10 Zyklen:	95 °C für 30 Sekunden
	55 °C für 45 Sekunden
	72 °C für 2 Minuten
1 Zyklus:	72 °C für 5 Minuten

Haltetemperatur: 25 °C.

2.8.2. DNA-Agarosegel

Das PCR-Produkt wurde auf einem 1xDNA-Agarosegel überprüft. Dazu wurden 300 mg Agarose mit 30 ml 1xTBE wie unter 2.3.4. aufgekocht, mit 1 µl Ethidiumbromid vermischt, in den vorbereiteten Gelträger gegossen und für mindestens 30 Minuten bei

Raumtemperatur stehen gelassen. 10 µl des PCR-Produktes wurden nach dem Abpipettieren des PCR-Öles mit 1 µl DNA-Ladefarbe versetzt, gemischt, anzentrifugiert, und die Probe wurde in die Auftragsschlitze des DNA-Agarosegels pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet, als Längenstandard 500 ng DNA-Längenstandard η/Bst EII und/oder δ/Eco RI/Hind III, (Appligene, Heidelberg, Deutschland). Nach Kontrolle des Gels unter der UV-Lampe wurde dieses auf Polaroid Film dokumentiert. Ein 700 bp langes cDNA-Fragment wurde mit Hilfe eines großen 1% DNA-Agarosegels elektrophoretisch von dem Plasmid und den eingesetzten Primern getrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit® aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel unter UV-Kontrolle herausgeschnitten, gewogen und mit drei Volumen QX1-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß bei 50 °C für zehn Minuten unter Rotation auf einem Heizblock inkubiert. Um den pH-Wert der Probe unter 7,5 zu senken, was für eine effiziente Bindung der cDNA in der Spin column notwendig ist, wurden 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,0 hinzugefügt und durch Invertieren vermischt. Daraufhin wurde eine QIAquick Spin Column in einem 2 ml Collection Tube platziert, die Probe in die Säule geladen und für 60 Sekunden bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Durchflussfraktion wurde aus dem Collection Tube verworfen, die Säule mit 50 µl PE-Puffer gewaschen und der Waschpuffer durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 14000 rpm entfernt. Zur Extraktion der cDNA aus der Säule wurde diese in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß platziert, mit 50 µl H_20 beladen und für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration im gewonnenen Eluat wurde wie unter 2.4.5 beschrieben photometrisch bestimmt.

2.8.3. Ligation der cDNA in das Plasmid

Das PCR-Fragment wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pT_7-Blue wie folgt subkloniert. 241 ng des Ampicillin-Resistenz-Gen enthaltenden pT_7-Plasmids wurden mit 70 ng cDNA in einem Eppendorf Gefäß vorgelegt und mit Aqua ad injectabilia auf 8,5 µl aufgefüllt. Die eingesetzten Mengen errechneten sich aus der untenstehenden Formel 1. Mit der cDNA Länge von 700 bp für das Insert bzw. 2887 bp für das geschnittene pT_7Blue-Plasmid errechneten sich die o. g. Mengen.

$$Menge\ \ des\ Inserts\,(ng) = \frac{Insert(kb)}{Plasmid(kb)} * eingesetztes\ Plasmid\,(ng) * 1{,}2$$

Formel 1: Mengenberechnung für die Ligation

Zur Kontrolle wurden je eine Probe des Plasmids und des Inserts mit und ohne Ligase dem Experiment beigefügt. Um Sekundärstrukturen zu lösen, wurden die Proben für fünf Minuten auf 45 °C erwärmt und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl 10xLigasepuffer und 0,5 Units T4-Ligase wurden die Gefäße für vier Stunden bei 16 °C unter leichter Rotation auf einem Heizblock inkubiert.

2.8.4. Transformation in $DH_{5\alpha}$-Escherichia Coli Bakterien

Um ausreichende Mengen an Plasmid und damit auch an einklonierter ANP-cDNA zu erhalten, wurde das Plasmid in kompetente $DH_{5\alpha}$-E. Coli Bakterien transformiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden hierbei auf Eis ausgeführt. Dafür wurden 50 ng Plasmid mit Aqua ad injectabilia auf 10 µl aufgefüllt und mit 100 µl E. Coli Suspension vermischt und für zehn Minuten auf Eis abgekühlt. Durch plötzliches Anheben der Temperatur auf 42 °C auf einem Heizblock für zwei Minuten konnten die Plasmide in die Bakterien aufgenommen werden. 1 ml Ampicillin freies LB-Medium wurde zugegeben und die Suspension für eine Stunde bei 37 °C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. 100 µl der Suspension wurden auf eine Ampicillin-Agar-Petrischale pipettiert, mit 500 µl Amp. -LB-Medium gleichmäßig verteilt und für 12-18 Stunden im Inkubator bei 37 °C belassen. Nur Bakterien, die ein zirkuläres pT_7-Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenz-Gen enthalten, können auf der Amp. -Agar-Schale Kolonien bilden. Die Überprüfung der Integrität des inkorporierten Plasmides erfolgte mit einer sog. „One Step Mini-Präparation“, einem Restriktionsverdau und einer Überprüfung auf einem 1% DNA-Agarosegel. Für die Plasmid Präparation wurden Kolonien mit einer sterilen Pipette aufgenommen, in ein Falcon Tube mit 10 ml Amp. -LB-Medium überführt und über Nacht im Bakterieninkubator bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden von dieser Kultur 1,5 ml zur "One Step Mini-Präparation" eingesetzt, während die restliche Suspension bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die 1,5 ml wurden mit 1,5 ml Chloropan für eine Minute gemischt und für fünf Minuten bei 12000 g zentrifugiert. 1,45 ml der wässrigen Phase wurden in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit 1,5 ml Isopropanol bei 12000g fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem das entstandene Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen worden war, wurde es in 25 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Der Restriktionsverdau erfolgte gemeinsam mit einem RNA-Verdau durch RNase A mit den Restriktionsenzymen ACC I und der Kombination aus Spe I und Bam HI. Dafür wurden für jede Probe 4 µl Plasmid, 1,3 µl RNase A, 1 µl des vom Hersteller angegebenen Puffers und 1 µl der benötigten Enzyme mit Aqua ad injectabilia auf 10 µl in einem Eppendorf Gefäß aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben wie unter 2.8.2 beschrieben mit einem DNA-Längenstandard auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen und nach der Auftrennung fotografisch dokumentiert. Da sowohl die Plasmidsequenz, als auch die Sequenz des ANP-Inserts bekannt war, lies sich aus den Soll-Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme und der im Agarosegel tatsächlich erhaltenen Fragmentlängen der Erfolg der PCR, der Ligation und der Transformation beurteilen. Die Bakterien Klone mit dem ANP-Plasmid wurden für 24 Stunden in 10 ml Amp.-LB inkubiert.

2.8.5. Large Scale

Zur Plasmid Präparation wurden 100 µl der bei 4 °C aufbewahrten Übernachtkultur in 25 ml LB- Medium mit 100 µl Ampicillin pipettiert und über den Tag in den Inkubator (100 rpm, 37 °C) gegeben. Diese 25 ml gelangten dann in einen sterilen zwei Liter Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium und 2 ml Ampicillin-Stammlösung und wurden über die folgende Nacht inkubiert. Die 500 ml Bakteriensuspension wurde auf drei 250 ml Zentrifugationsgefäße verteilt, in der Vakuumzentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm (3840 g) für zehn Minuten pelletiert und der Überstand wurde abdekantiert. Die Pellets wurden in je 100 ml STE-Puffer resuspendiert und wie oben erneut zentrifugiert und abdekantiert. Nachdem das entstandene Pellet in 10 ml P_1-Puffer resuspendiert war und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert hatte, wurden 10 ml P_2-Puffer zugesetzt und die Gefäße vorsichtig invertiert. Nach erneuten fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden 10 ml P_3-Puffer hinzupipettiert und die Gefäße für 30 Minuten auf Eis gehalten. Daraufhin wurde der entstandene Zelldetrius durch 30 minütige Zentrifugation bei 13500 rpm (28000 g) und 4 °C in der Vakuumzentrifuge pelletiert. Der Überstand mit den Plasmiden wurde durch Gaze in Falcon Tubes filtriert und bei 4 °C mit 3000 rpm (937 g) für 20 Minuten erneut zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden Qiagen tip-500 Säulen mit 10 ml Äquilibrierungspuffer äquilibriert und der zentrifugierte Überstand durch Gaze filtriert und aufgetragen. Die Durchflussfraktion wurde in Falcon Tubes aufgefangen und erneut über die Säule gegeben, die daraufhin zweimal mit 30 ml QC-Waschpuffer gewaschen wurde. Die an der Säule gebundenen Plasmide wurden mit 15 ml QF-Elutionspuffer in ein Falcon Tube eluiert und anschließend mit 15 ml Isopropanol für 30 Minuten bei –80 °C präzipitiert. Nachdem die Falcon Tubes für 30 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm (1670 g) zentrifugiert worden waren, wurde das entstandene Pellet in 10 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in Aqua ad injectabilia gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.8.6. Restriktionsverdau

Um die Identität des pT7-ANP-Plasmid erneut zu überprüfen, wurde ein analytischer Restriktionsverdau wie unter 2.8.4 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 2 genannten Restriktionsenzyme in den aufgeführten Kombinationen eingesetzt und mit dem ungeschnittenen Plasmid und einem DNA-Längenstandard auf einem DNA-Agarosegel aufgetragen.

Enzym	1	2	3	4	5	6	7
ACC I	*						
Bam Hi		*		*			
Eco RI						*	*
Pst I					*		
Pvu I							*
Xba I		*		*		*	*
Xho I			*	*			

Tabelle 2: Restriktionsverdau des pT7-ANP-Plasmids. Probe1-7 kennzeichnet den jeweiligen Restriktionsverdau. Mit "*" sind die in dem Restriktionsverdau benutzen Enzyme gekennzeichnet. Die Ansätze 1+2 sind exemplarisch in Abbildung 5 dargestellt.

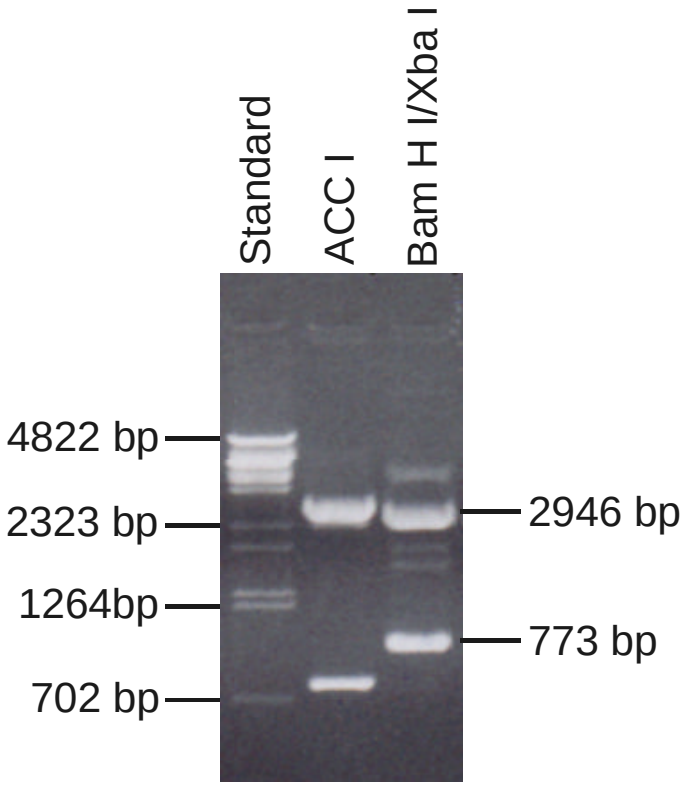


Abbildung 5: Originalabbildung eines 1% DNA-Agarosegels. Aufgetragen wurde der pT7-ANP-Plasmid nach dem Restriktionsverdau mit o.g. Enzymen. Links dargestellt sind die DNA Längen in Basenpaaren (bp) orientiert am DNA-Längenstandard (Standard) η/Bst E II. ACC I, Bam HI, Xba I kennzeichnen die Restriktionsenzyme die zum Kontrollverdau des pT7-ANP-Plasmids verwandt wurden. Rechts markiert wurde das ANP-Insert (773 bp) mit Bam HI und Xba I aus dem pT7-ANP-Plasmid geschnitten.

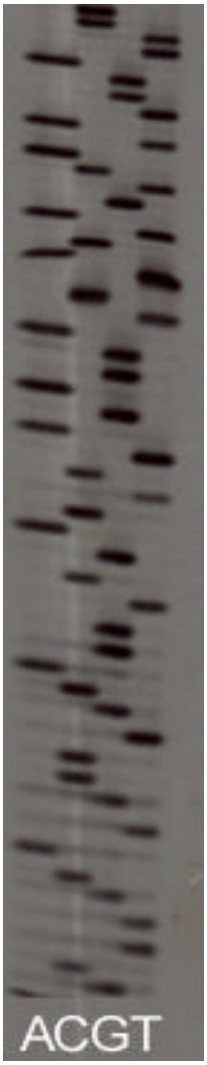
2.8.7. Sequenzierung

Das Plasmid wurde zur weiteren Überprüfung mit Hilfe der Sequenase® ansequenziert. Alle Reaktionen erfolgten in Eppendorf-PCR-Tubes. Zur Denaturierung des doppelsträngigen DNA-Ringes wurden 5 µg Plasmid mit 0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 Volumen% 3 M Natriumacetat pH 5 wurde das Plasmid bei –80 °C in 83% Ethanol für 15 Minuten präzipiert und nach Pelletieren (15 Minuten bei 14000 rpm) und Waschen in 70% Ethanol wurde das jetzt denaturierte Plasmid in 7 µl Aqua ad injectabilia, 2 µl Sequenase-Puffer und 1 µl T_7-Primer gelöst. Nach dem Annealing im Thermocycler für zwei Minuten bei 65 °C kühlte die Probe auf 30 °C innerhalb der nächsten 30 Minuten ab und wurde anschließend auf Eis gestellt. Für die Labeling Reaktion wurde der Nucleotid-Labeling-Mix 1 : 5 in Aqua ad

injectabilia und die Sequenase 1 : 8 in Sequenase-Puffer verdünnt und nach folgendem Pipetierschema eingesetzt:

- Primer-DNA-Mix: 10 µl (gesamtes Volumen)
- DTT 0,1 M 1,0 µl
- gelöster Labeling Mix: 2,0 µl
- γ-^{33}P-dATP: 0,5 µl
- gelöste Sequenase: 2,0 µl

Nach Inkubation für zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden je 3,5 µl des Ansatzes in vier PCR-Tubes pipettiert, in denen jeweils 2,5 µl ddNTP, entsprechend ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP zum Strangabbruch vorgelegt worden waren. Nach Mischen und Anzentrifugieren wurden die Tubes für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden 4 µl Stop Solution zugesetzt. Nach Denaturierung bei 80 °C für zwei Minuten wurden die Lösungen auf ein denaturierendes Polyacrylamid Sequenzierungsgel aufgetragen. Nach auftrennen der Banden wurde das Gel für 12-18 Stunden auf einem Film exponiert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 6 dargestellt.



TAAACGAGGTTATACCGGACCCTC++TTTTCCGGTC+TTCTCCTTCTTC
GGGAACCACTACCTCTTCCTCGGGTACGACCGCACCCAGCCCCGTGC
TAGACTACAAACGACAGAGCCGAGTGAGAGACCTTAGGTATACTGAT
CATCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCG

Abbildung 6: Basensequenz des ANP-Inserts

132 Basen waren lesbar, von denen drei nicht sicher zu identifizieren waren (+). Von den 132 Basen entsprechen 49 Basen der Sequenz des pT_7-Plasmides (blau). Es folgt Tymidin, das komplementär zum Adenin ist, welches von der Taq-Polymerase (siehe 2.9.1) eingefügt worden war. Weitere 54 Basen aus der nicht kodierenden Region des ANP-Inserts folgen (rot). 28 Basen waren aus der kodierenden Region des Inserts zu identifizieren (schwarz). Links: Ausschnitt aus der Originalabbildung der Autoradiographie des Sequenzgels. ACGT kennzeichnen die Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Tymidin.

2.8.8. cDNA Isolierung

20 µg Plasmid mit Bam HI und Xba I wurden wie oben beschrieben über Nacht geschnitten, auf einem kleinen DNA-Agarosegel aufgereinigt, die ANP-cDNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit aus dem Gel isoliert (siehe 2.8.2) und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.9. Hybridisierung

Der qualitative Nachweis und die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression der zu untersuchenden Proteine erfolgte durch DNA-RNA-Hybridisierung auf den wie unter 2.7 beschrieben hergestellten Northern Blots. Die Synthese der radioaktiv markierten cDNA-Sonde erfolgte, je nach Länge der zur Verfügung stehenden cDNA, durch ein Endlabeling mit ^{32}P-γ-Deoxyadenosintriphosphat oder durch Nick Translation durch den Megaprime®-Kit mit ^{32}P-Deoxycytosintriphosphat (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Hybridisierungseigenschaften und Charakterisierung der cDNA.

Sonde	Länge (Basen)	Eigenschaften der cDNA	Markierungs Verfahren
18S	24	Sequenz s.u. bp 1046-1070	Endlabeling
α-MHC	40	Sequenz s. u. aus dem 3` untranslatierten Bereich	Endlabeling
ANP	773	voll kodierend aus pT_7-Blue X Bam HI +Xba I	Megaprime®
β-MHC	40	Sequenz s. u. aus dem 3‘ untranslatierten Bereich	Endlabeling
Gβ	840	voll kodierend aus pGEM-3Zf- X Xho I + Bgl III	Megaprime®
Giα-2	1750	voll kodierend aus pGEM-2 X EcoRI	Megaprime®
Gsα	1120	EcoRI-Fragment des 3‘-Endes aus pRAGsa	Megaprime®
PLB	1036	EcoRI-Fragment aus pRHCa	Megaprime®
ppENK	935	aus pSP_{65} X Sma I und Sac I	Megaprime®
SERCA	2900	voll kodierend aus pRHCa 39 X EcoRI und Hind III	Megaprime®
$VEGF_{165}$	563	voll kodierend aus pT_7-Blue X EcoRI	Megaprime®

5'-Sequenz α-MHC-Oligonukleotid:

5'-TTG TGG GAT AGC AAC AGC GAG GCT CTT TCT GCT GGA CAG G-3'

5'-Sequenz β-MHC-Oligonukleotid:

5'-TCC AGG TCT CAG GGC TTC ACA GGC ATC CTT AGG GTT GGG T-3'

5'-Sequenz 18S-rRNA-Oligonukleotid:

5'-ACG-GTA-TCT-GAT-CGT-CTT-CGA-ACC-3'

2.9.1. Endlabeling

Da die Sequenzen von α- und β-MHC sich nur im äußeren 3`Bereich deutlich unterscheiden, konnten nur aus diesem Bereich kurze Oligonukleotide hergestellt werden, die eine spezifische Unterscheidung zwischen beiden Isoformen erlaubte. Wegen der Kürze der Oligonukleotide war eine Markierung mit dem Megaprime®-Kit nicht möglich. Deshalb wurden auf die Oligonukleotide am 5`-Ende ein ^{32}P-Phophatrest übertragen.

Reaktionsprinzip: Oligo-DNA-OH 5` $\xrightarrow{\text{T4-Polynucleotid Kinase}}$ 5` ^{32}P-Oligo-DNA

γ - ^{32}P-ATP ADP

DTT, Mg^{2+}

Dafür wurden mindestens 100 pmol der entsprechenden Oligo-DNA mit 1,5 µl Kinase-Puffer, 5 µl γ-dATP, und 1,5 µl T4-Polynucleotid Kinase mit Aqua Bidest ad 15 µl eine Stunde bei 37 °C auf einem Heizblock inkubiert. Darauf wurde die Kinase durch fünf minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 50 µl TE-Puffer wurde das gesamte Volumen auf eine zuvor mit TE-Puffer gespülte Nick-Säule pipettiert, und mit den unten stehenden Volumina TE-Puffer größenfraktioniert eluiert.

- 1. Fraktion: 350 µl
- 2.-5. Fraktion: 200 µl
- 6.+7. Fraktion: 1000 µl

Fraktion 2 und 3 enthielten die radioaktiv markierte Sonde. Die aus der Säule eluierten DNA-Fraktionen wurden in Eppendorf Gefäßen aufgefangen und die spezifische Aktivität wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im β-Counter aus jeder Fraktion bestimmt. Die Sonden wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.9.2. Nick Translation

Um längere markierte cDNA-Sonden zu synthetisieren, wurden 25 ng der cDNA mit 5 µl Random-Primer in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Daraufhin wurden je 4 µl dATP, dGTP, dTTP, 50 µCi ^{32}P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, 3.3 µM) und 5 µl Reaktionspuffer dazu pipettiert, 2 µl Klenow Enzym zugesetzt und auf 50 µl mit Aqua Bidest aufgefüllt. Die Lösung wurde nach gründlichem Durchmischen mit der Pipette für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, dann wurden zum inaktivieren der Ca^{2+} - abhängigen Enzymaktivität 2 µl 0,5 M EDTA dazugegeben, der Ansatz wurde gemischt und anzentrifugiert. Die Extraktion der markierten cDNA-Sonde erfolgte, wie unter 2.9.1 beschrieben, mit Hilfe einer Nick-Säule.

2.9.3. Hybridisierung

Zur Hybridisierung der cDNA-Sonden wurden die wie unter 2.7 beschrieben produzierten Northern Blots mit 1 ml Prähybridisierungsflüssigkeit pro 1 cm^2 Blotfläche in eine Hybridisierungsröhre gegeben. Um unspezifische Bindungen der cDNA zu reduzieren, wurden 200 µg denaturierte t-RNA / 1 ml Flüssigkeit zugesetzt. Die t-RNA wurde für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend für fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierung erfolgte nun für ein bis zwei Stunden bei 42 °C unter permanenter Rotation der Röhren in einem Hybridisierungsofen. Von der ^{32}P-markierten cDNA-Sonde wurden anschließend 10^6 dpm/ml Hybridisierungsflüssigkeit der Fraktionen 2 und 3 wie oben beschrieben denaturiert und in die Hybridisierungsröhren dazupipettiert. Die Inkubationszeit betrug 12-16 Stunden.

2.9.4. Waschen und Exponieren

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zehn Minuten bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 65 °C unter permanentem Schütteln im Wasserbad in 2xSSC, 0,1% SDS, gefolgt von dreimal 20 Minuten bei 65 °C in 0,2xSSC, 0,1% SDS gewaschen. Eine Ausnahme bildete hierbei das Waschen der mit 18S-rRNA markierten Northern Blots, die 15 Minuten bei Raumtemperatur in 3xSSPE, 0,1% SDS, gefolgt von zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSPE, 0,1% SDS gewaschen wurden. Nach dem Waschen wurden die feuchten Membranen blasenfrei in handelsüblicher Vakuumfolie eingeschweißt und zunächst für 12-24 Stunden auf einer Phophorimagerplatte exponiert, gefolgt von einer anschließenden Exposition auf Kodak-X-OMAT-Film bei –20 °C für zwei bis vier Tage.

2.9.5. Entfernung der DNA-Sonde

Für nachfolgende Hybridisierungen mit anderen radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurde die vorher verwendete cDNA von den Membranen entfernt. Hierfür wurden diese

für zehn Minuten mit kochendem 0,1% SDS gewaschen, gefolgt von zehn Minuten in eiskaltem 0,1% SDS. Um die vollständige Entfernung der Sonde zu überprüfen, wurden die Membranen für 12-24 Stunden auf Phosphorimagerplatten kontrolliert. Bis zur folgenden Hybridisierung zwischen mit 10% SSC getränkten Filterplatten eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

2.10. Substanzen, Lösungen und Materialien

- 10x MOPS-Puffer:
  0,01 M EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure)
  0,05 M Natriumacetat
  0,2 M MOPS (3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure)
  pH 5,5-7,0
- 10xTBE:
  108 g Tris-Base
  61,7 g Borsäure
  40 ml 0,5 M EDTA pH 8
  mit 1000 ml Aqua Bidest aufgefüllt und autoklaviert
- 20xSSC:
  3 M NaCl
  200 mM Natriumcitrat
  pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt
- 20xSSPE
  174g NaCl
  27,6g NaH_2PO_4 H_2O
  7,4g EDTA-Na
  ad 1000ml Aqua Bidest, pH auf 7,4 mit NaOH eingestellt, autoklaviert
- 50xDenhardt:
  5g Ficoll
  5g Polyvinypyrolidon
  5g Bovines Serum Albumin
  ad 500 ml Aqua Bidest
- 50xTrypsin Stamm:
  5g in 50 ml CBFHH unter permanenter Invertierung
- 71xDNase Stamm:

100 mg DNase I in 50 ml 0,15 M NaCl

sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert

- 5-Bromo-2‘Deoxyuridine (BrdU), Sigma Chemicals Co. , St. Louis, USA
- 100xBrdU Stamm:

  30,74 mg in 10 ml Aqua ad injetabilia Wasser gelöst

  sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.
- Agarose, Bethesda Research Laboratories, Geithersburg, USA
- Ampicillin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
- Ampicillin Stamm:

  1,25 g Ampicillin

  ad 50 ml Aqua ad injectabilia

  ad 350 µl NaOH

  sterilfiltriert
- Ampicillin-Agar:

  80 µl Ampicillin Stamm

  20 ml Agar-Lösung
- Aqua ad injectabilia, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
- Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Hamburg, Deutschland
- Bacto Yeast Extract, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Bacto-Tryptone, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Bio-Rad® Protein Assay, BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Borsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bovines Serumalbumin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
- Bromphenolblau, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
- Brutschrank, Funktion Line, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- CBFHH-Puffer (Calcium and Bicarbonate-free Hanks with HEPES)

  136,9 mM NaCl

  5,36 mM KCl

  0,81 mM $MgSO_4x(H_2O)_7$

  5,55 mM Dextrose

  0,44 mM KH_2PO_4

  0,34 mM $Na_2HPO_4x(H_2O)_7$

  20,0 mM HEPES pH 7,4

pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt

Bei 4 °C gelagert.

- Cetus Puffer:

  10 mM Tris, pH 8,3

  50 mM KCl

  3 mM MgCl

  10 µg/ml Bovines Serumalbumin

  0,2 mM dNTPs

  2,8 ml Aqua Bidest

- Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chloroform/Isoamylalkohol:

  490 ml Chloroform

  10 ml Isoamylalkohol

- Chloropan:

  200 ml Chloroform/Isoamylalkohol

  200 ml Phenol, pH 8

- Counter, 2000CA Tri-Carb, Canberra Packard, Dreieich, Deutschland
- deionisiertes Formamid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Denaturierungspuffer:

  1xMOPS-Puffer

  6,5% säurefreies Formaldehyd

  47,5% deionisiert Formamid

- Deoxyribonuclease II from Bovine Spleen, Sigma Chemical Co. , St. Louis, USA
- Dextrose, Sigma Chemical Co. , St. Louis, USA
- DNA-Ladefarbe:

  1% Bromphenolblau

  1% Xylencyanid

  49% Glycerin

  49% 1xTBE

- DNA-Längenstandard

  δ/Eco RI/Hind III, Appligene, Heidelberg, Deutschland

  η/Bst E II, Appligene, Heidelberg, Deutschland

- DNaselösung:

  1% P/S,

2,8 µg/ml DNase
2% FCS.
in CBFHH gelöst.

- dNTP, Deoxynucleotidtriphosphate, NEN Dupont, Boston, USA
- DNA-Polymerase (Klenow-Fragment), 1 U/µl, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- Einmalspritze, Injekt, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Eppendorf 1,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland
- Ethanol, Apotheke des Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Ethidiumbromid, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
- Falcon 100x20 mm Tissue Culture Dish, steril, Becton Dickinson Labware, Plymouth, England
- Falcon Tube 50ml, 2070 BLUE MAX 50 ml Conical Tube, steril, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey, USA
- Fetal Calf Serum (FCS), 0,1 µm steril-filtered, mycoplasma tested, Charge 030849, Berlin, Deutschland
- Ficoll, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Filterplatten, Zuschnitte/Cuts 150x150 mm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- Fluoreszenz Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Formaldehyd, säurefrei min. 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Gaze, Polyester PE120 HC
- Glycerol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Heizblock, Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg , Deutschland
- HEPES, [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethanesulfonsäure]], Sigma Chemical Co. St. Louis, USA
- Hoechst Fluoreszenzfarbstoff 33258, 1 mg/ml, Hoechst, Frankfurt/ Main, Deutschland
- Hybridisierungsflüßigkeit für Oligonukleotide:
  12,5 ml 20xSSPE
  1,25 ml 20% SDS
  5,0 ml 50xDenhardt
  ad 50 ml Aqua Bidest
- Hybridisierungsflüßigkeit für cDNA-Sonden:
  50% Formamid

5xDenhardt

5xSSPE

0,2% SDS

ad 500 ml Aqua Bidest

- Hybridisierungsofen, Mini 10, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
- Hybridisierungsröhre, HB-OV-BXL, Heidelberg, Deutschland
- Isoamyalkohol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol, MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
- Kaliumacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kinasepuffer, Promega Corporation, Madison, USA
- Kippwippe, Desaga, Heidelberg, Deutschland
- Kodak X-OMAT AR Scientific Imaging Film, Kodak, Rochester, USA
- Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenk-Becher-Rotor, Beckmann Instruments Inc., Fullerton, Kalifornien, USA
- Kulturmedium

  500 ml Minimal Essential Medium (MEM)

  5% = 27 ml aktives, fetales Kälber Serum (FCS)

  1% = 5 ml Penicillin / Streptomycin (P/S) Gemisch

  1% = 5 ml BrdU Stamm

  Lagerung bei 4 °C
- Küvetten, Cuvettes No 67742, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Ladepuffer:

  50% Glycerol

  50% gesättigte Bromphenolblau Lösung
- LB-Medium:

  20 g Bacto-Tryptone

  10 g Bacto Yeast Extract

  20 g NaCl

  ad 2 l Aqua Bidest

  pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt und autoklaviert
- Ligasepuffer, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- Magnesiumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

- Magnesiumsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Megaprime®-Translations-Kit, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Mikroskop, Labovert, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Mikroskop, Telaval 31,Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Minimal Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland
- Monitor, Observation Monitor SL Type DH 662/OOB, Phillips, Rotterdam Niederlande
- MOPS, 3-Morpholino-propan-Sulfonsäure, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
- Natriumacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcitrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Nick-Säule, Sephadex G50, Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- Nylonmembran, Hybond N, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
- P1-Puffer:

  50 mM Tris/HCl

  10 mM EDTA

  0,1 mg/ml RNase A

  mit NaOH auf pH 8,0 einstellt
- P2-Puffer:

  0,2 M NaOH

  1% SDS
- P3-Puffer:

  3 M Kaliumacetat

  auf pH 5,5 mit Essigsäure einstellt und autoklaviert
- PBS-Puffer:

  0,4 g KCl

  0,4 g KH_2PO_4

  16 g NaCl

  2,3 g Na_2HPO_4

  in 1,5 Liter Aqua Bidest, pH 7,4
- PCR-Mineral-Öl, Sigma Chemical Co. , St. Louis, USA

- PCR-Tubes, Eppendorf 0,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland
- Penicillin / Streptomycin, Gibco-BRL, Eggenstein
- PE-Puffer, QIAquick Gel Extraktion Kit®, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- Phenol Tris gesättigt, pH 7,5, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphorimagerplatte, Imaging Plate BAS-MP 2040P, Fuji Photo Film Co. LTD, Kanagawa, Japan
- Pipette, 10 ml serological Pipett, 10 ml in $^{1}/_{10}$ ml Wide Tip with Plug, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Pipetten, Falcon Serological Pipett 10 ml in $^{1}/_{10}$ ml Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschman Laborgeräte, Deutschland
- Polaroid Film, 667 Film-Pack, Instante Professionem N & B sans laquage, St. Albans, Hertfordshire, England
- Polytron 10-35, Kinematica GmbH, Luzern, Schweiz
- pT_7Blue-Plasmid, 50 ng/µl, Novagen, Schwalbach, Deutschland
- QBT-Equilibrierungspuffer:
  750 mM NaCl
  50 mM MOPS
  15% Ethanol
  0,15% Triton
  mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- QC-Waschpuffer:
  1000 mM NaCl
  50 mM MOPS
  15% Ethanol
  mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- QF-Eluationspuffer:
  1250 mM NaCl
  50 mM Tris/HCl
  15% Ethanol
  mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt
- Qiagen tip-500 Säulen, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- QIAquick Gel Extraktion Kit®, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- QX1-Puffer, QIAquick Gel Extraktion Kit®, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

- Radionukleotide:
  - dATP, ^{33}P-γ-Deoxyadenosintriphosphat, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, 5,0 µM NEN Dupont, Boston, USA
  - dATP, ^{32}P-γ-Deoxyadenosintriphosphat, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, 3,3 µM NEN Dupont, Boston, USA
  - dCTP, ^{32}P-Deoxycytidintriphosphat, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, 3,3 µM NEN Dupont, Boston, USA
- Random-Primer, Megaprime® Translations-Kit, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Restriktionsenzyme, 5 U/µl Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- RNase A, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- RNAzol B®, Cinna/Biotecx, Laboratories INC. , Houston Texas, USA
- Salzsäure (HCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Sarstedt-Röhre, 13 ml mit Schraubverschluß, Nümbrecht, Deutschland
- Schüttelbank, TEQ Orbital Shaker Incubation, CLF analytische Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland
- Sequenase Sequenzierungs Kit®, USB, Cleveland, USA
- Shaker, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Silikon, Azetoxysilan 734, Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Sigma Chemical Co. , St. Louis, USA
- STE-Puffer:
  0,1 M NaCl
  10 mM Tris pH 7,8
  1 mM EDTA pH 8
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- Sterilfilter, einmal Filterhalterhalter, Rotrand 0,2 µm, steril, pyrogen, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- T4-DNA-Ligase, 1 Unit/µl, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- T4-Polynucleotid-Kinase, Promega Corporation, Madison, USA
- Taq-Polymerase, 5 Units/µl, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- Thermocycler, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland

- Tischzentrifuge, Eppendorf 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Trichloressigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris/EDTA (TE)-Puffer:
  0,01 M Tris, pH 7,6
  1 mM EDTA, pH 8,0
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), Sigma Chemical Co. , St. Louis, USA
- t-RNA, from Baker`s Yeast, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
- Trypsin certified 1:250 crude, Difco Laboratories, Lot 89568J4, Detroit, MI, USA
- Trypsinlösung:
  30 µg/ml Trypsin
  1% Penicillin / Streptomycin
  2,8 µg/ml DNase
  in CBFHH gelöst
- Tyrode-Lösung:
  119,8 mmol NaCl
  5,4 mM KCl
  1,05 mM $MgCl_2$
  1,8 mM $CaCl_2$
  0,42 mM NaH_2PO_4
  22,6 mM $NaHCO_3$
  0,28 mM Ascorbinsäure
  0,05 mM Na_2EDTA
  5,0 mM Glucose
  5,0 mM HEPES
  0,5 mM Titriplex III
  Begasung mit 95% O_2 / 5% CO_2; pH 7,4
- UV-Lampe 312 nm, Bachofer, Reutlingen, Deutschland
- UV-Photometer, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- UV-Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
- Videoanalyser 321, Colorado Video INC. , Colorado, USA
- Vortex Typ REAX 1, Heidolph, Deutschland

- Waage, PM480 DeltaRange®, Mettler Instruments, Giessen, Deutschland
- Waschpuffer, QIAquick Gel Extraktion Kit®, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- Wasserbad, GfL m. b. H. , Hannover-Vienhorst, Deutschland
- Xylencyanid, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
- Zellschaber, Greiner, Disposable Cell Scraper, steril, Frickenhausen, Deutschland
- Zellsieb, 0,5 µm CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co. St. Loius, Missouri USA:

2.11. Auswertung und Statistik

Die Auswertung der hybridisierten Northern Blots erfolgte durch Quantifizierung der Phosphorimagerplatten. Nach Abspeichern der Daten über "Tina 2.1" wurden die Dichtewerte mit dem Programm ZeroDscan quantifiziert und mit Microsoft Excel ausgewertet. Nach Subtraktion der Hintergrundwerte wurden Auftragungsungenauigkeiten durch Abgleich gegen die Signale der 18S-rRNA ausgeglichen. Anhand der parallel aufgetragenen drei Standard Werte für jeden Blot wurde eine Standardgerade erstellt, an der die Werte für die verschiedenen Bedingungen abgelesen wurden. Die Werte wurden als% der mitgeführten Standard-RNA berechnet. Aus den Doppelbestimmungen wurde das arithmetische Mittel gebildet, anschließend aus den verbleibenden vier Experimenten der Standardfehler (SEM) nach Formel 2 errechnet.

Formel 2: Standardfehler

$$\frac{\sqrt{\frac{n\sum \mathrm{x2} - (\sum \mathrm{x})2}{\mathrm{n(n-1)}}}}{\sqrt{n}}$$

Die Signifikanzen wurden anhand des Student`s-t-Testes für unverbundene Stichproben zwischen den einzelnen Gruppen berechnet. Ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Biometrische Daten der Tiere

Abbildung 7 zeigt das Ventrikelfeuchtgewicht der null bis drei (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 Monate; 2 M) Wistar-Ratten, die für die RNA-Präparationen verwendet wurden. Hierbei zeigte sich mit zunehmendem Alter ein signifikanter Anstieg des Ventrikelfeuchtgewichtes ($p<0,05$).

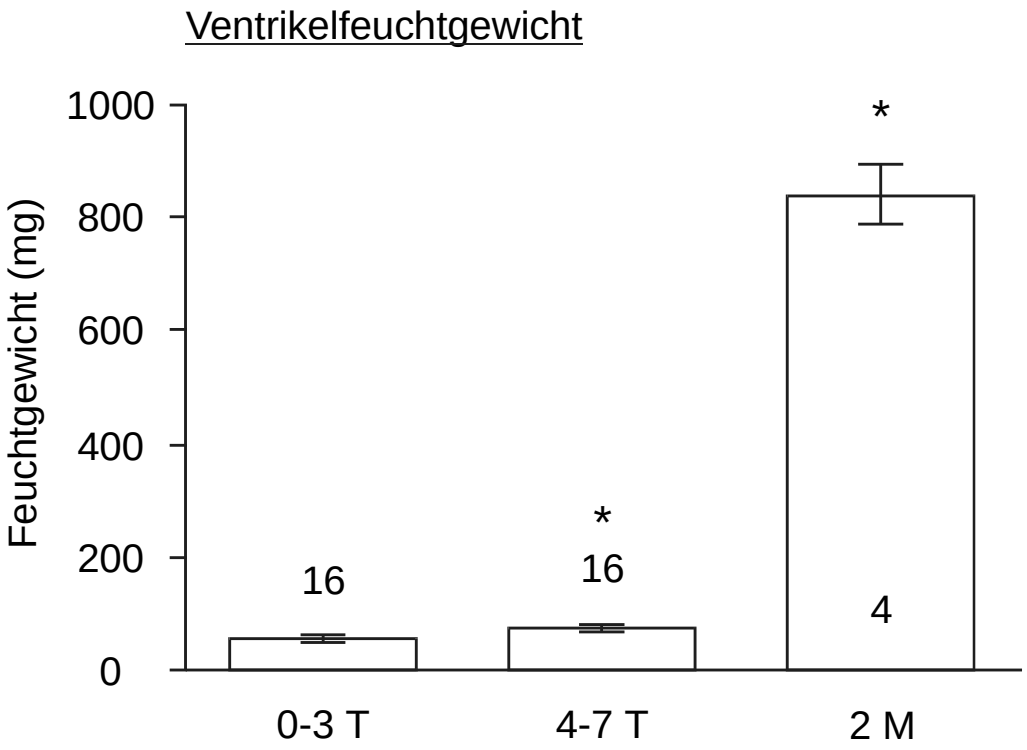


Abbildung 7: Ventrikelfeuchtgewichte in mg ± SEM von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) Rattenventrikeln. Die Zahlen in/über den Säulen entsprechen der Anzahl der Ventrikel. *$p<0,05$ vs. 0-3 T.

3.2. Frequenzanalyse

Die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten wurde wie unter 2.1.4. beschrieben untersucht. Die Daten von jeweils 7-8 Schalen sind in Abbildung 8 dargestellt. Am Tag nach der Präparation schlugen die Kardiomyozyten nicht spontan. Am zweiten Tag in Zellkultur schlugen die Zellen in den Kulturschalen im Mittel mit einer Frequenz von 79,2±15,4 min^{-1}. Bis zum sechsten Kulturtag steigerte sich die Frequenz täglich bis zu einem Maximalwert von 336,0±39,2 min^{-1}. Die Spontanfrequenz hielt sich auf diesem Niveau und änderte sich bis zum 10. Tag nicht mehr signifikant. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Originalabbildung einer Frequenzaufzeichnung einer Myozytenkultur an den Tagen 2, 3 und 4.

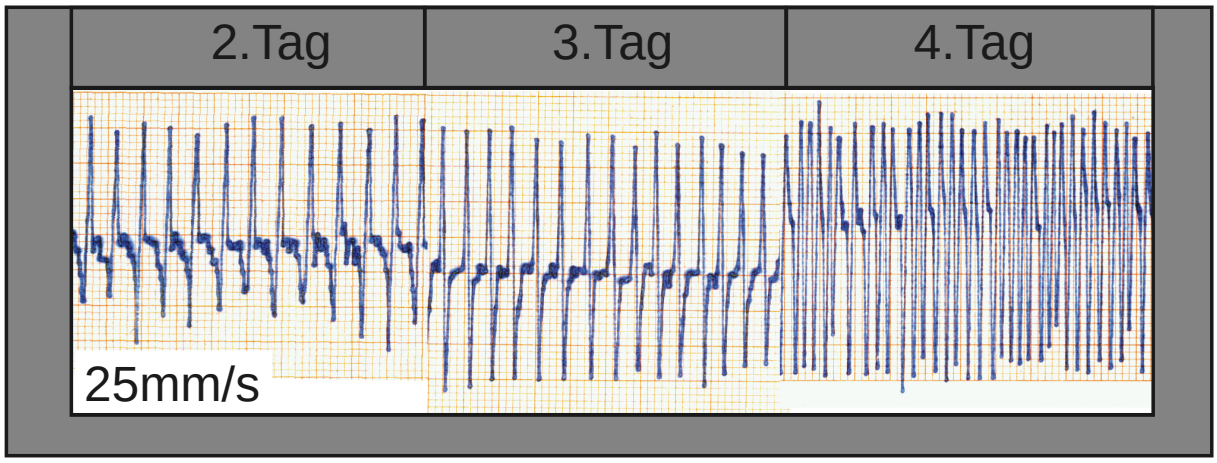


Abbildung 8: Originalabbildung der Frequenzaufzeichnungen an Kardiomyozyten in Zellkultur an den Kulturtagen 2, 3 und 4.

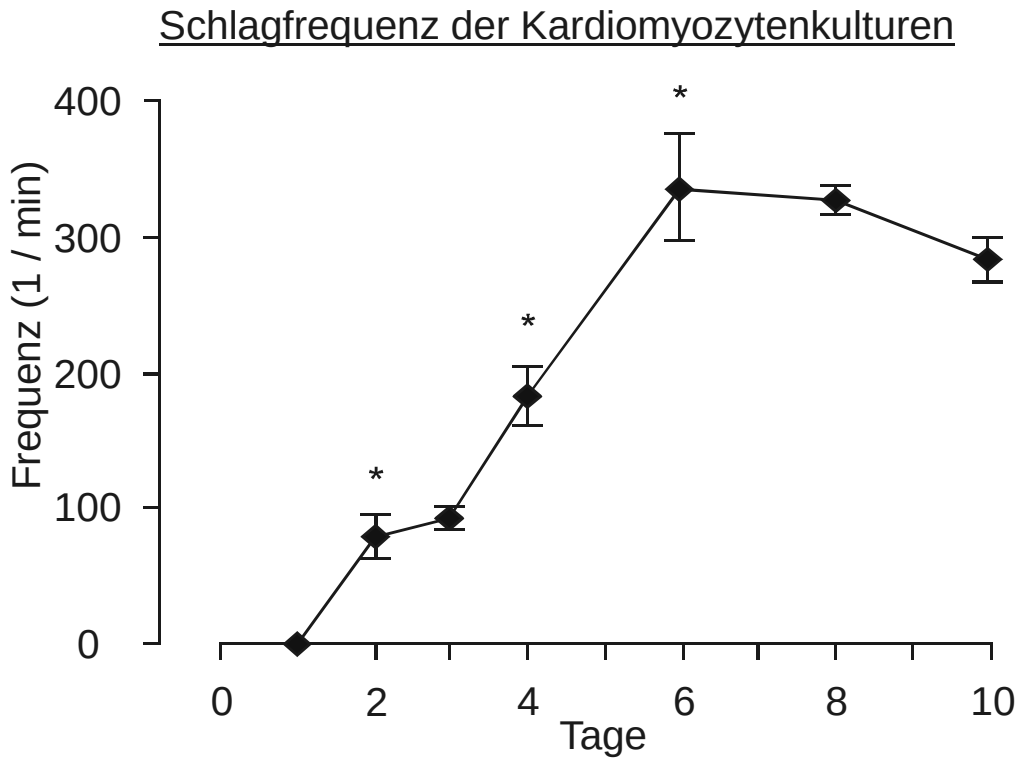


Abbildung 9: Schlagfrequenzen von neonatalen Kardiomyozyten in Kultur ± SEM über 10 Kulturtage. n=7-8, *p<0,05 vs. Vortag.

3.3. RNA-Präparation

3.3.1. RNA-Präparation aus dem Gewebe

Die RNA wurde wie in 2.4. beschrieben präpariert und die Ausbeute bezogen auf das Feuchtgewicht berechnet. In neonatalen und in 4-7 Tage alten Ventrikeln betrug die Ausbeute 1,8±0,2 ‰ und 2,1±0,1 ‰ (n=16). In erwachsenen Ventrikeln war die Ausbeute mit 1,2±0,1 ‰ signifikant niedriger ($p<0,05$, n=4, Abbildung 10 A). Der Quotient der OD 260/280 lag bei allen Präparationen über 2,0.

3.3.2. RNA-Präparation der Zellkultur

Um den RNA-Gehalt in den Zellen über die Kulturdauer zu untersuchen, wurde die RNA wie in 2.4 beschrieben präpariert (Abbildung 10 B). Frisch isolierte Zellen hatten eine Ausbeute von 3,2±0,3 µg RNA pro 10^6 Zellen (n=12). Diese Ausbeute erhöhte sich signifikant ($p<0,05$) bei den drei Tage alten Zellkulturen auf 4,9±0,7 µg RNA (n=12) und bis zum zehnten Tag auf 5,9±0,9 µg RNA pro 10^6 Zellen (n=12, $p<0,01$). Der Quotient der OD 260/280 aller Präparationen lag im Durchschnitt bei 1,94±0,02.

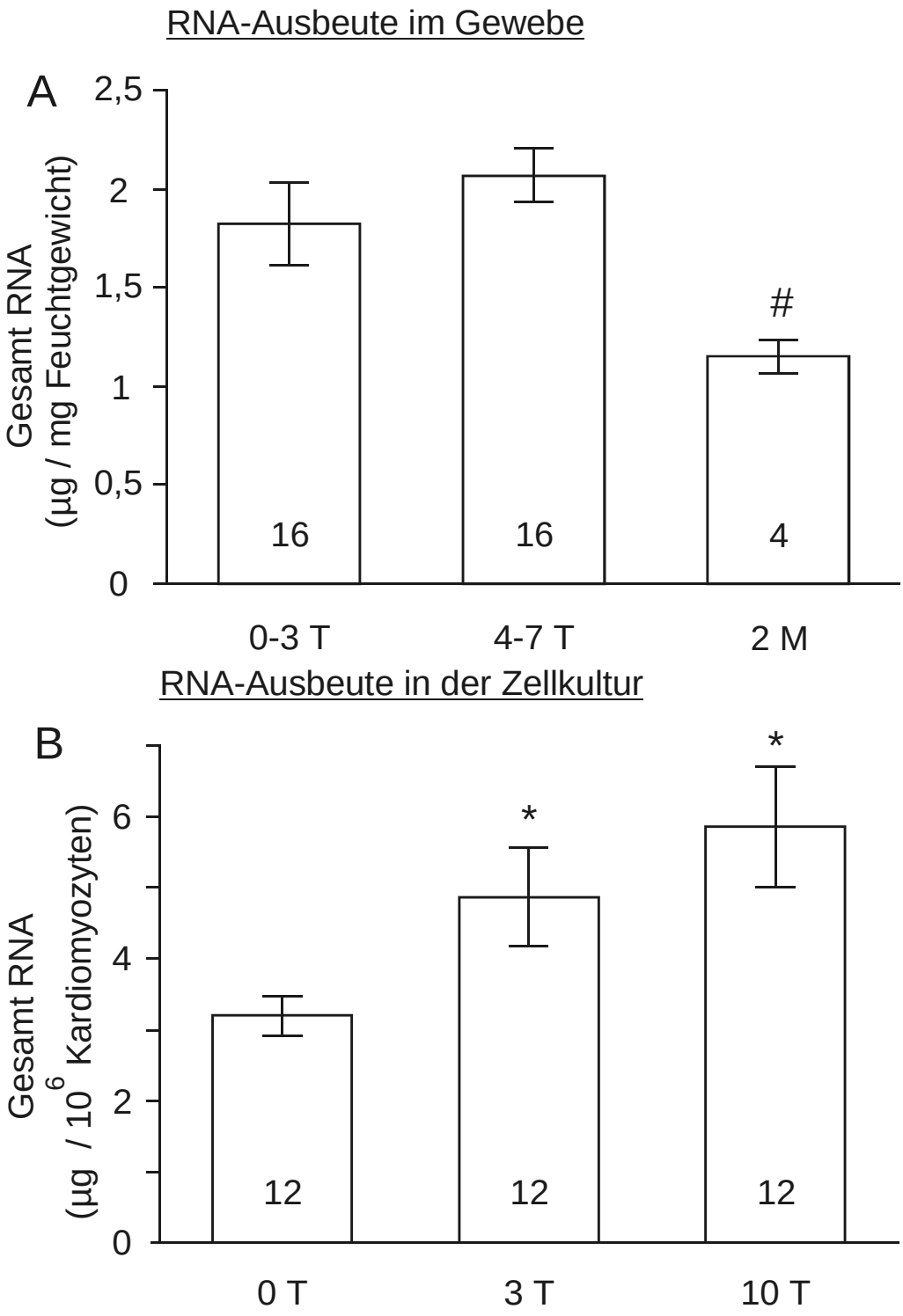


Abbildung 10: RNA-Ausbeute von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) in ‰ des Feuchtgewichts des eingesetzten Gewebes (#$p<0,05$ vs. 4-7 T) und (B) aus isolierten Kardiomyozyten nach der Isolation (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen, dargestellt in µg RNA pro 10^6 Zellen (*$p<0,05$ vs. 0 T). Die Nummern in den Säulen entsprechen der Anzahl der Ventrikel bzw. der Kulturschalen. Alle Angaben ± SEM.

3.4. Zellkernzählung

Die Zellkerne wurden nach 0, 3 und 10 Kulturtagen wie unter 2.5.2 beschrieben gezählt und mit der Zahl der eingesetzten kultivierten Myozyten verglichen. Es ergaben sich rechnerisch 1,2±0,1 Zellkerne/Zelle (0 Tage, n=5), 1,2±0,1 Zellkerne/Zelle (3 Tage, n=6) und 1,0±0,1 Zellkerne/Zelle (10 Tage, n=7). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Zahl der eingesetzten Myozyten gut mit der Anzahl der Zellen in den Kulturschalen der Kultivierung übereinstimmte.

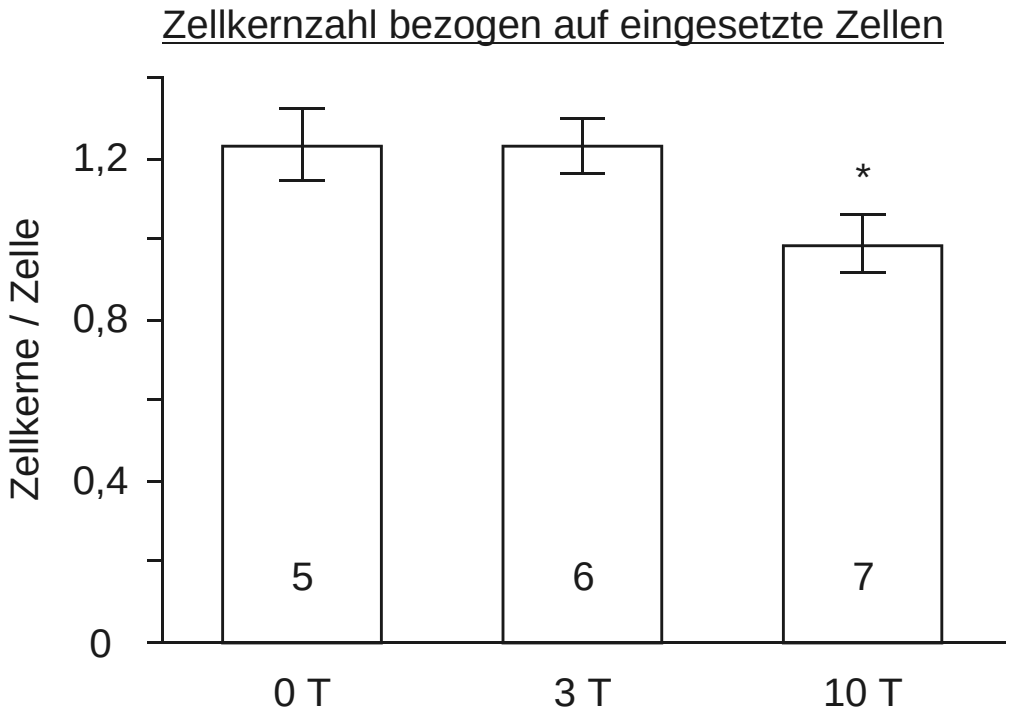


Abbildung 11: Zahl der Zellkerne bezogen auf die Zahl der eingesetzten Kardiomyozyten unmittelbar nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der jeweiligen Anzahl an Zellkulturschalen. *p<0,05 vs. 0 T und 3 T.

3.5. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde wie unter 2.5.1 beschrieben gemessen. Es ergab sich bezogen auf die Zahl der ursprünglich eingesetzten Zellen ein Proteingehalt von 563,6 ± 67,2 pg / Zelle (0 Tage), 98,2 ± 16,2 pg / Zelle (3 Tage) und 68,7 ± 20,3 pg / Zelle (10 Tage) (Abbildung 12). Der Proteingehalt der drei und zehn Tage alten Zellen war signifikant niedriger als am ersten Präparationstag ($p<0,05$).

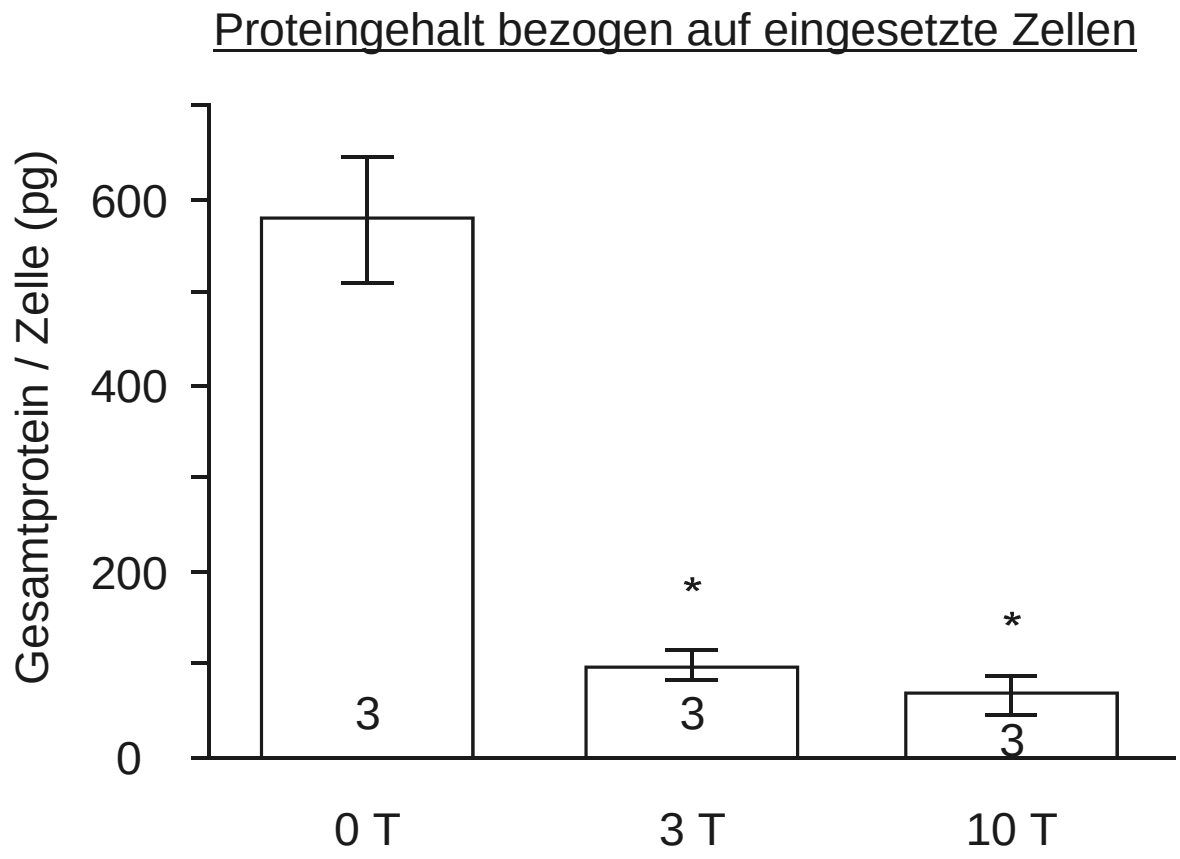


Abbildung 12: Gesamtprotein pro Einzelzelle in pg ± SEM aus isolierten Kardiomyozyten nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der jeweiligen Anzahl an Zellkulturschalen. *$p<0,05$ vs. 0 T.

3.6. Expressionsanalysen

Alle untersuchten Gene waren im Gewebe sowohl in den verschiedenen Altersstufen, als auch in der Monolayerkultur zu den verschiedenen Zeitpunkten durch die RNA-Hybridisierung nachweisbar (Abbildung 13).

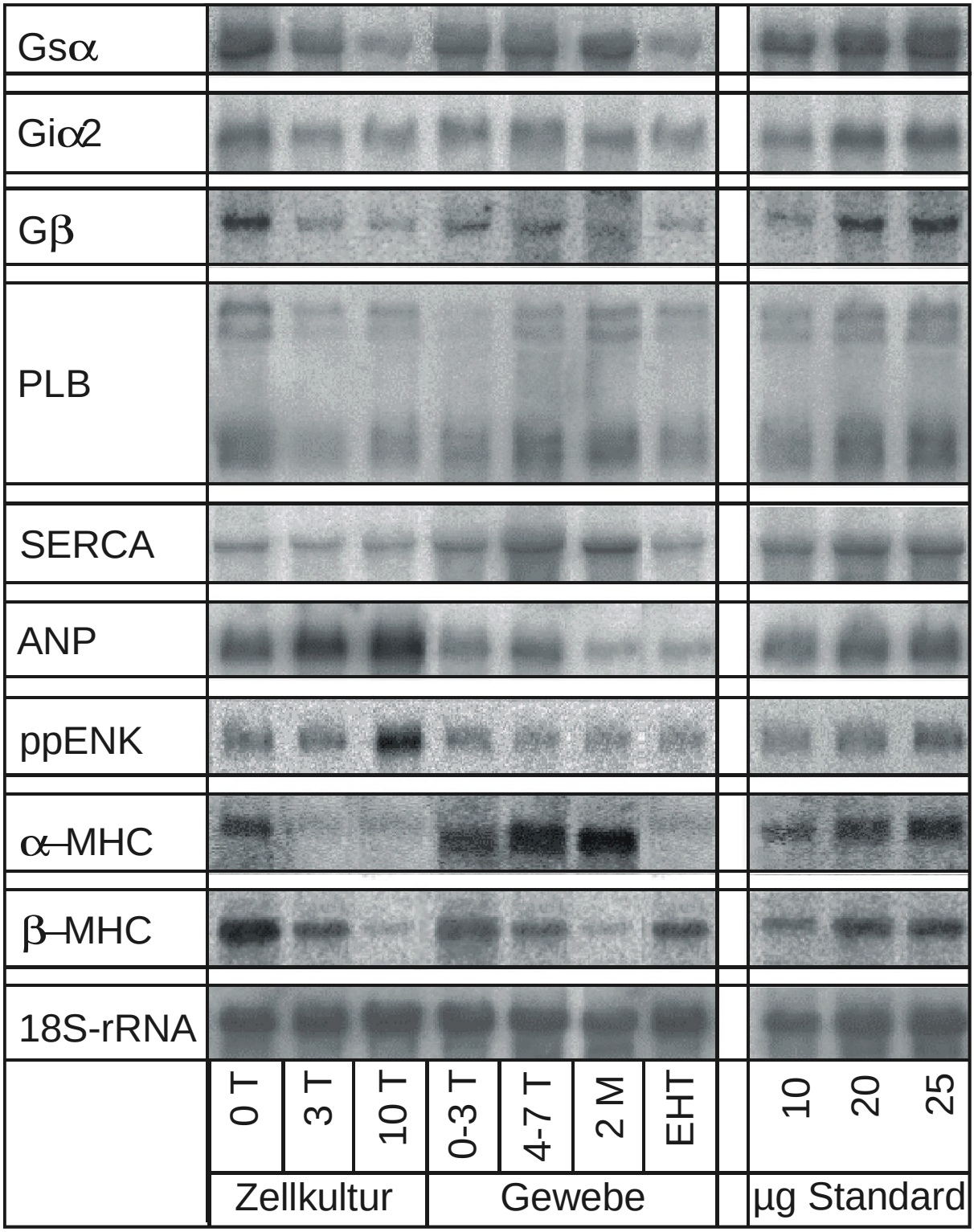


Abbildung 13: Phosphoimagerbild repräsentativer Blots aller untersuchten Gene in der Monolayerkultur zu den Zeitpunkten 0, 3 und 10 Tagen, im Gewebe von 0-3, 4-7 Tage und 2 Monate alten Ratten, und im rekonstituiertem Gewebe (EHT). Zum Vergleich ist die Standard-RNA (10, 20 und 25 µg) abgebildet.

3.6.1. 18S-ribosomale RNA

Zunächst wurde die Expression der 18S-ribosomalen RNA untersucht, auf die die Expression der anderen Gene bezogen werden sollte (siehe 2.11). Die Daten sind in Abbildung 14 dargestellt. Weder in der Zellkultur über die gesamte Kulturdauer noch im intakten Ventrikelgewebe zu den verschiedenen Alterszeitpunkten zeigten sich signifikante Unterschiede im relativen Gehalt der 18S-rRNA (n=4). Auch die EHTs unterschieden sich bezüglich des 18S-rRNA-Gehaltes nicht signifikant von den Monolayerkulturen und den intakten Geweben.

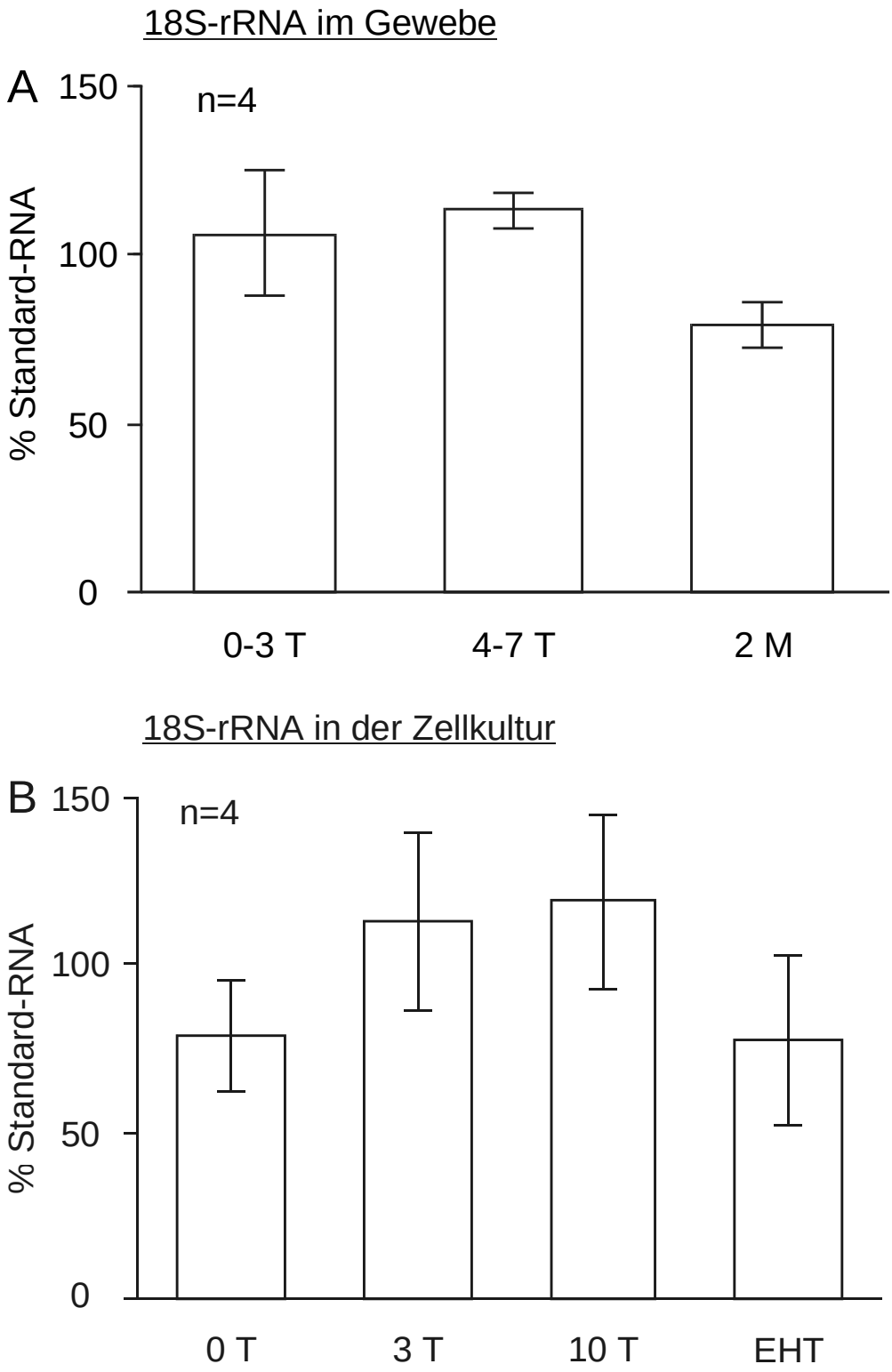


Abbildung 14: Gehalt der 18S-ribosomalen RNA, gemessen durch Northern Blot Analyse, von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) in % der Standard-RNA ± SEM und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM.

3.6.2. Giα-2

Von den heterotrimeren G-Proteinen wurde die Expression der α-Untereinheiten eines stimulatorischen (Gsα) und eines inhibitorischen (Giα2) G-Proteins sowie die β-Untereinheit (Gβ) untersucht. Abbildung 15 zeigt die mRNA-Expression der drei G-Protein Untereinheiten. Vergleicht man für die mRNA-Expression von Giα2 die verschiedenen Altersstufen des intakten Ventrikels, so fanden sich keine Unterschiede. Dagegen fand man in den frisch isolierten Myozyten einen etwa 2,5fach höheren Giα2-Gehalt als in dem 0-3 Tage alten intakten Ausgangsgewebe. Nach drei und zehn Tagen unter Kulturbedingungen war das Expressionsniveau wieder mit dem des Ausgangsgewebes vereinbar. Die Expression von Giα2 in den EHTs war signifikant niedriger als in den Kardiomyozyten zum Zeitpunkt der Isolierung, aber nicht unterschiedlich von dem gleich alten Ventrikelgewebe und den Kardiomyozyten im Monolayerkulturen.

3.6.3. Gsα

In der Abbildung 15 wird in den schwarzen Säulen die Expression der α-Untereinheit des stimulierenden G-Proteins dargestellt. Die Expression der Gsα-mRNA verlief in allen Gruppen parallel mit der Expression von Giα2. In den verschieden alten intakten Ventrikeln fand sich kein Unterschied der Gsα-mRNA. In der Zellkultur war die Expression der mRNA von Gsα direkt nach der Zellisolierung signifikant höher (135±41% Standard-RNA) als nach drei und zehn Kulturtagen (67±22% Standard-RNA und 40±13% Standard-RNA, $p<0,05$, $n=4$) und als im Ausgangsgewebe (61±8% Standard-RNA). Die Expression in den EHTs war wieder niedriger als in den Kardiomyozyten unmittelbar nach der Isolierung und vergleichbar mit den Ventrikeln und den drei bzw. zehn Tage alten Kulturen.

3.6.4. Gβ

Auch die Expression der β-Untereinheit war in den verschiedenen Gruppen vergleichbar mit der von Giα2 und Gsα (Abbildung 15). Auch hier war kein Unterschied in den verschiedenen intakten Ventrikeln zu sehen. In den frisch isolierten Kardiomyozyten war auch für Gβ der mRNA-Gehalt ca. 3fach höher als im 0-3 Tage alten Ventrikel ($p<0,05$, $n=4$). Diese höhere Expression fand sich ebenfalls nicht mehr nach drei bzw. zehn Tagen in Kultur als Monolayer und auch nicht in den EHTs.

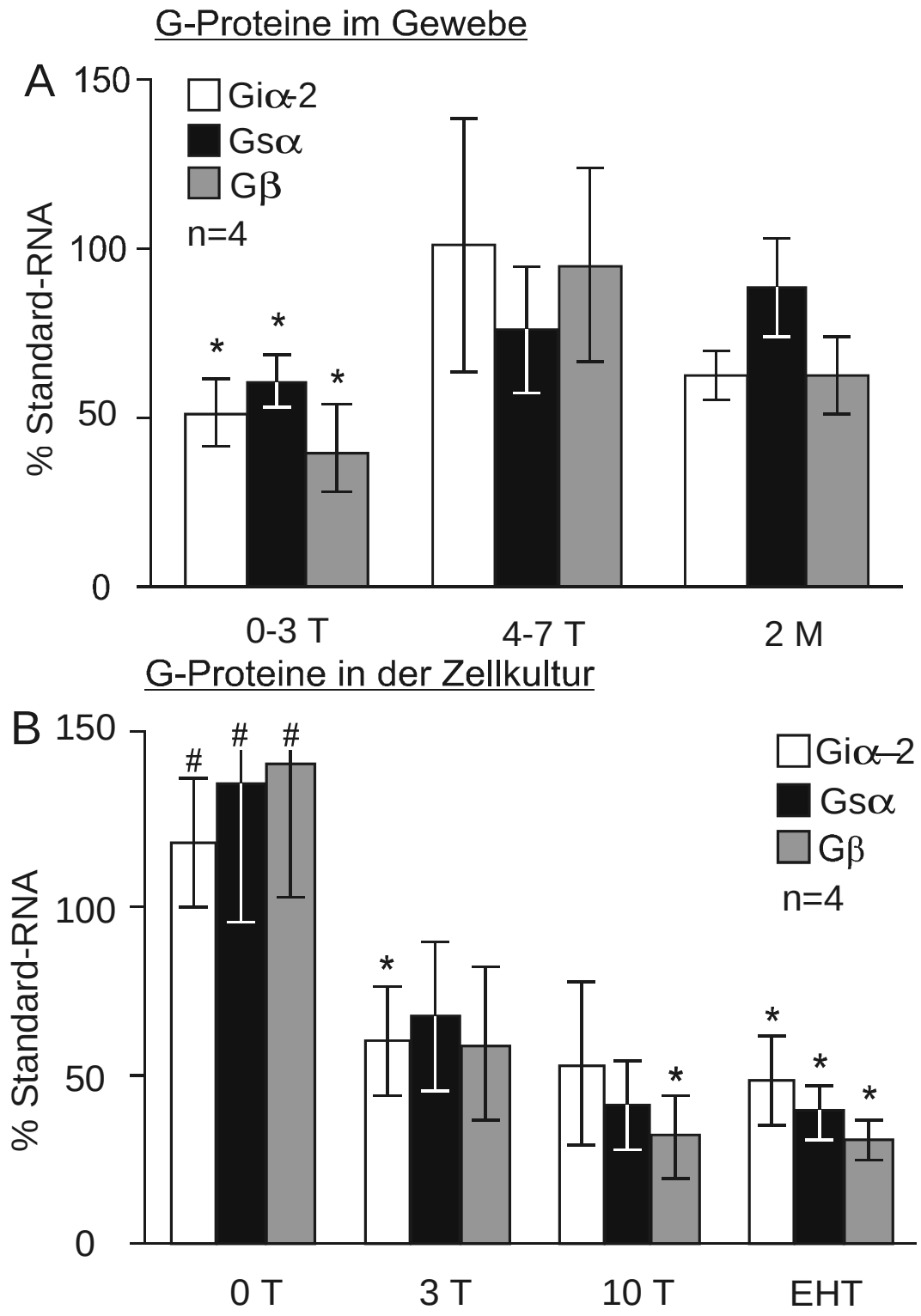


Abbildung 15: Giα-2, Gsα und Gβ mRNA-Gehalt, gemessen durch Northern Blot Analyse, von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M), intakten Rattenventrikeln (A) in % der Standard-RNA ± SEM und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM (*p<0,05 vs. 0 T, #p<0,05 vs. 0-3 T).

3.6.5. SERCA

Von den Proteinen, die an der Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration durch das sarkoplasmatischen Retikulum beteiligt sind, wurde der mRNA-Gehalt von SERCA und von PLB untersucht.

Für SERCA zeigte sich innerhalb weniger Tage nach der Geburt eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression um ca. 50%. Nach zwei Monaten erreichte die SERCA mRNA das 4-5fache des Niveaus der neonatalen Ratten. In der zweidimensionalen Kardiomyozytenkultur lag der mRNA-Gehalt in den frisch isolierten Zellen etwa doppelt so hoch wie nach drei Kulturtagen (58±8% vs. 28±4% der Standard-RNA, $p<0,05$, $n=4$) bzw. nach zehn Tagen. Auch in den EHTs fand sich mit 17,7±4,1% der Standard-RNA ein signifikant niedrigerer SERCA-mRNA-Gehalt als in den frisch isolierten Zellen ($p<0,05$, $n=4$). Weder die Zellen in Monolayerkultur noch die in den EHTs zeigten eine Zunahme der Expression wie im intaktem Gewebe ($p<0,05$ vs. 4-7 T und 2 M).

3.6.6. PLB

Die Expression von Phospholamban, das die SERCA reguliert, verhielt sich in der zweidimensionalen Kultur im untersuchten Zeitraum entgegengesetzt im Vergleich zum Gewebe. In Abbildung 16 ist die mRNA-Expression von Phospholamban im intakten Myokard und in den isolierten Zellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen abgebildet. Die Expression von PLB verhielt sich ähnlich wie die von SERCA. Im intakten Ventrikelgewebe kam es innerhalb weniger Tage zu einem signifikanten Anstieg im PLB-mRNA-Gehalt von 35±5% (0-3 Tage) auf 84±15% Standard-RNA (4-7 Tage), $p<0,01$, $n=4$. Anders als bei SERCA stieg die PLB Expression bis zum Alter von zwei Monaten nicht weiter an. In der zweidimensionalen Zellkultur war die Expression, wie bei SERCA, nach drei bzw. zehn tägiger Kulturdauer weniger als halb so hoch wie in den frisch isolierten Myozyten. Unter keiner der untersuchten Kulturbedingungen kam es zu einem Anstieg der Expression wie im intakten Gewebe (<0,05 vs. 4-7 T und vs. 2 M, $n=4$). Auch die EHTs wiesen mit 27±12% der Standard-RNA einen niedrigeren mRNA-Gehalt auf.

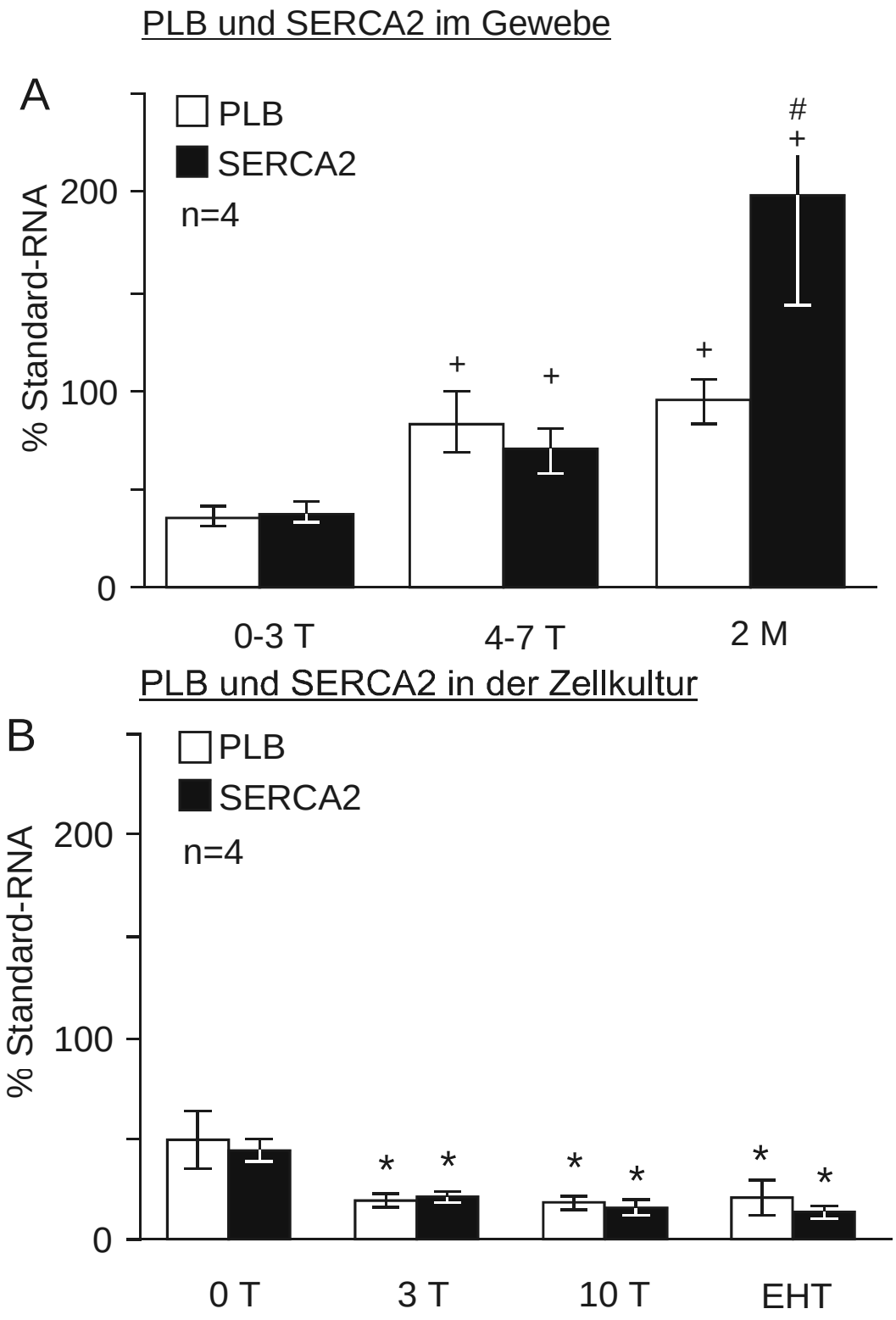


Abbildung 16: Phospholamban- und SERCA2-mRNA-Gehalt, gemessen durch Northern Blot Analyse, von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) in % der Standard-RNA ± SEM (+p<0,05 vs. 0-3 T, #p<0,05 vs. 4-7 T) und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM (*p<0,05 vs. 0 T).

3.6.7. Quotient aus PLB / SERCA

Der Quotient der mRNA-Expression der SERCA und ihres Inhibitors, PLB, wurde in der Literatur als ein gut messbarer Parameter für die diastolische Ca^{2+} Aufnahmefähigkeit des sarkoplasmatischen Retikulums verwendet. Abbildung 17 zeigt den Quotienten der relativen mRNA-Expression von Phospholamban und SERCA. Da der Quotient aus relativen Daten errechnet wurde (sowohl für PLB als auch für SERCA der prozentuale Anteil bezogen auf die Standard-RNA), handelt es sich bei dem hier angegebenen Quotienten um ein relatives Verhältnis, das nur zum Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen dienen kann. Über das absolute Verhältnis der PLB und SERCA-Expression lassen die Daten keine Rückschlüsse zu. Die gefundenen Daten können auch nur Hinweise auf das Verhältnis geben, da nicht in jedem Fall der Proteingehalt dem mRNA-Gehalt folgt. Des weiteren ist die Ca^{2+}-Aufnahme natürlich nicht nur von den PLB- und SERCA-Proteinkonzentrationen abhängig. Der Quotient aus der PLB zur SERCA mRNA-Expression war in den isolierten Myozyten unter allen untersuchten Kulturbedingungen als Monolayer oder EHT gleich. Dagegen war im intakten Gewebe im Alter von zwei Monaten der PLB/SERCA Quotient signifikant niedriger als in den neonatalen und den vier bis sieben Tage alten Ventrikeln ($0,5\pm0,1$ vs. $1,0\pm0,2$ bzw. $1,3\pm0,2$, $p<0,05$, $n=4$).

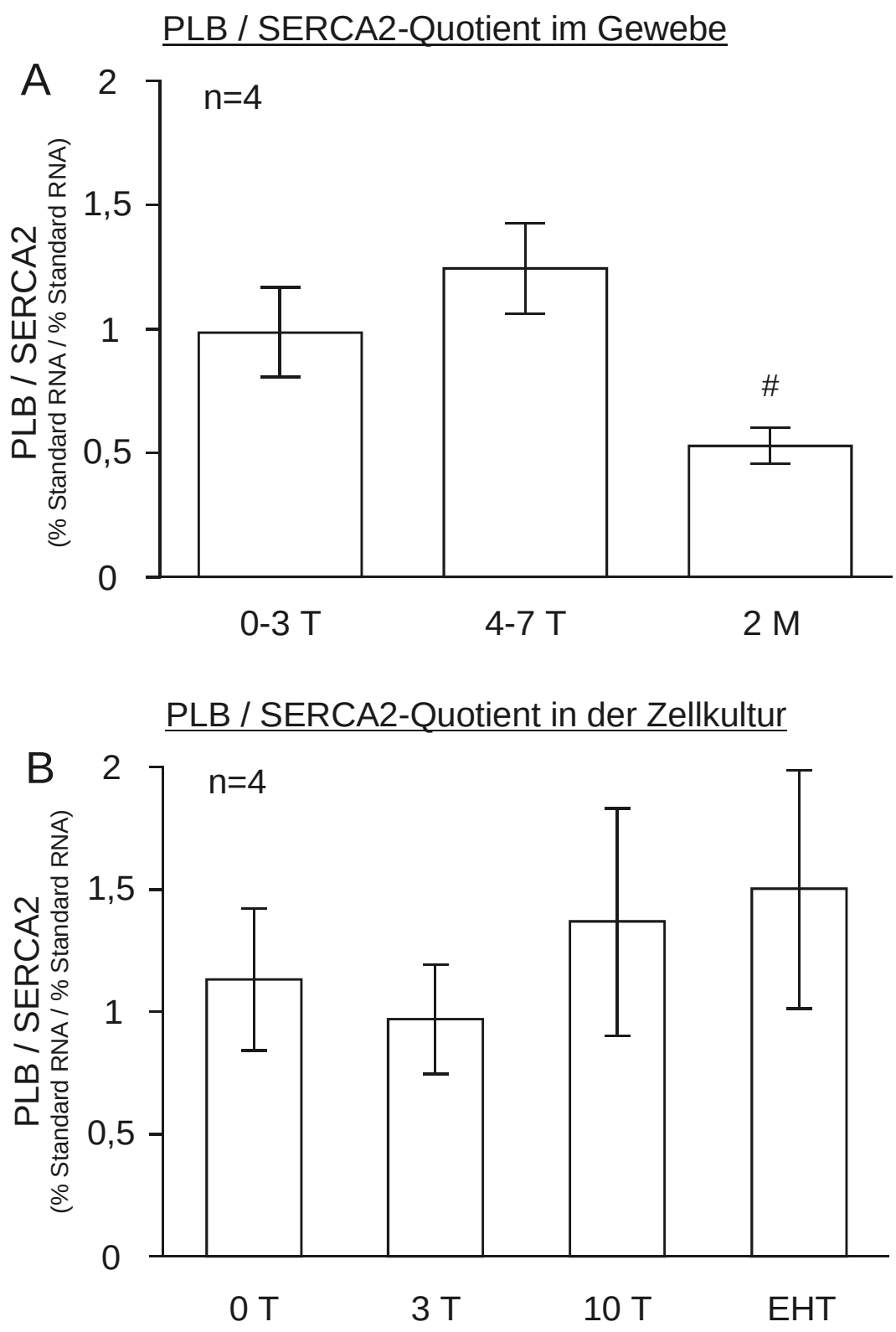


Abbildung 17: Phospholamban-SERCA2-mRNA-Quotient von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen und im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA / % der Standard-RNA ± SEM (#p<0,05 vs. 0-3 T und 4-7 T, n=4).

3.6.8. α- und β-MHC Isoformen

Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sind beide Isoenzyme mit den verwendeten Methoden in der Kardiomyozyten Monolayerkultur, im intakten Ventrikelgewebe und in den rekonstituierten Geweben gut nachweisbar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Im intakten Ventrikelgewebe kam es im Verlauf des Untersuchungszeitraumes zu einer signifikanten Abnahme im β-MHC mRNA-Gehalt (157±73% der Standard-RNA bei den neonatalen und 11±2% der Standard-RNA bei den zwei Monate alten Ventrikeln, $p<0,05$, $n=4$). Anders verlief die Expression von α-MHC, die im Verlauf der Entwicklung nicht abnahm. Die mRNA-Expression der β-MHC-Isoform nahm in der zweidimensionalen Zellkultur signifikant ab ($p<0,05$, $n=4$). Für die α-MHC Isoform verlief die Expression parallel zu der von β-MHC, doch ergab sich aufgrund der großen Streuung zum Zeitpunkt 0T keine Signifikanz. In den rekonstituierten Geweben war der β-MHC mRNA-Gehalt signifikant niedriger ($p<0,05$, $n=4$) als in den frisch isolierten Zellen und war vergleichbar mit dem Gehalt in der Monolayerkultur. α-MHC war in den EHTs kaum noch nachweisbar (13±4% der Standard-RNA).

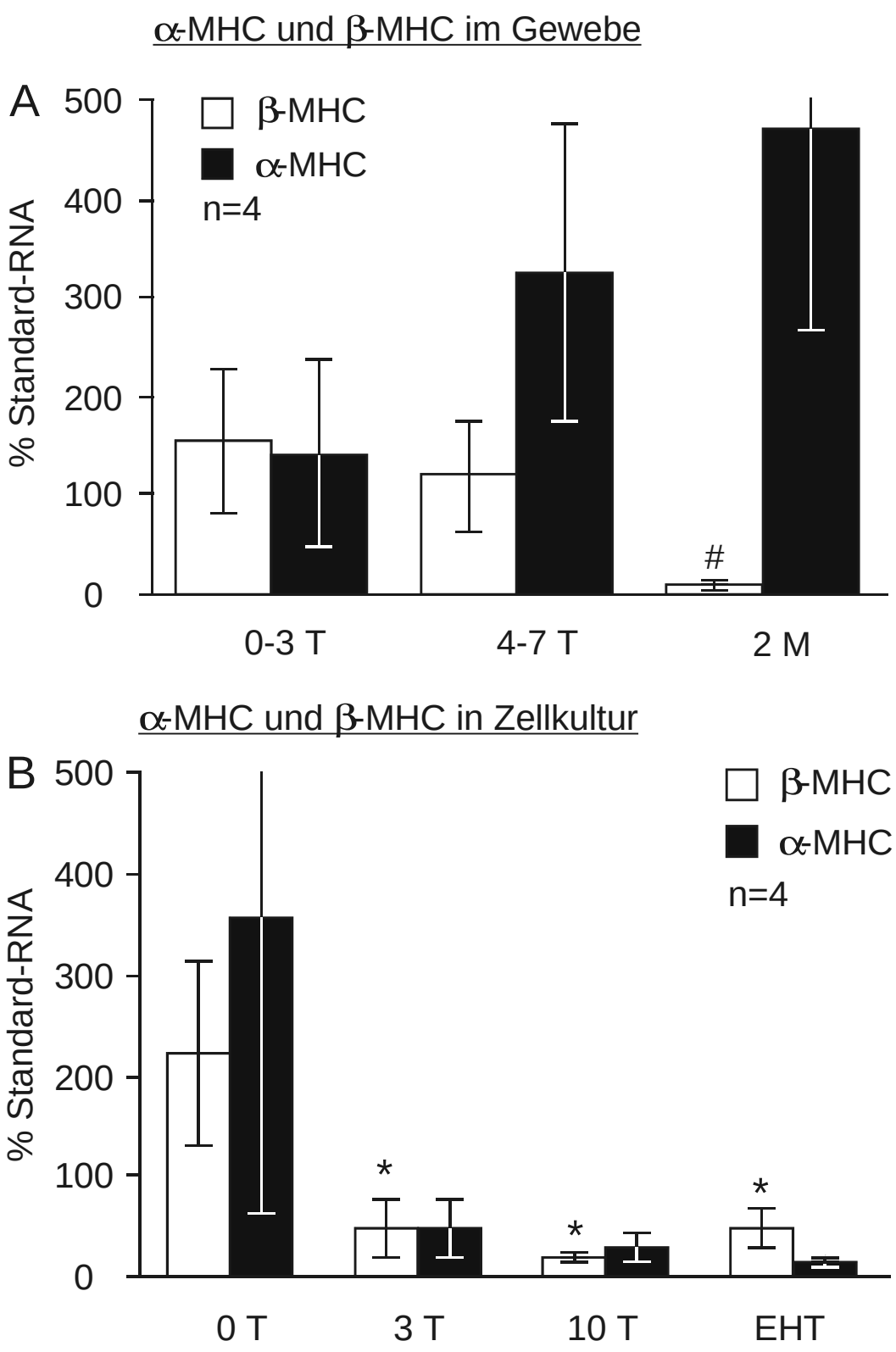


Abbildung 18: α- und β-MHC-mRNA-Gehalt, gemessen durch Northern Blot Analyse von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM (*p<0,05 vs. 0 T).

3.6.9. Quotient aus β-MHC / α-MHC

Das Verhältnis zwischen der β-MHC und der α-MHC Expression wurde untersucht als Marker für Hypertrophie. Abbildung 19 fasst den Quotienten für die verschiedenen Bedingungen zusammen. Dabei handelt es sich wie beim Quotienten aus PLB und SERCA nicht um ein absolutes sondern nur um ein relatives Verhältnis zum Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen. Im Ventrikelgewebe kam es mit zunehmendem Alter zu einer signifikanten Reduktion des β-/α-Verhältnisses. Der Quotient von 1,8±0,4 in den neonatalen und 1,0±0,3 in den vier bis sieben Tagen alten Geweben war signifikant höher als der Quotient von 0,1±0,1 nach zwei Monaten ($p<0,05$, $n=4$). Den größten Quotienten zeigten die EHTs (4,2±1,5). Er war signifikant höher als in den zwei Monate alten Ventrikeln ($p<0,01$), den zehn Tage alten zweidimensionalen Kulturen ($p<0,05$) und den neonatalen Ventrikeln ($p<0,05$).

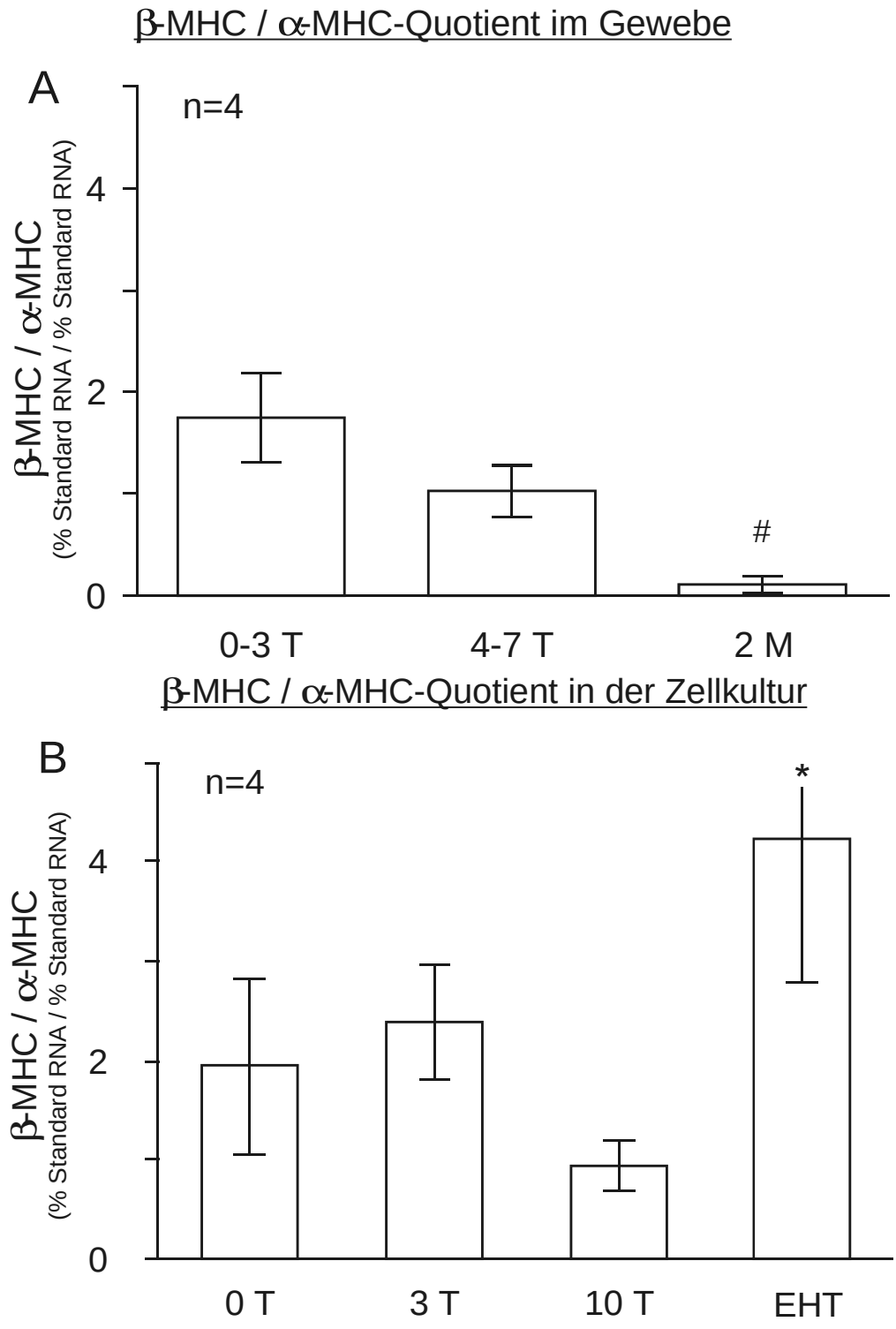


Abbildung 19: Verhältnis des β- und α-MHC mRNA-Gehaltes, gemessen durch Northern Blot Analyse von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) und aus Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen und im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA / % der Standard-RNA ± SEM (#p<0,05 vs. 0-3 T und 4-7 T, *p<0,05 vs. 10 T und 0-3 T).

Die mRNA sowohl für ANP als auch für ppENK wird im Rahmen einer myokardialen Hypertrophie gesteigert. Beide mRNAs kodieren für Proteine oder Peptide, die nach extrazellulär sezerniert werden.

3.6.10. ANP

Abbildung 20 zeigt in den schwarzen Säulen die ANP-Expression in zweidimensionaler Zellkultur und im intakten Ventrikelgewebe. ANP mRNA konnte im intakten Rattenventrikel mit dem Northern Blot nachgewiesen werden. Im Verlauf des Alterungsprozesses kam es dabei nicht zu signifikanten Veränderungen der Expression. In den isolierten Myozyten lag der ANP mRNA-Gehalt unmittelbar nach der Präparation über doppelt so hoch als im 0-3 T alten Ausgangsgewebe (104±29% der Standard-RNA vs. 39±5% der Standard-RNA, $p<0,05$, $n=4$). Während der Kultivierung als Monolayer stieg das ANP noch weiter auf das 6-7 fache der 0-3 T Werte an. Im Gegensatz dazu war das Expressionsniveau in den EHTs nicht anders als im intaktem Gewebe (30±9% der Standard-RNA). Dies war signifikant weniger als in den Monolayer Zellkulturen ($p<0,05$ vs. 10 T).

3.6.11. ppENK

Als zweite mRNA für sekretorische Proteine und Peptide wurde die Expression von Präproenkephalin in Geweben und in Monolayerkulturen untersucht. Die Daten sind in Abbildung 20 als weiße Säulen dargestellt. Die Expression von ppENK verlief im wesentlichen parallel zu der des ANP. Keine Unterschiede wurden im Gewebe zu den verschiedenen Alterspunkten gefunden. Der ppENK-mRNA-Gehalt unmittelbar nach der Isolierung entsprach dem Gehalt der neonatalen Ventrikel. In der Monolayerkultur kam es dagegen zu einem Anstieg der Expression, die nach drei Tagen mit dem 3-4fachen des Ausgangswertes das Maximum erreichte. In den EHTs wurde mit 19±5% der Standard-RNA der insgesamt niedrigste mRNA-Gehalt gefunden. Das war vergleichbar mit dem intakten Gewebe und war signifikant weniger als in den drei und zehn Tage alten Monolayerkulturen ($p<0,05$, $n=4$).

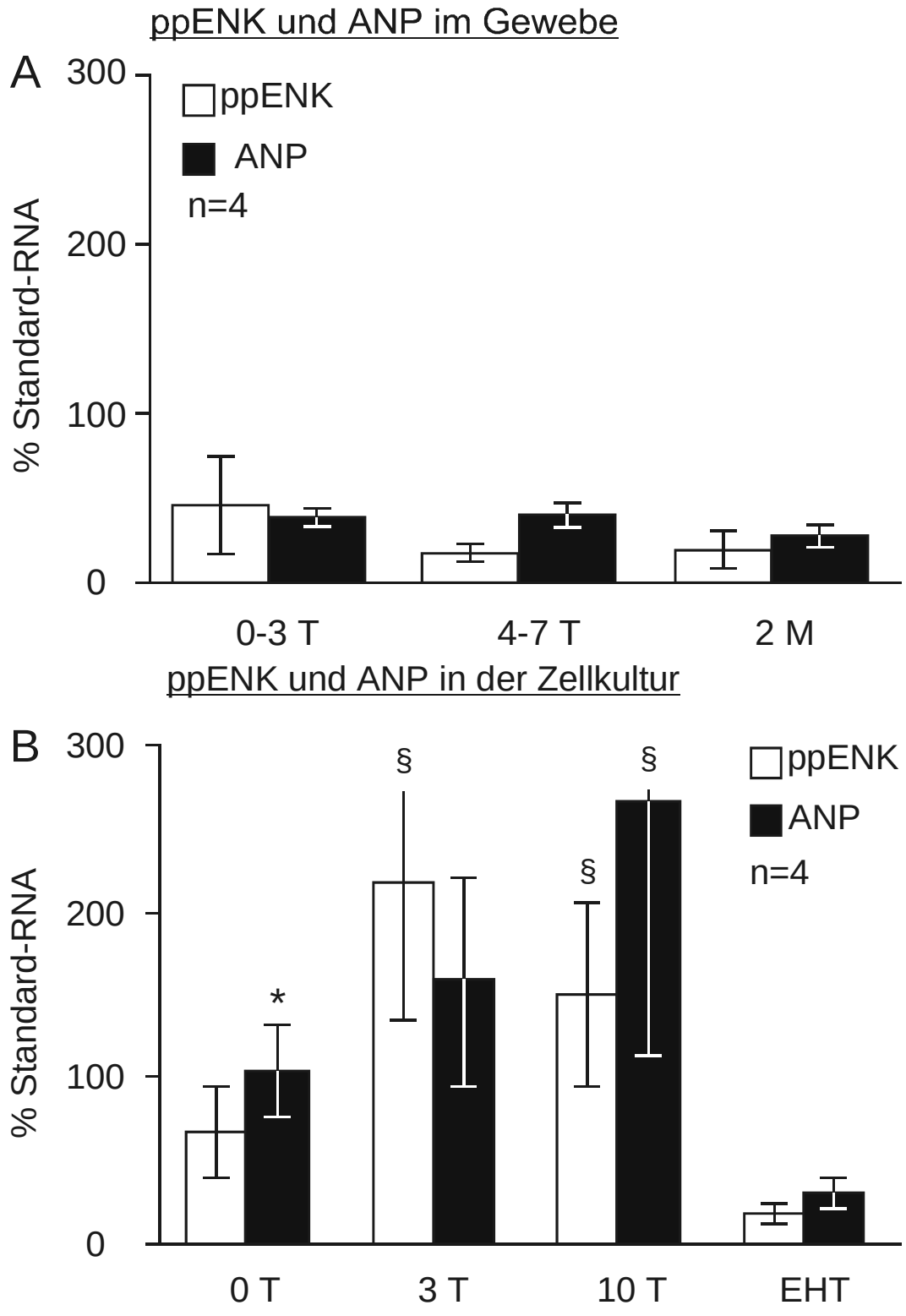


Abbildung 20: ANP und ppENK-mRNA-Gehalt, gemessen durch Northern Blot Analyse von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M) intakten Rattenventrikeln (A) und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolierung (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM (*$p<0,05$ vs. 0-3 T, §$p<0,05$ vs. EHTs).

3.6.12. Korrelation der ANP- mit der ppENK-Expression

Um zu untersuchen, ob es Hinweise für eine gemeinsame Regulation der Expression von ANP und ppENK gibt, wurde für alle Einzeldaten der Expressionen unter allen Bedingungen eine Korrelation gebildet. Abbildung 21 zeigt die Korrelation für die Messwerte über alle Kulturbedingungen und der Gewebe zu den verschiedenen Alterszeitpunkten. Es ergab sich eine signifikante Korrelation der Expression beider Gene auf mRNA Ebene.

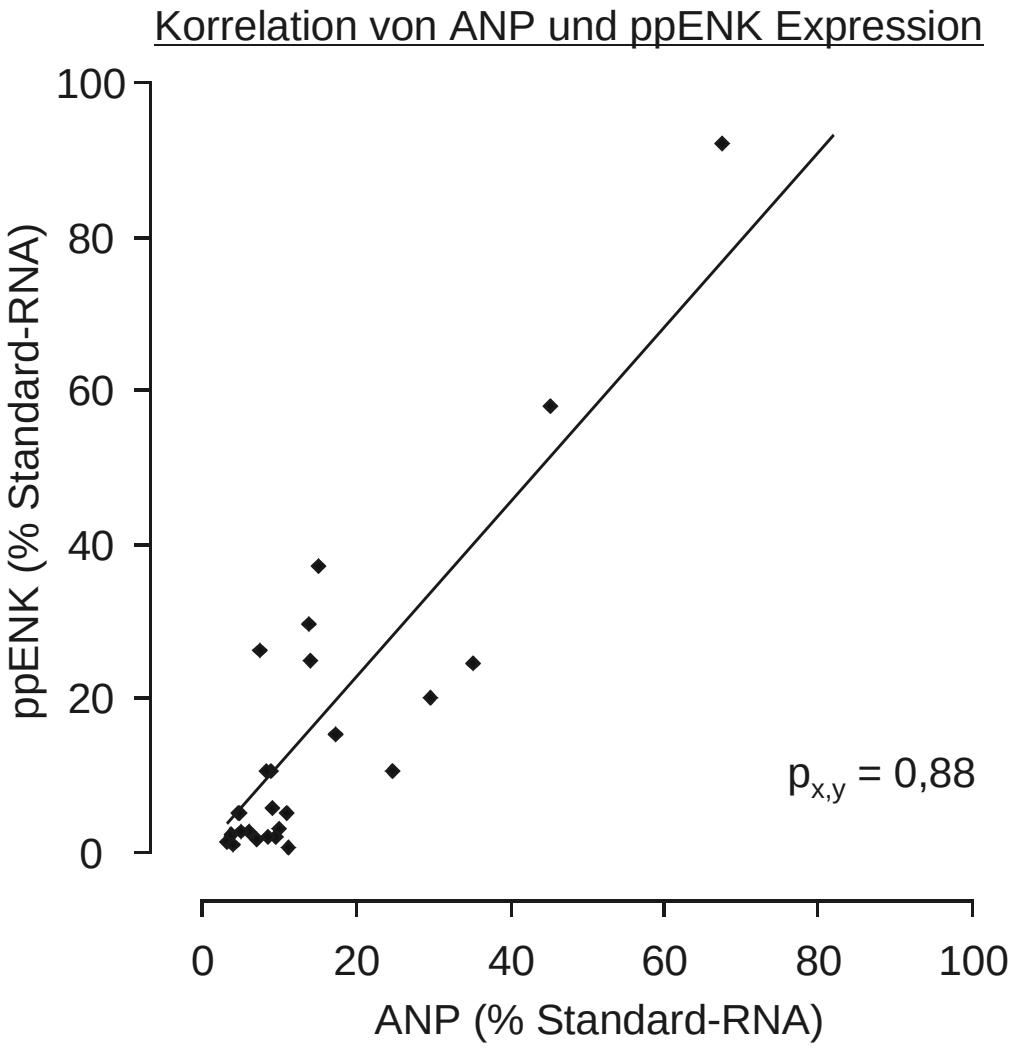


Abbildung 21: Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt von ANP und ppENK unter allen untersuchten Bedingungen (0 T, 3 T, 10 T, EHTs und für die Gewebe 0-3 T, 4-7 T, 2 M). Auf der Ordinate ist der mRNA-Gehalt von ppENK in % Standard-RNA dargestellt, auf der Abszisse der mRNA-Gehalt von ANP in % Standard-RNA aufgetragen. P_{xy} bezeichnet den Korrelationskoeffizienten.

3.6.13. VEGF

Zuletzt wurde VEGF untersucht, das für die Regulation des Wachstums von Gefäßen von Bedeutung ist. Abbildung 22 zeigt die Expression von VEGF im Gewebe und in zweidimensionaler Zellkultur unter allen untersuchten Bedingungen. Das niedrigste Expressionsniveau fand sich im neonatalen Gewebe (25±5% der Standard-RNA). Im Verlauf der physiologischen Alterung stieg die VEGF Expression signifikant an (zwei Monate: 74±15% Standard-RNA, $p<0,05$ vs. 0-3 Tage, n=4). In den Monolayer Zellkulturen fand sich unmittelbar nach der Isolierung mit 136±46% der Standard-RNA der insgesamt höchste mRNA-Gehalt, signifikant höher als in den neonatalen Ventrikeln ($p<0,05$, n=4). Diese hohe Expression ging unter Kulturbedingungen in der Monolayerkultur wieder auf ein Niveau zurück, vergleichbar mit dem intakten neonatalen Ausgangsgewebe (3T: 33±8% der Standard-RNA, $p<0,05$ vs. 0 T, 10 T: 40,8±15,9% der Standard-RNA, n=4). In den EHTs fand sich dagegen eine stabil hohe Expression von VEGF (116,19±64,61% der Standard-RNA).

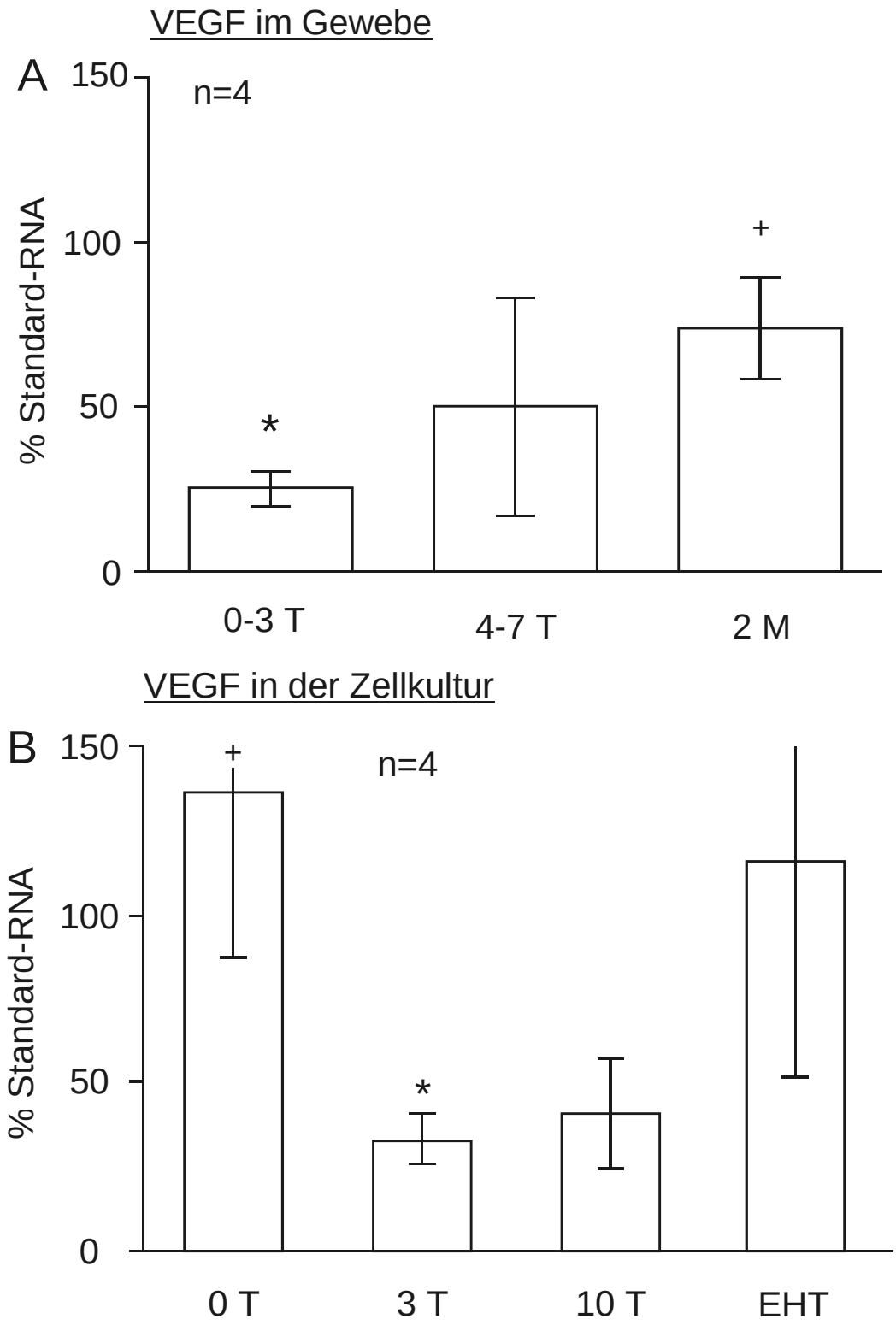


Abbildung 22: VEGF-mRNA-Gehalt, gemessen durch Northern Blot Analyse von null bis drei Tage alten (0-3 T), vier bis sieben Tage alten (4-7 T) und erwachsenen (2 M), intakten Rattenventrikeln (A) und aus isolierten Kardiomyozyten (B) nach der Isolation (0 T), nach drei (3 T) und zehn (10 T) Kulturtagen sowie im rekonstituierten Gewebe (EHT) in % der Standard-RNA ± SEM (*p<0,05 vs. 0 T, +p<0,05 vs. 0-3 T).

3.6.14. Einfluss der Kardiomyozytenisolierung

Im Verlauf der normalen physiologischen Entwicklung und unter den Kulturbedingungen kam es für die verschiedenen Gene zu einer jeweils spezifischen und sehr unterschiedlichen Regulation der Expression. Unabhängig von untersuchten Gen schien jedoch immer der auf die 18s rRNA normalisierte mRNA Gehalt unmittelbar nach der Zellisolierung höher zu sein als im intakten Ausgangsgewebe. Um zu überprüfen, ob sich ein solch genereller Einfluss der Zellisolierung nachweisen ließ, wurden die gemessenen Werte unmittelbar nach der Präparation für alle 11 Gene (n=4) zusammengefasst den jeweiligen Werten der 0-3 Tage alten intakten Ventrikeln gegenübergestellt. Abbildung 23 zeigt diese Auswertung, bei der die Werte zum Zeitpunkt 0 T jeweils als% der 0-3 T alten Ventrikel dargestellt und zusammengefasst sind. Im Mittel lag der mRNA-Gehalt der verschiedenen Gene um mehr als das 2fache höher als in den intakten neonatalen Ventrikeln ($p<0,05$).

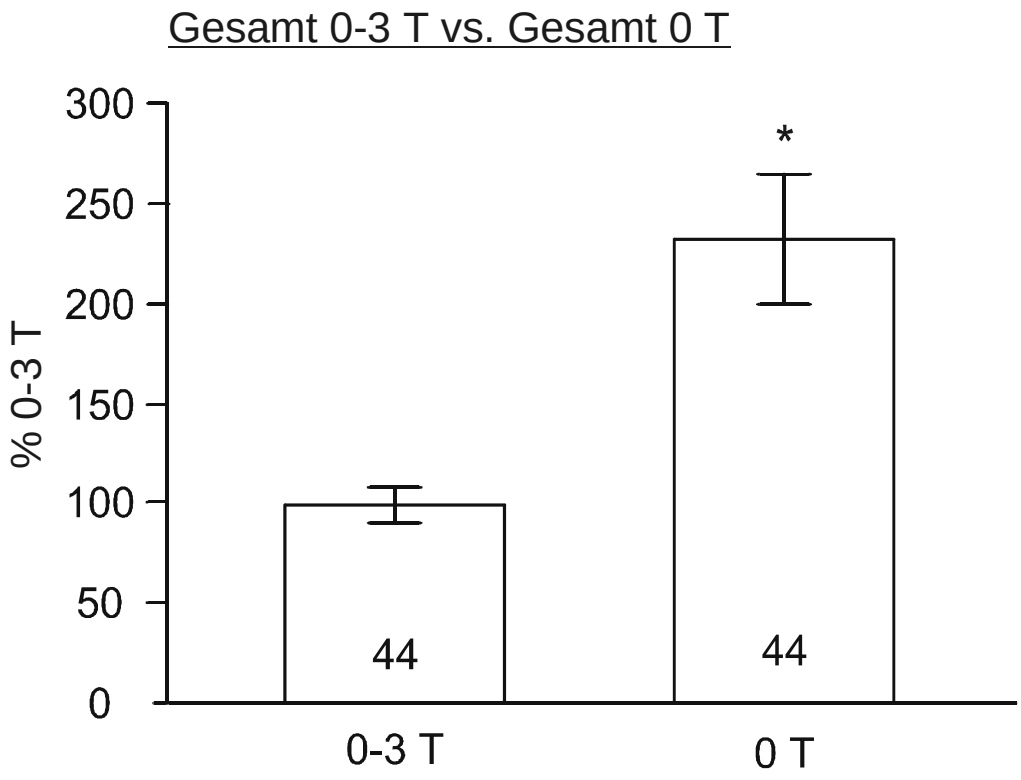


Abbildung 23: Einfluss der Kardiomyozytenisolierung aus dem Zellverband. Dargestellt sind alle Einzelwerte der mRNA-Expression aus den neonatalen Ventrikeln (0-3 T) als 100% und alle Expressionswerte der frisch isolierten Kardiomyozyten (0 T) in Prozent des Gehaltes in den neonatalen Ventrikeln (*$p<0,05$ vs. 0-3 T, n=44).

4. Diskussion

Primärkulturen von Kardiomyozyten stellen ein etabliertes Modell zur Untersuchung physiologischer und biochemischer Fragestellungen in der Herzkreislaufforschung dar, das einer pharmakologischen oder genetischen Intervention gut zugänglich ist. Dabei steht den Vorteilen aber vor allem gegenüber, dass die Kardiomyozyten nicht mehr unter physiologischen Bedingungen wachsen. Eine Zellkultivierung als Monolayer bedeutet den Verlust der Organisation im Gewebeverband, im dreidimensionalen Kontakt mit Kardiomyozyten, anderen Zellen und Interstitium, das Fehlen der gerichteten dauerhaften rhythmischen mechanischen Belastung und des physiologischen Einflusses von Hormonen und Wachstumsfaktoren. Das unphysiologische Wachstum und Einflüsse durch die Isolierung der Zellen führen zwangsläufig zu Veränderungen der Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Morphologie, der kontraktilen Funktion und der Genexpression, die in weiten Teilen noch nicht charakterisiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, inwieweit in Kardiomyozyten von neonatalen Ratten die Expression verschiedener Gene durch Zellisolierung und Wachstum unter verschiedenen Bedingungen, zweidimensional oder in einer dreidimensionalen Matrix, beeinflusst wird. Dabei sollte durch die Auswahl der untersuchten Gene eine möglichst große Bandbreite von physiologischen Zellfunktionen abgedeckt werden. Deshalb wurde auf mRNA-Ebene die Expression von Proteinen der transmembranären Signaltransduktion, der Calciumhomöostase des sarkoplasmatischen Retikulums, von kontraktilen Proteinen sowie von sezernierten Proteinen und Peptiden untersucht. Dem Nachteil, dass die Expression der mRNA zwar häufig, jedoch nicht immer die Expression auf Proteinebene widerspiegelt, stehen für die gewählte Fragestellung ausschlaggebende experimentelle Vorteile gegenüber. Messungen der mRNA sind häufig spezifischer, sensitiver und einfacher zu etablieren als Messungen auf Proteinebene, die in hohem Maße von der Qualität der eingesetzten Antikörper abhängen. Dies gilt insbesondere, wenn verschiedene Subtypen eines Proteins untersucht werden sollen. So war beispielsweise kein Antikörper verfügbar, der es erlaubt hätte, mit ausreichender Spezifität α- und β-MHC getrennt zu quantifizieren. Da bei der eingesetzten Northern Blot Technik durch Rehybridisieren die Proben wiederholt untersucht werden können, lässt sich ein breites Spektrum an verschiedenen Genen an einer im Vergleich zu Immunoblots geringeren Anzahl an Zellen und dafür erforderlichen Tieren quantifizieren. Dies kam dem Ziel dieser Arbeit, einem methodischen Vergleich durch Charakterisierung verschiedener

Gene, in besonderem Maße entgegen. Die Ergebnisse der Monolayerkultur wurden einerseits mit intaktem myokardialem Gewebe von Ratten verschiedenen Alters und andererseits mit dreidimensional rekonstituiert kultivierten Kardiomyozyten (EHT) verglichen. Im folgenden sollen zunächst die Befunde im intakten Myokard zu verschiedenen Alterszeitpunkten diskutiert werden, um Bedingungen und mögliche Mechanismen der Genregulation vorzustellen und um anschließend diesen Befunden die Ergebnisse aus der zweidimensionalen Zellkultur und den EHTs gegenüberstellen zu können.

4.1. Altersabhängige physiologische Genexpression im Rattenventrikel

Für die physiologische mRNA Expression verschiedener Gene im intakten Ventrikel von Ratten unterschiedlichen Alters ergaben sich zusammenfassend folgende Befunde: der Gehalt an G-Proteinen im Ventrikel änderte sich innerhalb der ersten zwei Monate nicht, der Gehalt an PLB- und SERCA nahm zu, und es kam zu einem Isoformenswitch von β-MHC zu α-MHC. Die mRNA von ANP und ppENK wurde gleichmäßig niedrig exprimiert, die VEGF-mRNA stieg dagegen innerhalb der ersten zwei Lebensmonate kontinuierlich an. Diese Befunde werden im einzelnen vor dem Hintergrund der Literatur diskutiert.

Die Expression der G-Protein-Untereinheiten, Giα-2, Gsα und Gβ veränderte sich nicht innerhalb der ersten zwei Lebensmonate (Abbildung 15 A). Zwar gibt es zahlreiche Untersuchungen, die den Verlauf der Expression von G-Proteinen bei der Ratte im Alter oberhalb von 2-6 Monaten, z.T. mit widersprüchlichen Ergebnissen, beschreiben (Miyamoto et al. 1994, Bazan et al. 1994), doch für die unmittelbare postnatale Phase und den Zeitverlauf innerhalb der ersten zwei Monate gibt es nur wenige Befunde. Bartel et al. (1996) beschrieben für Gsα ebenfalls eine gleichbleibende Proteinexpression innerhalb der ersten 4 Monate, doch fanden sie eine starke Abnahme für Giα-3 innerhalb der ersten 30 Tage postnatal sowie eine Abnahme von Go, Gq und Gβ bis zum Zeitpunkt von 4 Monaten (Bartel et al. 1996). Die Ursache für diese Differenz zu den vorgelegten Daten ist nicht klar. Auf der einen Seite müssen Ergebnisse auf mRNA Ebene nicht zwangsläufig die Daten auf Proteinebene widerspiegeln. Auf der anderen Seite zeigt die Heterogenität und scheinbare Widersprüchlichkeit der publizierten Daten für ältere Ratten, dass eine Reihe von zum Teil unbekannten Faktoren wie z.B. unterschiedliche Tierstämme, Tageszeit der Organentnahme u.a. die Ergebnisse erheblich beeinflussen können.

Im Gegensatz zu den G-Proteinen stieg die mRNA für PLB und SERCA bis zum vierten bis siebten Lebenstag an. Für die SERCA-mRNA setzte sich dieser Anstieg noch bis zum zweiten Lebensmonat fort. Dieser postnatale Anstieg setzt zunächst die pränatale Entwicklung fort. Zeitgleich mit dem Auftreten von Kontraktionen des Herzschlauches steigt die PLB-mRNA ab dem 12. Tag und die SERCA-mRNA ab dem 9.Tag post conzeptionem kontinuierlich an (Ganim et al. 1992, Moorman et al. 1995). Der vorliegende Befund stimmt auch mit Ergebnissen aus der Literatur überein. Vetter et al. (1995) beschrieben einen postnatalen Anstieg von SERCA-mRNA und Protein und eine Zunahme des SERCA/PLB-Quotienten. Messungen an Membranen zeigten entsprechend eine gesteigerte Ca^{2+}-Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum. Wie in der vorgelegten Arbeit fanden Gombosová et al. (1997) in der postnatalen Entwicklung ebenfalls keine Veränderung im PLB-Protein und mRNA-Gehalt (Gombosová et al. 1997). Bedeutsam für diese unterschiedliche Entwicklung von Phospholamban und SERCA könnte neben vielen anderen Faktoren eine Regulation durch Schilddrüsenhormone sein (Nagai et al. 1989, Kiss et al. 1994). Postnatal steigen diese Hormon-Konzentrationen im Serum von Ratten an (Chizzonite 1984). Auf Proteinebene ist für SERCA eine Hochregulation durch Schilddrüsenhormone beschrieben, und ein „thyroid hormon responsive cis-acting element“ in der Promotor Region des SERCA-Gens der Ratte ist ebenfalls identifiziert worden (Rohrer et al. 1991). Phospholamban-Protein dagegen wird durch Schilddrüsenhormon herunter reguliert (Rohrer et al. 1991), ohne dass es allerdings zu einer Abnahme der mRNA kommt (Kiss et al. 1994). Unter steigenden Schilddrüsenhormon Konzentrationen würde man demnach, wie hier beobachtet, einen Anstieg der mRNA für SERCA und des SERCA/PLB Quotienten erwarten.

Auch die kontraktilen Proteine α- und β-MHC werden in ihrer Expression durch Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert. Schilddrüsenhormone führen zu einer verstärkten Expression der α- und zu einer verminderten Expression der β-Isoform (Lompre et al. 1984). Diese Regulation wird wahrscheinlich über den Chromatin assoziierten T_3-Rezeptor vermittelt (Samuels et al. 1997). Die postnatal ansteigende Konzentration von Schilddrüsenhormonen könnte also ebenfalls zum beobachteten Isoformenswitch zu α-MHC beitragen. Aber auch andere Wachstumsfaktoren sind für die Expression der kontraktilen Proteine von Bedeutung. Glukokortikoide erhöhen die Expression von α-MHC (Chizonite et al. 1984, Sheer et al. 1984, Morano et al. 1990), TGFβ1, bFGF und α-Adrenozeptoragonisten dagegen führen zu einer verstärkten Synthese der β-Form

(Simpson et al. 1989, Parker et al. 1990). Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Mellitus und Nebenniereninsuffizienz, aber auch chronische hämodynamische Druckbelastung, verstärken ebenfalls die Expression der β-Isoform (Lompre et al. 1979). Unabhängig von den Mechanismen der physiologischen Regulation reiht sich der in der vorgelegten Untersuchung beobachtete Isoformenswitch von β-MHC zu α-MHC in guter Übereinstimmung in früher publizierte Arbeiten ein. Danach dominiert im Myokard der Nagetiere in der späten fetalen und frühen postnatalen Periode die Expression der β-Isoform, während in der weiteren postnatalen Entwicklung nahezu ausschließlich α-MHC exprimiert wird (Gorzav et al. 1981, Lompre 1984, Dechesne et al. 1987, Capelli et al. 1989). Erst im weiteren Alterungsprozess, vermutlich als Antwort auf eine zunehmende Druckbelastung des Herzens, wird dagegen wieder eine verstärkte Expression der β-MHC Isoform beobachtet (Gorzav et al. 1981, Nadal-Ginard et al. 1989).

Wodurch letztlich die mRNA Expression von Phospholamban, SERCA und den kontraktilen Proteinen reguliert wird, kann die vorgelegte Untersuchung nicht klären und war auch nicht das Ziel der Arbeit. Festzuhalten bleibt jedoch, dass gerade an diesen gut untersuchten Genen gezeigt werden kann, dass die in dieser Studie angewandte Methodik in ihren Ergebnissen mit den Ergebnissen früherer Studien weitgehend übereinstimmt.

Die Expression von ppENK blieb im ventrikulären Myokard während der ersten zwei Lebensmonate unverändert (Abbildung 20 A). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Boluyt et al. (1993) und Caffrey et al. (1994) die die ppENK-Expression in Ratten über einen Zeitraum von 18 bzw. 27 Monaten untersuchten. In der frühen postnatalen Entwicklung blieb die Expression der ppENK-mRNA wie in der vorgelegten Arbeit gleichbleibend niedrig. Später, ab dem 2. (Boluyt et al. 1993) bzw. dem 7. Monat (Caffrey et al. 1994) stieg zwar der myokardiale ppENK-mRNA-Gehalt an, die Gewebe-Konzentrationen von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin nahmen jedoch während dieses Zeitraums sogar ab. Funktionell bleiben die physiologischen Veränderungen im Expressionsniveau der Opioide im höheren Alter unklar. Opioide können hemmend auf das β-Adrenorezeptor-Adenylylcyclase-Systems wirken. Eine erhöhte Expression unter diesen Bedingungen könnte damit als Kompensationsmechanismus auf einen dauerhaft erhöhten Sympatikotonus verstanden werden. Innerhalb der ersten Lebensmonate scheinen solche regulatorischen Expressionsänderungen jedoch nicht stattzufinden.

Wie bei ppENK war auch die Expression von ANP im Ventrikel zu allen Zeitpunkten auf niedrigem Niveau gleich hoch. Grundsätzlich sind zahlreiche humorale Regulationsfaktoren beschrieben worden, die zu erhöhten mRNA- und Proteinspiegeln führen können. Schilddrüsenhormone, der Leukozyten inhibitorische Faktor, Endothelin, Phenylephrin als α-Sympathomimetikum und Prostaglandin F2-α erhöhen die Produktion von ANP (King et al. 1998). Auch Glukocorticoide beeinflussen die ANP-Expression (Nemer et al. 1984, Yamanaka et al. 1984, Day et al. 1987). Doch scheinen diese Faktoren innerhalb der ersten zwei Monate für die Expression von ANP offensichtlich nicht von Bedeutung zu sein.

VEGF zeigte im Verlauf der postnatalen Alterung im Herzmuskelgewebe eine kontinuierliche Steigerung seiner Expression, für die sehr unterschiedliche Ursachen in Betracht kommen (siehe Abbildung 22 A). Generell kann eine Gewebehypoxie, die über den „Hypoxia-inducible factor 1“ (HIF-1) zu einer Transkriptionssteigerung führt, zu einer erhöhten Expression von VEGF führen (Ferrara et al. 1992, Minenchenko et al. 1994). Darüber hinaus führen aber auch diverse humorale Faktoren (Epidermal growth factor, TGF-α, TGF-β, Keratinocyte growth factor, Interleukine IL-1α, IL-1β) zu einem Anstieg. Für Adipozyten ist bekannt, dass ein steigender VEGF-Gehalt parallel zur Zelldifferenzierung verläuft (Claffey et al. 1992). An Endothelzellen wurde eine negative Korrelation zwischen der ANP-Plasmakonzentration und der Expression von VEGF gezeigt (Pedram et al. 1997). Dieses geschieht sowohl direkt als auch sekundär über den Einfluss des Vasokonstriktors Endothelin. Welche Faktoren jedoch für die physiologische Erhöhung der VEGF-mRNA während der ersten Lebenswochen verantwortlich sind, bleibt unklar. Allerdings erscheint ein solcher Anstieg von VEGF, der das Gefäßwachstum fördert, parallel zum Herzwachstum sinnvoll, damit die Gefäßversorgung einem steigenden Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen gerecht werden kann.

Zusammengefasst verhielt sich die Expression der untersuchten Gene in der postnatalen Entwicklung sehr unterschiedlich. Angesichts dieser spezifischen Regulation unter physiologischen Bedingungen war es nicht zu erwarten, dass sich in der Zellkultur für alle Gene eine gleichgerichtete Regulation zeigte. Daher sollen im folgenden alle relevanten Einflüsse, wie der Vorgang der Zellisolierung, die Anreicherung von Kardiomyozyten und

die Kulturbedingungen, jeweils unter gesonderter Berücksichtigung der verschiedenen Gene diskutiert werden.

4.2. Einfluss der Kardiomyozyten-Isolierung auf die Genexpression

Die Untersuchungen zeigten, dass allein die Isolierung der Zellen durch enzymatischen Verdau der Herzen den mRNA Gehalt beeinflusste. Die mRNA Konzentration aller Proteine war in den Zellen unmittelbar nach der Isolierung (0 T) höher als im ventrikulären Myokard der neonatalen Ratten (0-3 T), aus dem die Zellen isoliert wurden (Abbildung 23). Das Ausmaß dieses Anstiegs war für verschiedene Proteine jedoch unterschiedlich. So betrug bei SERCA der Anstieg nur 34%, während die VEGF-mRNA auf 435% des Ausgangswertes zunahm. Ein Einfluss der Kardiomyozytenisolierung auf die Genexpression ist bereits durch Vincan et al. (1995) beschrieben worden. Für Gq fanden sie unmittelbar nach der Isolierung ebenfalls ein erhöhtes, für Gh dagegen ein erniedrigtes Expressionsniveau (Vincan et al. 1995).

Ursächlich könnte dabei eine Aufkonzentrierung der Kardiomyozyten von Bedeutung sein. Myozyten haben im kardialen Gewebe einen Volumenanteil von ca. 80%, sie machen jedoch nur 25% der Gesamtzellzahl aus (Zak et al. 1974, Dow et al. 1981, Clubb et al. 1986). Die Gesamt-RNA aus dem intakten Ventrikel enthält daher einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an RNA von Nichtmyozyten, der durch die Zellpräparation verringert wird. Eine Aufkonzentrierung von Myozyten sollte sich besonders in einer Erhöhung des Anteils herzmuskelspezifischer mRNA zeigen, wie der von kontraktilen Proteinen und von Proteinen des sarkoplasmatischen Retikulums. Tatsächlich war die Zunahme der mRNA von α- und β-MHC, PLB und SERCA jedoch geringer als die Zunahme der mRNA von Genen, die auch von anderen Zellarten exprimiert werden. Daher müssen neben der Selektion von Kardiomyozyten weitere Faktoren für diesen Anstieg der Genexpression verantwortlich sein. Von den denkbaren Einflussgrößen sollen hier drei diskutiert werden: a) Die fehlende kontraktile Aktivität während der Präparation, b) Zusätze wie Trypsin und fetales Kälberserum (FCS) in den Präparationsmedien und c) der Sauerstoffgehalt.

a) Die Genexpression in Kardiomyozyten hängt in hohem Maße von der kontraktilen Aktivität ab. Es wäre deshalb denkbar, dass es aufgrund der fehlenden Kontraktion der Kardiomyozyten während der mehrstündigen Isolierung zu einer Veränderung des

Expressionsmusters kommt. Nach publizierten Untersuchungen ist bei fehlender Kontraktion eine Abnahme von ANP und β-MHC innerhalb weniger Stunden zu erwarten (Allen et al. 1991, Eble et al. 1998). Das stimmt mit den Ergebnissen dieser Untersuchung unmittelbar nach der Isolierung nicht überein. Tatsächlich kam es bei ANP zu einem Anstieg nach der Isolierung auf das 2,5fache des neonatalen Gewebes. Doch könnte hier vielleicht ein Grund für die geringe Zunahme des myozytenspezifischen β-MHCs liegen (siehe Abbildung 20 A und Abbildung 18 A).

b) Der unspezifische Gewebeverdau durch Trypsin stellt einen Eingriff in das Gewebegefüge dar, der nicht nur die extrazellulare Matrix, sondern auch dem Extrazellularraum zugewandte Membranproteine angreifen kann. Ein Abbau membranständiger G-Proteine könnte hypothetisch reaktiv zu einer gesteigerten Transkription führen. Für Proteine, die keinen direkten Kontakt zum Extrazellulärraum haben, wie die kontraktilen Proteine oder die in Vesikeln gespeicherten Hormone ANP und VEGF, könnten auch indirekte Einflüsse über membranständige Proteine von Bedeutung sein.

Verschiedene humorale Wachstumsfaktoren können zu einer Hochregulation im Expressionsniveau der verschiedenen Gene führen. Solche Wachstumsfaktoren werden der Zellkultur durch die Zugabe von Serum zum Zellkulturmedium, in der vorliegenden Untersuchung FCS, zugeführt. Die genaue Zusammensetzungen dieser Seren ist unbekannt. Aus der Literatur weiß man jedoch, dass die Proteinsynthese, der Proteingehalt und die DNA-Synthese in einem Konzentrationsbereich von 5-20% proportional zur FCS-Konzentration im Serum ansteigt (Decker et al. 1995).

c) Methodisch bedingt ist es während der Präparationsphase, anders als während der anschließenden Kultivierungsphase, vorstellbar, dass die Zellen während der sechs Stunden der Präparation einem Sauerstoffdefizit ausgesetzt sind. Die Sammelgefäße sind nicht oxygeniert und haben eine kleine Oberfläche. Zusätzlich liegen die Zellen in Klustern am Boden der Gefäße, ohne Kontakt zur Oberfläche. Die Anzahl der aus dem Gewebe gelösten Zellen nimmt mit andauerndem Verdau ab, so dass die Mehrzahl der Myozyten am Anfang der Präparation in die Sammelgefäße überführt werden und damit länger solchen potentiell hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Bekannt ist, dass verschiedene Gene durch Hypoxie in ihrer Expression reguliert werden. Hypoxie ist der

potenteste physiologische Regulationsfaktor für die VEGF-Expression. Für ANP und β-MHC ist in der zweidimensionalen Zellkultur ebenfalls eine gesteigerte Expression durch Hypoxie beschrieben (Chen et al. 1997, Pissarek et al. 1997). Das entspricht den Ergebnissen dieser Untersuchung, bei der sowohl die ANP- als auch die β-MHC-mRNA nach der Präparation signifikant erhöht war (siehe Abbildung 20 und Abbildung 18).

Einschränkend muss für all diese Überlegungen jedoch gelten, dass die Zellpräparation abgesehen vom 1 stündigen Preplating, bei 4 °C durchgeführt wurde. Es ist unbekannt, ob die fehlende Kontraktilität, Trypsin, Wachstumsfaktoren und Hypoxie auch bei solch niedrigen Temperaturen zu den genannten Veränderungen führen können. Zusammengefasst führt die Isolierung der Myozyten gleichgerichtet zu einer Erhöhung des mRNA Gehaltes unterschiedlichster Gene. Neben der Aufkonzentrierung von Kardiomyozyten müssen dafür jedoch noch weitere Faktoren, wie beispielsweise Hypoxie, humorale Faktoren und die fehlende mechanische Aktivität, verantwortlich sein.

4.3. Zeitverlauf der Genexpression in der zweidimensionalen Zellkultur

Das Wachstum der Kardiomyozyten unter unphysiologischen Bedingungen, in einer Ebene und ohne Kontakt zu physiologischer extrazellulärer Matrix oder zu Nichtkardiomyozyten, lässt erwarten, dass die Zellen Adaptationsmechanismen unterliegen, die sich auch im Genexpressionsmuster niederschlagen. Dass die Zellkontakte von Bedeutung für die Funktion sind, wurde beispielhaft durch die Untersuchungen von Speicher et al. (1981) deutlich, in denen beschrieben wurde, dass die Zelldichte in der zweidimensionalen Kultur den Proteingehalt und die Thymidininkorporation beeinflusst. Am Beispiel der Laktatdehydrogenase wurde gezeigt, dass eine Kokultivierung von Kardiomyozyten mit Nichtkardiomyozyten zu Veränderungen von Enzymaktivitäten führen kann (Pinson et al. 1987). Von Bedeutung können dabei neben direkten Interaktionen aber auch parakrine Faktoren sein. Nichtkardiomyozyten sezernieren unter anderem Faktoren wie aFGF, bFGF und Endothelin, die direkte Effekte auf Kardiomyozyten haben (Tokola et al. 1994; Harada et al. 1997). Solche Einflussfaktoren sollten erwartungsgemäß nicht zu einer gleichmäßigen, sondern eher zu genspezifischen Expressionsänderungen führen. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Zellen in der zweidimensionalen Kultur ein stabiles Gleichgewicht erreichen und ob ein

solches Gleichgewicht dem physiologischen Zustand im Herzen eher entspricht als dem in der zweidimensionalen Kultur.

Nach dem Herauslösen aus dem Gewebeverband benötigten die Kardiomyozyten einige Zeit, um sich von der Isolierung zu erholen und sich funktionell an die Kultivierungsbedingungen zu adaptieren. Sie zeigten zunächst für 1-2 Tage keine regelmäßige kontraktile Aktivität, und es dauerte in der zweidimensionalen Zellkultur etwa sechs Tage, bis sie mit einer gleichbleibenden Frequenz koordiniert kontrahierten (siehe Abbildung 9). Dementsprechend war es nicht überraschend, dass parallel zu dieser funktionellen Adaptation auch Änderungen der Genexpression nachweisbar waren, die sich wie folgt zusammenfassen lassen. Der Gesamtproteingehalt nahm während der 10 Kulturtage ab, die Gesamt-RNA dagegen zu. Für die einzelnen Proteine war der auffälligste Befund die starke Reduktion der kontraktilen Proteine α- und β-MHC. Die mRNA für die G-Protein Untereinheiten, für PLB, SERCA und VEGF nahm im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen innerhalb der ersten drei Tage ab, die Expression von ANP und ppENK stieg dagegen an. Diese Befunde sollen näher diskutiert werden.

Als scheinbar widersprüchlich erscheint zunächst, dass der Gesamt-Proteingehalt pro eingesetzter Zelle und pro Zellkern stark (um über 80%) während der Kulturdauer abnahm, obwohl sich gleichzeitig der Gesamt-RNA-Gehalt sogar erhöhte (siehe Abbildung 12 und Abbildung 10). Um diese scheinbare Diskrepanz zu erklären, müssen verschiedene Aspekte bedacht werden. Die Zahl der Zellkerne nahm über die zehn Kulturtage allenfalls geringfügig ab. Es stellt sich dabei die Frage, ob die Zahl der Zellkerne tatsächlich die Zahl der Zellen repräsentiert. So könnte beispielsweise ein Verlust an Zellen durch Mediumtausch und Absterben durch eine Polyploidie der Zellen verschleiert werden. In diesem Fall würde man bei sonst unveränderter Zellgröße ebenfalls eine Abnahme des Proteingehaltes pro Zellkern sehen. Doch wurde, auch um der Entstehung einer solchen Polyploidie entgegenzuwirken, der Mitosehemmstoff Bromodesoxyuridin dem Kulturmedium beigesetzt. Da dies zu einer Hemmung der Teilung von Nichtkardiomyozyten führte, sollte dadurch auch die Entstehung einer relevanten Polyploidie weitgehend ausgeschlossen sein. Die Annahme einer Fehleinschätzung der tatsächlichen Zellzahl, beispielsweise durch eine Polyploidie, kann darüber hinaus die beobachtete Diskrepanz zwischen RNA- und Proteingehalt nicht erklären. Dass der mRNA-Gehalt nicht immer den spezifischen Proteingehalt in einer Zelle widerspiegeln

muss, wurde bereits oben erwähnt. Dies kann an unterschiedlichen Translationsraten, posttranslationalen Modifizierungen und an unterschiedlichen Halbwertszeiten der Proteine liegen. Veränderungen im steady state Gehalt verschiedener mRNAs können deshalb insgesamt den Proteingehalt unverändert lassen, zu gleichsinnigen oder zu gegenläufigen Veränderungen führen. Zu einer Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteingehalt könnten aber auch Proteine beitragen, die in das Kulturmedium sezerniert und deshalb auf der Proteinebene nicht erfasst werden, wie beispielsweise die Opioide, ANP oder VEGF. Tatsächlich kam es zu einer Zunahme der Expression von ANP und ppENK in der zweidimensionalen Kultur. Die Diskrepanz zwischen abnehmendem Protein- und zunehmendem Gesamt-RNA-Gehalt lässt sich aber verstehen, wenn man berücksichtigt, dass die mRNA lediglich ca. 5% der Gesamt-RNA ausmacht. Veränderungen auf mRNA-Ebene spielen demnach für den Anstieg der Gesamt-RNA praktisch keine Rolle, schlagen sich aber im Gesamtproteingehalt nieder. Dabei wird der geringere Gesamtproteingehalt in den kultivierten Kardiomyozyten durch die Abnahme der mRNA-Expression fast aller Proteine erklärbar. Diese ging, verglichen mit den frisch isolierten Zellen, um 50% (Giα2) bis 87% (β-MHC), im Durchschnitt um 64%, zurück. Insbesondere die drastische Abnahme der kontraktilen Proteine, die über 50% des Gesamtproteingehaltes von Myozyten ausmachen, muss quantitativ ins Gewicht fallen. Von Bedeutung für den Anstieg der Gesamt-RNA unter den Kulturbedingungen in der vorgelegten Untersuchung war dagegen die relative Zunahme der 18S-rRNA (siehe Abbildung 14). Da diese nicht translatiert wird, ist es plausibel, dass einer Zunahme auf rRNA-Ebene nicht eine parallele Zunahme von Proteinen folgt.

Betrachtet man die Expression der einzelnen Gene, so war der auffälligste Befund die erhebliche Abnahme der mRNA der kontraktilen Proteine α- und β-MHC. Dabei blieb das Verhältnis der Isoenzyme zueinander konstant. Der im Vergleich zum Gewebe fehlende Anstieg von α-MHC unter zweidimensionalen Kulturbedingungen kann eine Reihe von Ursachen haben, lässt sich aber möglicherweise auf das Fehlen von Faktoren wie Schilddrüsen- und Steroidhormonen zurückführen (Chizonite et al. 1984, Sheer et al. 1984, Morano et al. 1990, Spindler et al. 1982, Lompre et al. 1984). Das Fehlen einer kontraktilen Aktivität in den ersten Tagen, einer mechanische Belastung und von Katecholaminen kann darüber hinaus zum Verlust von β-MHC beitragen. Wachstumsfaktoren wie aFGF und bFGF, die die Expression von β-MHC erhöhen, werden in vivo unter anderem von interstitiellen Zellen gebildet. Wie viele und welche

davon über das FCS unter Kulturbedingungen in das Medium gelangen, ist weitgehend unbekannt. Unter den Bedingungen der zweidimensionalen Zellkultur kam es also weder zur Ausprägung des physiologischen Isoformenswitch noch zur Reexpression eines „fetalen“ Expressionsmusters mit Überwiegen von β-MHC, sondern zu einem eigenständigen Bild.

Die untersuchten G-Proteine wurden nach drei Tagen in zweidimensionaler Zellkultur deutlich niedriger exprimiert als in den frisch isolierten Zellen. Im weiteren Verlauf blieb der mRNA-Gehalt dann jedoch unverändert (siehe Abbildung 15) und war wieder vergleichbar mit dem Gehalt in den intakten Ventrikeln. Für andere G-Proteine wurden in der Literatur funktionell bedeutsame Veränderungen unter Kulturbedingungen beschrieben. Die mRNA für Gh nahm nach der Zellisolierung und in den folgenden sieben Tagen in zweidimensionaler Zellkultur ab, während es sich für Gq umgekehrt verhielt (Vincan et al. 1995). Diese Zunahme von Gq korrespondiert mit einem erhöhten Inositol-Triphosphat Gehalt in den isolierten Zellen (Woodcock et al. 1992). Die vorgelegten Untersuchungen legen dagegen für Gs und Gi in der Kultur keinen funktionellen Unterschied gegenüber dem Gewebe nahe, da sowohl der Gesamtgehalt, als auch das Verhältnis zwischen stimulierenden (Gsα) und inhibitorischen α-Untereinheiten (Giα2) mit dem intakten Myokard vergleichbar waren.

Die Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums PLB und SERCA zeigten, ähnlich wie die G-Proteine, abgesehen von einer anfänglichen Abnahme im mRNA-Gehalt keine weiteren Änderungen. Dies galt sowohl für den absoluten mRNA-Gehalt (siehe Abbildung 16) als auch für das relative Verhältnis der beiden Proteine zueinander (siehe Abbildung 17). Funktionelle Veränderungen, wie die langsame Zunahme der Kontraktionsfrequenz über 5-6 Tage, scheinen deswegen nicht in direktem Zusammenhang mit dem mRNA-Gehalt dieser beiden Proteine zu stehen. Die Expression unter Kulturbedingungen unterschied sich sehr vom Verlauf im intakten Myokard. Die physiologische Zunahme der mRNA beider Proteine und die Zunahme des SERCA/PLB Quotienten trat nicht auf. Auch dafür könnten unter anderem, wie oben diskutiert, Unterschiede in der Schilddrüsenhormon-Konzentration unter physiologischen und unter Kulturbedingungen von Bedeutung sein.

Ein Anstieg der myokardialen Expression von ANP-mRNA und Protein gilt als Marker für eine Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Lattion et al. 1986, Day et al. 1987, Takemura et al. 1989). Pathophysiologisch ist die Ausschüttung von ANP bei der Herzinsuffizienz sinnvoll. Durch eine Verminderung der renalen Natrium- und Wasserretention, eine Verminderung des extrazellulären Volumens und durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulaturzellen kommt es zur Abnahme der Vor- und Nachlast und damit zur Entlastung des Herzens. Vermutlich spielen humorale und mechanische Faktoren eine Rolle für die erhöhte Expression bei der Herzinsuffizienz. Beides könnte auch für den beobachteten Anstieg der ANP-mRNA in der zweidimensionalen Zellkultur von Bedeutung sein. Da das Kulturmedium mit 5% FCS versetzt war, ist es möglich, dass auf diese Weise Wachstumsfaktoren und Hormone in das Medium gelangt sind. Wie für andere Gene auch, haben aFGF, bFGF und Endothelin einen expressionssteigernden Effekt auf ANP (Tokola et al. 1994, Harada et al. 1997). Darüber hinaus beeinflusst vermutlich die Zunahme der Schlagfrequenz und der kontraktilen Aktivität während der ersten Kulturtage den Verlauf der ANP-Expression (Mekhail et al. 1994, Eble et al. 1998). Bedeutsam könnte schließlich auch ein Einfluss von Opioiden auf die Expression von ANP sein. Es konnte gezeigt werden, dass Opioide die Kontraktionsfrequenz, den ANP-Proteingehalt und die ANP Sekretion erhöhen können (Mekhail et al. 1994, Eble et al. 1998). Zwar wurden keine Opioid-Spiegel im Kulturmedium bestimmt, doch zeigt die vorgelegte Arbeit einen Anstieg der Expression der ppENK-mRNA. Dies könnte zu einer Sekretion opioider Peptide in das Medium und damit zu einer autokrinen Wirkung führen. Die gute Korrelation zwischen der ppENK- und der ANP-mRNA-Expression unter allen untersuchten Bedingungen wäre in Übereinstimmung mit einem solchermaßen postulierten Zusammenhang der Expression der beiden Gene (siehe Abbildung 21). Entsprechend findet sich eine Parallelität der Expression auch im Verlauf der physiologischen Alterung von Ratten (Boluyt et al. 1993, Younes et al. 1995). Etwa ab dem 6. Lebensmonat erhöht sich die Expression beider Gene zeitgleich mit dem linksventrikulären Wachstum. Neben der Bedeutung für die ANP-Expression könnte den Opioiden demnach eine Funktion bei Wachstumsvorgängen zukommen, möglicherweise, wie vorgeschlagen, als negative Modulatoren einer Hypertrophie (Ledda et al. 1985).

Die Expression von VEGF fiel innerhalb der ersten drei Kulturtage um das vierfache ab und blieb dann über die weitere Kulturdauer unverändert. Die VEGF-Expression war im steady state damit wieder vergleichbar mit dem intakten ventrikulären Myokard.

Wichtigster Regulationsfaktor für die VEGF-Expression ist der Sauerstoffgehalt im Gewebe. Das ist physiologisch sinnvoll, denn VEGF ist mitverantwortlich für die Angioneogenese, die unter hypoxischen Bedingungen abläuft. Andere humorale Einflussfaktoren auf die Expression sind Epidermal growth factor, TGF-α, TGF-β, Keratinocyte growth factor, IL-1α, IL-1β (Übersicht bei Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Die Möglichkeit einer Regulation der Expression aufgrund eines verminderten Sauerstoffangebotes während der Zellpräparation wurde bereits weiter oben diskutiert. Die Abnahme der Expression nach drei Kulturtagen wäre dann als eine Rückkehr zu normoxischen Verhältnissen in der zweidimensionalen Kultur zu verstehen. Funktionell ist zwar eine parakrine Wirkung von VEGF auf vaskuläre Zellen bekannt (Connolly et al. 1989) doch ob auch Wirkungen auf Kardiomyozyten bestehen, ist unklar.

Zusammenfassend stellte sich in dem untersuchtem zweidimensionalen Zellkulturmodell ein neues Gleichgewicht auf Ebene der mRNA-Expression und des Proteingehaltes zwischen dem dritten und zehnten Tag und funktionell hinsichtlich der Schlagfrequenzen zwischen dem sechsten und zehnten Tag. Damit wurde deutlich, dass ausgehend vom intakten Herzen zum Zeitpunkt unmittelbar nach der Geburt das myokardiale bzw. das myozytäre Genexpressionsmuster sich in der Kultur und im intakten Herzen jeweils eigenständig entwickelte.

4.4. Mögliche funktionelle Bedeutung der Unterschiede zwischen Myokard und zweidimensionaler Kultur

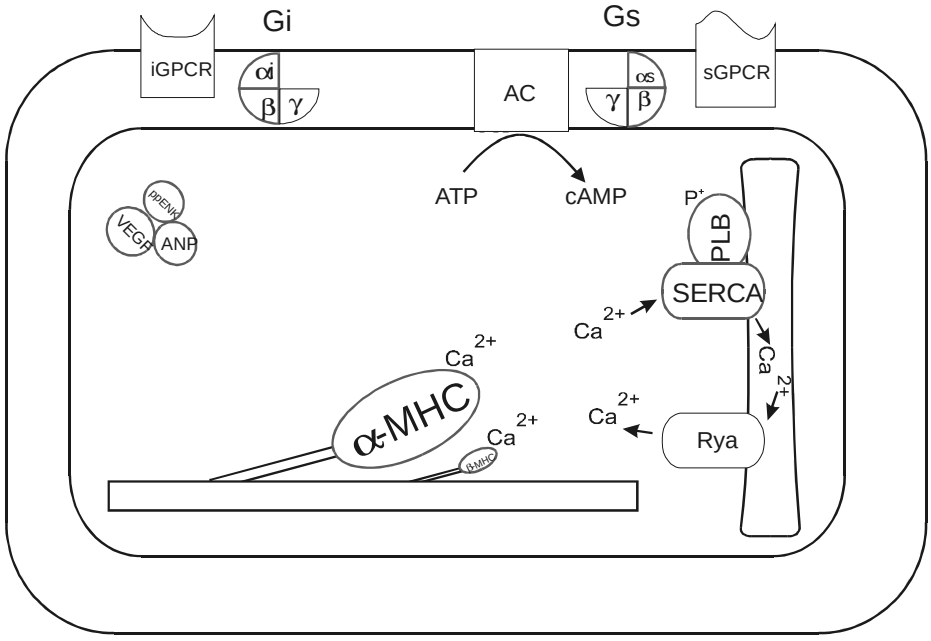
Ein Vergleich zwischen Zellkulturen im steady state und dem Herz erwachsener Ratten ist in Abbildung 24 nochmals graphisch dargestellt. Die Expression von PLB, SERCA und α-MHC nahm im Gewebe im Verlauf der physiologischen Alterung zu, nicht aber in der zweidimensionalen Zellkultur. Die Expression von ppENK und ANP war im Gewebe gleichbleibend niedrig, stieg in der zweidimensionalen Zellkultur jedoch an. Ein vergleichbares Expressionsniveau fand sich dagegen im steady state für die G-Protein Untereinheiten Giα2, Gsα und Gβ sowie für β-MHC und VEGF. Vorausgesetzt, die Ergebnisse spiegeln zumindest teilweise die Expression der Proteine wieder, so sind auch funktionelle Unterschiede wahrscheinlich, die bei Untersuchungen berücksichtigt werden müssen. Im folgenden soll versucht werden, unter dieser Voraussetzung Annahmen über

die funktionelle Bedeutung dieser Unterschiede zwischen Gewebe und kultivierten Kardiomyozyten zu machen.

Angesichts der drastischen Abnahme der kontraktilen Proteine α- und β-MHC in der zweidimensionalen Zellkultur liegt es nahe, dass sich auch die kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten ändern. Die Einzelzelle im Gewebe sollte mehr Kraft entwickeln können als in der Monolayerkultur. Auch der fehlende Isoformenswitch von β- zu α-MHC, der im Gewebe, nicht aber in der zweidimensionalen Kultur einsetzt, begünstigt wegen der niedrigeren ATPase-Aktivität eine langsamer ablaufende Kontraktion. Beide Veränderungen führen dazu, dass die Kardiomyozyten einen geringeren Anteil ihrer Energie für die Kontraktion aufwenden. Korrespondierend dazu können die Unterschiede der Proteine der Calciumhomöostase des sarkoplasmatischen Retikulums verstanden werden. Der niedrigere Gehalt von PLB und SERCA und der höhere PLB/SERCA Quotient in der zweidimensionalen Kultur deuten ebenfalls auf eine verminderte ATP abhängige diastolische Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum hin. Nimmt man an, dass in beiden Fällen dem mRNA Gehalt Proteinexpression und Funktion entsprechen, führen sowohl die verminderte Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum als auch die o.g. Veränderungen der kontraktilen Proteine zu einer Verlangsamung des Kontraktionszyklusses und zu einer verminderten Kontraktilität. Messungen von Kontraktilitätsparametern an zweidimensional kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten erscheinen aufgrund dieser Überlegungen also grundsätzlich als problematisch. Eine Übertragung auf die Situation im intakten Organ und in vivo ist demnach nicht ohne weiteres möglich.

Ob die hohen Spiegel von ANP- und ppENK-mRNA zu einer auto- oder parakrinen Wirkung auf die Kardiomyozyten führen, ist derzeit ebenso unklar wie die Frage, ob der fehlende Anstieg von VEGF für die Kardiomyozyten von Bedeutung ist. Die Zunahme der mRNA für ppENK und ANP, einem Marker für Hypertrophie und Herzinsuffizienz, verdeutlicht aber die tiefgreifenden Änderungen von Zellfunktionen und Genexpressionsprogramm, denen die Kardiomyozyten unter den zweidimensionalen Kulturbedingungen unterliegen.

A mRNA-Expression im Gewebe nach 2 Monaten



B mRNA-Expression nach 10 Tagen in Zellkultur

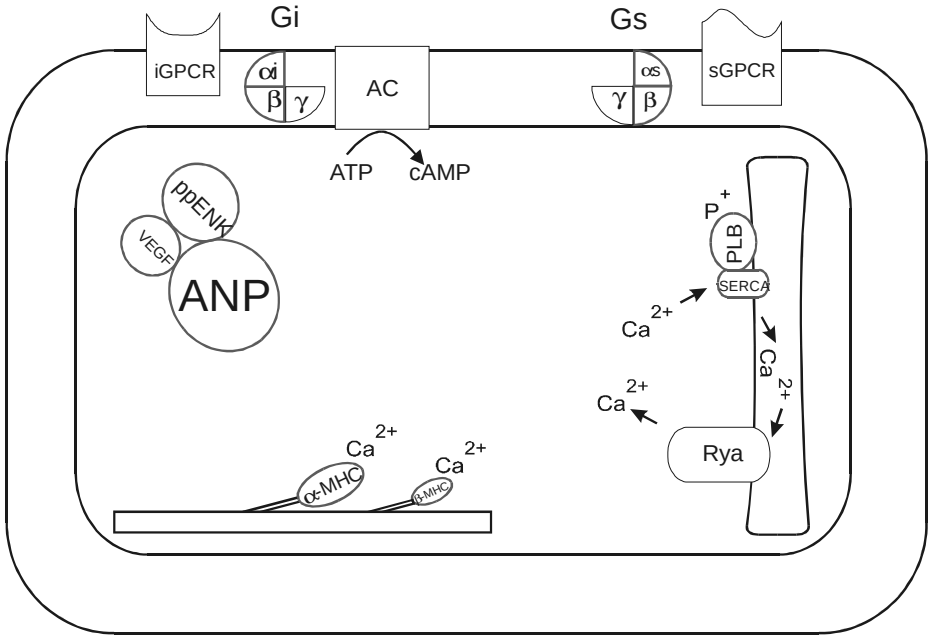


Abbildung 24: Schematische Darstellung der spezifischen mRNA-Expressionen der untersuchten Gene im erwachsenen Rattenventrikel (A) und nach zehn Tagen in der zweidimensionalen Kultur (B). Farbig dargestellt sind die untersuchten Gene. Die Größe der dargestellten Proteine spiegelt quantitativ die Unterschiede auf mRNA-Ebene wieder. Rya=Ryanoidin-Rezeptor, AC=Adenylyl-Cyclase, iGPCR/sGPCR= inhibitorischer/stimulatorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor, z.B. muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor (iGPCR) oder β-Adrenozeptor (sGPCR), Gs/Gi= stimulatorisches/inhibitorisches G-Protein.

4.5. Genexpression von Kardiomyozyten in rekonstituiertem Gewebe (EHT)

Angesichts der erheblichen Veränderungen, die Kardiomyozyten unter zweidimensionalen Kulturbedingungen erfahren, stellt sich die Frage, wie solchen Veränderungen entgegengewirkt werden kann, ohne dass die Vorteile der Zellkultur, wie aufgereinigte Myozytenpopulation, Intervention unter gut kontrollierten Bedingungen, gute Zugänglichkeit für einen Gentransfer, u.a., verloren gehen. Eine Kultivierung von Kardiomyozyten in einer Kollagenmatrix als sog. EHTs (Zimmermann et al. 2000) könnte in dieser Hinsicht günstiger sein. Die Zellen wachsen in einem dreidimensionalen gewebeartigen Verband, haben Kontakt zu interstitieller Matrix und sind durch koordinierte spontane Kontraktionen einer gerichteten mechanischen Belastung ausgesetzt. Es war deshalb denkbar, dass eine solche Form der Kultivierung den physiologischen Bedingungen näher kommt. Histologisch weisen die Kardiomyozyten tatsächlich Charakteristika einer höheren Differenzierung auf, wie die Ausbildung von Desmosomen, tight junctions und einer Querstreifung zeigt (Zimmermann et al. 2000). Ob eine solche höhere Differenzierung dazu führt, dass es nicht zu solchen Veränderungen kommt wie in der zweidimensionalen Kultur, war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Im folgenden sollen deshalb die Ergebnisse zur Genexpression in den EHTs denen der zweidimensionalen Zellkulturen im steady state (10 Tage) und denen aus dem intakten Gewebe (2 M) gegenübergestellt werden.

4.5.1. Vergleich der EHTs mit den zehn Tage alten zweidimensionalen Kulturen

Der mRNA Gehalt von G-Proteinen, PLB, SERCA und den kontraktilen Proteinen unterschied sich nicht wesentlich zwischen EHTs und zweidimensionalen Kulturen. Lediglich das Verhältnis der beiden α- und β-MHC Isoformen war zugunsten der β-MHC Isoform verschoben (siehe Abbildung 19 B). Zu einem physiologischen Isoformenswitch von der β- zur α-Isoform wie im Ventrikel erwachsener Ratten kam es also nicht. Deutlich unterschied sich aber der ANP und ppENK Gehalt, der in den EHTs 8-10fach niedriger war als in den Monolayerkulturen (siehe Abbildung 20 B). Umgekehrte Verhältnisse zeigen sich für VEGF (siehe Abbildung 22 B). Hier war die Expression in den EHTs etwa doppelt so hoch wie in den zehn Tage alten Kardiomyozyten.

Verschiedene Faktoren bei der Herstellung und Kultivierung der EHTs können zu Unterschieden in der Genexpression im Vergleich zur Monolayerkultur beitragen, ohne dass im einzelnen belegt werden kann, welcher der Faktoren welche Veränderung

bewirkt. Dabei wurden für die Untersuchungen bewusst die optimierten Bedingungen gewählt, die für eine dreidimensionale Kultivierung erforderlich waren, und die sich von den günstigsten Bedingungen für die zweidimensionale Kultivierung unterschieden. So enthielt das Kulturmedium, das für der Herstellung der EHTs benötigt wurde, 10% Serum, das von Pferden und nicht wie in der zweidimensionalen Kultur von fetalen Rindern stammte. Matrigel®, das zum Wachstum erforderlich war, ist ein nicht genau definiertes Bioprodukt aus dem Aszites von Mäusen, die am Engelbrecht-Holm-Swarm Tumor erkrankt sind. Neben Laminin (55%), Collagen Typ IV (30%), Entactin (10%) und dem Heparan Sulfat Proteoglykan (5%) enthält Matrigel Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (11-24 ng/ml), TGF-β (1,7-4,7 ng/ml), EGF (0,5-1,3ng/ml), PDGF (5-48 pg/ml), bFGF (<0,1-0,2 pg/ml), NGF (<0,2 ng/ml) und eine Reihe weniger charakterisierter Faktoren wie Plasminogen (Herstellerinformation Fa. Becton Dickinson und Fa. Tebu, Farina et al. 1996). Insbesondere diese Bestandteile können von Bedeutung für die Genexpression sein. Das Kulturmedium der EHTs enthielt kein BrdU, da es beim Wachstum in der Kollagenmatrix auch ohne diesen Zusatz nicht zu einem Überwuchern von Nichtkardiomyozyten kommt. Die Kardiomyozyten wuchsen in der Kollagenmatrix zumindest in den Randbereichen geometrisch gleichförmig angeordnet und kontrahierten deshalb gegen einen gerichteten mechanischen Widerstand. Dieses unterschiedliche mechanische Verhalten könnte insbesondere von Bedeutung für die Expression kontraktiler Proteine und der α- und β-MHC Isoformen sein. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob in der dreidimensionalen Anordnung in der Kollagenmatrix die Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen ebenso gut ist wie in der Monolayerkultur. Da sowohl für VEGF als auch β-MHC eine erhöhte Expression unter Hypoxiebedingungen beschrieben ist (Minenchenko et al. 1994, Pissarek et al. 1997), könnte die erhöhte Expression von VEGF und der höhere β/α-MHC Quotient in den EHTs als Hinweis für eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten in der Kollagenmatrix interpretiert werden. Dagegen spricht jedoch, dass die Diffusionstrecke bei einer Dicke der EHTs von ca. 200 µm und einem überwiegend randständigen Wachstum der Kardiomyozyten sehr kurz ist und dass man bei einer chronischen Hypoxie nicht ohne weiteres erwarten könnte, dass vitale spontan schlagende Zellen langfristig im Gewebeverband überleben.

4.5.2. Vergleich der EHTs mit den zwei Monaten alten Ventrikeln

Es war eine der zugrundeliegenden Hypothesen der Arbeit, dass neonatale Rattenkardiomyozyten, die in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert werden, hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters dem intakten myokardialen Gewebe gleichen. Diese Hypothese muss nach den vorliegenden Daten zweifellos zurückgewiesen werden. Zwar entsprachen die Expression von ppENK und ANP dem intakten Gewebe, doch gab es auch erhebliche Unterschiede. Die Myosin Isoformen nahmen in ihrem Expressionsniveau erheblich ab und die mRNA von PLB und SERCA war wie in der zweidimensionalen Kultur ebenfalls deutlich niedriger mit einem höheren PLB/SERCA Verhältnis als im Gewebe. Angesichts des histologisch nachweisbaren ausgebildeten kontraktilen Apparates mit Querstreifung (Zimmermann et al. 2000) scheint dieses Ergebnis nicht in Übereinstimmung mit der höheren Differenzierung der Zellen zu stehen. Möglicherweise liegt diesem Widerspruch jedoch eine Inhomogenität der Zellen in den EHTs zugrunde. Hochdifferenzierte gerichtete Zellen waren überwiegend in den Randregionen der Kollagengele zu finden, während im Zentrum eine solche Ausrichtung nicht stattfand (Zimmermann et al. 2000). Die Daten der mRNA Messung spiegeln dagegen einen Querschnitt aus allen Zellen wider.

Funktionell lässt sich aufgrund der mRNA Daten wie bei der zweidimensionalen Kultur keine Aussage treffen. Es lassen sich jedoch entsprechend die gleichen Vermutungen wie unter 4.4 ausgeführt anstellen. Auch für die EHTs könnte man aufgrund der Abnahme der mRNA für kontraktile Proteine und für Proteine der Calciumhomöostase des sarkoplasmatischen Retikulums einen verlangsamten Kontraktionsablauf mit einer geringeren Energieaufwendung für den intrazellulären Calciumtransport und die Kontraktion vermuten. Dies muss jedoch in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Damit scheint das Wachstum der Kardiomyozyten in der dreidimensionalen Matrix unter den gewählten Bedingungen zwar einen Teil der Änderungen zu verhindern, die die zweidimensionalen Kulturen zeigen, eine dem physiologischen Zustand vergleichbare Gewebeausbildung wird jedoch, gemessen an der Genexpression, nicht erreicht. Es ist denkbar, dass weitere Modifizierungen der Kulturbedingungen, wie das Ausüben von

kontinuierlichen passiven Kräften, Änderung der Kollagenmatrix und die Kultivierung von gemischten Zellpopulationen, die auch nichtmyozytäre Myokardzellen enthalten, zu einer weiteren Annäherung der Kulturen an das intakte Myokard führen kann.

5. Zusammenfassung

Primärkulturen von Kardiomyozyten stellen ein weitverbreitetes Modell in der Herz-Kreislaufforschung dar. In vieler Hinsicht ist bisher jedoch unbekannt, inwieweit die isolierten Zellen unter Kulturbedingungen überhaupt dem intakten Gewebe entsprechen. Das Ziel dieser Untersuchung war es deshalb, Kardiomyozyten von Wistar-Ratten unter verschiedenen Kulturbedingungen, in zweidimensionaler Primärkultur und in einer dreidimensionalen Kultivierungsform (EHT) mit intaktem Myokard von Ratten unterschiedlichen Alters (0-3, 4-7 Tage und 2 Monate nach der Geburt) zu vergleichen. Es wurde die mRNA Expression einer Reihe von Genen, die für verschiedene Zellfunktionen als repräsentativ gelten können, untersucht, sowie Schlagfrequenz, Proteingehalt und Zellzahl.

Generell fand sich für alle Gene unmittelbar nach der Isolierung der Kardiomyozyten ein höherer mRNA-Gehalt, standardisiert auf die 18S-rRNA Expression, die unter allen Kulturbedingungen gleich war. Im Verlauf von zehn Zellkulturtagen nahm der mRNA-Gehalt dann für Giα-2, Gsα, Gβ, α/β-MHC, PLB, SERCA2 und VEGF wieder ab, während die ppENK-mRNA weiter anstieg. Verglichen mit dem intakten Gewebe zeigte sich eine drastisch reduzierte Expression kontraktiler Proteine und eine Zunahme von ppENK und dem Hypertrophiemarker ANP.

In den EHTs war die Genexpression hinsichtlich des kontraktilen Apparates, der Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums und der G-Proteine vergleichbar mit der in den zweidimensionalen Kulturen. ppENK und ANP waren dagegen nicht höher als im intakten Gewebe exprimiert. Damit nahmen die EHTs eine Zwischenstellung zwischen intaktem Myokard und Monolayerkultur ein, ohne dass durch die dreidimensionale Kultivierung ein dem intakten Gewebe vergleichbarer Zustand erreicht wurde.

Diese gravierenden Unterschiede zwischen den kultivierten Zellen und dem intakten Gewebe lassen vermuten, dass es auch hinsichtlich funktioneller Eigenschaften erhebliche Unterschiede gibt. Dies muss beispielsweise bei der Untersuchung von Signaltransduktionswegen oder kontraktilen Mechanismen Berücksichtigung finden. Kultivierte Kardiomyozyten stellen damit nicht nur eine aufgereinigte Zellpopulation dar, sondern entwickeln eigene Charakteristika, die keine physiologische Entsprechung im intakten Myokard haben.

6. Literaturverzeichnis

Allen I, Gaa S, Rogers T (1988) Changes in expression of a functional Gi protein in cultured rat heart cells. Am J Physiol 255: C51-C59

Allen M, Engelmann S, Engelmann GL (1991) Contractile activity modulates myosin heavy chain-β expression in neonatal rat heart cells. Am J Physiol 261: H1067-H1077

Argentin S, Drouin J, Nemer M (1987) Thyroid hormone stimulates rat pro-natriodilatin mRNA levels in primary cardiocyte cultures. Biochem Biophys Res Commun 146: 1336-1341

Bartel S, Karczewski P, Krause EG (1996) G proteins, adenylyl cyclase and related phosphoproteins in the developing rat heart. Mol Cell Biochem 163-164: 31-38

Bazan A, Van de Velde E, Fraeyman N (1994) Effect of age on beta-receptors, Gs alpha- and Gi alpha- proteins in rat heart. Biochem Pharmacol 48: 479-486

Boluyt M, Younes A, Caffrey J, O'Neil L, Barron B, Crow M, Lakatta E (1993) Age-associated increase in rat cardiac opiod production. Am J Physiol 265: H212-H218

Caffrey J, Boluyt M, Younes A, Barron B, O'Neill L, Crow M, Lakatta E (1994) Aging, Cardiac präproenkephalin mRNA and enkephalin peptides in the fisher 344 rat. J Mol Cell Cardiol 26: 701-711

Capelli V, Bottinelli R, Poggesi C, Moggio R, Reggiani C (1989) Shortening velocity and myosin and myofibrillar ATPase activity related to myosin isoenzym composition during postnatal development in rat myocytes. Circ Res 65: 446-457

Carrier L, Boheler K, Chassagne C, de la Bastie D, Wisnewsky C, Lakatta E, Schwartz K (1992) Expression of the sarcomeric actin isogenes in the rat heart with development and senescence. Circ Res 70: 999-1005

Chan YL, Gutell R, Noller HF, Wool IG (1984) The nucleotide sequence of a rat 18 S ribosomal ribonucleic acid gene and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid. J Biol Chem 259: 224-230

Chen YF, Durand J, Claycomb WC (1997) Hypoxia stimulates atrial natriuretic peptide gene expression in cultured atrial cardiocytes. Hypertension 2: 75-82

Chizonite RA, Zak R (1984) Regulation of myosin isoenzyme composition in fetal and neonatal rat ventricel by endogenous thyroid hormones. J Biol Chem 259: 12628-12632

Claffey KP, Wilkinson WO, Spiegelman BM (1992) Vascular endothelian growth factor. Regulation by cell differention and activated second messenger pathway. J Biol Chem 267: 16317-16322

Clarke DM, Loo TW, MacLennan DH (1990) Functional consequenses of alterations to polar amino acids located in the transmembrane domain of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 264: 6262-6267

Clubb FJ Jr, Penney DG, Baylerian MS, Bishop SP (1986) Cardiomegaly due to myocytes hyperplasia in perinatal rat exposed to 200ppm carbon monoxide. J Mol Cell Cardiol 18: 477-486

Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Hymore BL, Leimgruber R, Feder J (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem 254: 20017-20024

Cui Y, Shen Y, Kalthof B, Iwase M, Sato N, Uechi M, Vatner S, Vatner D (1996) Identification and functional role of β-adrenergic receptor subtypes in primate and rodent: in vivo versus isolates myocytes. J Mol Cell Cardiol 28: 1307-1317

Currie DM, Cole BR, Siegel NR, Kok KF, Adams SP, Galluppi GR, Needleman P (1984) Purification and sequence of bioactive atrial peptides (Atriopeptins). Science 223: 67-69

Day ML, Schwartz D, Wiegand RC, Stockman PT, Brunnert SR, Tolunay HE, Currie MG, Standaert DG, Needleman P (1987) Ventricular atriopeptin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. Hypertension 9: 485-491

de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenouse injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci 28: 89-94

Dechesne CA, Leger JOC, Leger JC (1987) Distribution of alpha- and beta-myosin heavy chain in the ventricular fibers of the postnatal developing rat. Dev Biol 123: 169-178

Decker R, Cook M, Behnke-Barclay M, Decker M (1995) Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading. Circ Res 77: 544-555

Dow JW, Harding NGL, Powell T (1981) review: Isolated cardiac myocytes. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue. Cardiovasc Res 15: 483-514

Dumont M, Oulette M, Brakier-Gingras L, Lemaire S (1991) Circadian regulation of the biosynthesis of cardiac met-enkephalin and precursurs in normotensiv and spontaneosly hypertensive rats. Life Sci 48: 1895-1902

Eble DM, Cadre BM, Qi M, Bers DM, Samarel AM (1998) Contractile activity modulates atrial natriuretic factor gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol 30: 55-60

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. FASEB 11: 683-94

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelian growth factor. Endocr Rev 18: 4-25.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocr Rev 13: 18-32

Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. FASEB J 14: 669-79

Fitzgerald M, Neylon C, Marks E. Woodcock A (1994) Reduced ryanodine receptor content in isolated neonatal cardiomyocytes compared with the intact tissue. J Mol Cell Cardiol 26: 1261-1265

Fuji J, Marujama K, Tada M, MacLennan DH (1989) Expression and site-specific mutagenesis of phospholamban. Studies of residues involved in phosphorylation and pentamer formation. J Biol Chem 264: 12950-12955

Fuji J, Ueno A, Kitano K, Tanaka S, Kadoma M, Tada M (1987) Complete complementary DNA-derived amino acid sequenze of canine cardiac phopholamban. J Clin Invest 79: 301-304

Gadbut A, Toupin D, Kilbourne E, Galper J (1994) Low density lipoproteins induce parasympathetic responsiveness in embryonic chick ventricular myocytes in parallel with a coordinate increase in expression of genes coding for the M_2muscarinic receptor, Gα-i2, and the acetylcholine-sensitive K^+ channel. J Biol Chem 48: 30707-30712

Ganim J, Luo W, Ponniah S, Grupp I, Kim H, Ferguson D, Kadambi V, Neumann J, Doetschman T, Kranias E (1992) Mouse phospholamban gene expression during development in vivo and in vitro. Circ Res 71: 1021-1030

Gombosová I, Boknik P, Lüss H, Knapp F, Müller U, Müller T, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1997) Calcium regulating proteins in neonatal and adult rat heart. Naunyn-Schmiedenberg‘s Arch Pharmacol 355 (Suppl): R 95

Gorza L, Pauletto P, Pessina AC, Sartone S, Schiaffino S (1981) Isomyosin distribution in normal and pressure-overloaded rat ventricular myocardium: an immunhistochemical study. Circ Res 49: 1003-1009

Hao JM, Rabkin SW (1997) Increased cardiac ppENK mRNA in cardiac hypertrophy and effects on blood pressure of its peptide products. Am J Physiol 272: H2885-2894

Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Igaki T, Yamashita J, Masuda I, Yoshimasa T, Tanaka I, Saito Y; Nakao K (1997) Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. Circulation 96: 3737-3744

Harary I, Farley B (1960) In vitro studies on single beating heart cells. Science 131: 1674-1675

Hicks M, Shigekawa M, Katz AM (1979) Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. Circ Res 44: 384-391

Holaday JW (1978) Naloxone reversal of endotoxin hypotension suggest role of endorphines in shock. Nature 275: 450-451

Holaday JW (1983) Cardiovascular effects of endogenous opiate system. Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 541-594

Horowits R, Winegrad S (1987) cAMP regulation of myosin ATPase activity in the maturing rat heart. Circ Res 61: 914-924

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991) The vascular endothelian growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 5: 1806-1814

Howells RD, Kilpatrick DL, Baily LC, Noe M, Udenfriend S (1986) Proenkephalin mRNA in rat heart. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1960-1963

Imanaka-Yoshida K, Amitani A, Ioshii S, Koyabu S, Yamakado T, Yoshida T (1996) Alteration of expression and distribution of the Ca^{2+}-storing proteins in endo/sarcoplasmic reticulum during differentiation of rat cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 28: 553-562

Ito H, Hirata Y, Hiroe Y, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circ Res 69: 209-215

Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F (1993) Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. Circulation 87: 1715-1721

Johnson MW, Mitch WE, Wilcox CS (1985) The cardiovascular actions of morphine and the endogenous opioid peptides. Prog Cardiovasc Dis 27: 435-450

Jones DT, Reed RR (1987) Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. J Biol Chem 262: 14241-14249

Kikuchi K, Nakao K, Hayashi K, Morii N, Sugawara A, Sakamoto M, Imura H, Mikawa H (1987) Ontogeny of atrial natriuretic polypeptide in the human heart. Acta Endocrinol 115:211-217

King KL, Winer J, Phillips DM, Quach J, Williams PM, Mather JP (1998) Phenylephrine, endothelin, prostaglandin F2alpha' and leukemia inhibitory factor induce different cardiac hypertrophy phenotypes in vitro. Endocrine 9: 45-55

Kiss E, Jakab G, Kranias E, Edes I (1994) Thyroid hormon-induced alterations in phopholamban protein expression. Circ Res 75: 245-251

Kohno M, Takaori K, Matsuura T, Murakawa K, Kanayama J, Takeda T (1986) Atrial natriuretic polypeptide in atria and plasma in experimental hyperthyroidism and hypothyroidism. Biochem Biophys Res Commun 134: 178-183

Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock T (1993) Vascular endothelian growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. Am J Physiol 265: H586-592

Lachance D, Garcia R, Gutkowska J, Cantin M, Thibault G (1986) Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. Biochem Biophys Res Commun 135: 1090-1098

Lattion AL, Michel JB, Arnauld E, Corvol P, Soubrier F (1986) Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. Am J Physiol 251: H890-896

Laurent S, Marsh JD, Smith TW (1985) Enkephalins have a direct positive inotropic effect on cultured cardiac myocytes. Proc Nat Acad Sci USA 82: 5930-5934

Laurent S, Marsh JD, Smith TW (1986) Enkephalins increase cyclic adenosine monophosphate content, calcium uptake and contractile state in cultured chick embryo heart cells. J Clin Invest 77: 1436-1440

Ledda F, Mantelli A, Corti V (1985) Sensitivity to dynorphin of the presynaptic inhibitory opiate receptors of the guinea-pig heart. Eur J Pharmacol 117: 377-380

Litten RZ, Martin BJ, Low RB, Alpert NR (1982) Altered myosin isoenzyme patterns from pressure-overload and thyrotoxic hypertrophied rabbit heart. Circ Res 50: 856-864

Lompre A, Lambert F, Lakatta E, Schwartz K (1991) Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. Circ Res 69: 1380-1388

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1984) Expression of the cardiac ventricular α- and β-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. J Biol Chem 259: 6437-6446

Lompre AM, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, Thiem NV, Swynghedauw B (1979) Myosin Isoenzym redistribution in chronic heart overload. Nature 282:105-107

Lubic SP, Giacomini KM, Giacomini JC (1995) The effects of modulation of calcium influx through the voltage-sensitive calcium channel on cardiomyocyte hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 27: 917-925

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York

Masatoshi M (1984) Structure of rat atrial natriuretic factor precursur deduced from cDNA sequence, Nature 309: 21

Mekhail NA, Doss DN, Bravo EL, Estafanous FG (1994) Fentanyl stimulates atrial natriuetic peptide secrection. J Mol Cell Cardiol 26: 425-434

Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J (1994) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. Lab Invest 71: 374-379

Miyamoto A, Kawana S, Kimura H, Ohshika H (1994) Impaired expression of Gs alpha protein mRNA in rat ventricular myocardium with aging. Eur J Pharmacol 266: 147-154

Moorman A, Vermeulen J, Koban M, Schwartz K, Lammers W, Boheler K (1995) Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. Circ Res 76: 616-625

Morano I, Gertner J, Ruegg JC, Ganten U, Ganten D (1990) Regulation of myosin heavy chain expression in the heart of hypertensive rats by testosteron. Circ Res 66: 1585-1590

Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1989) Molecular basis of cardiac performance: plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. J Clin Invest 84: 1693-1700

Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Alpert NR, Periasmy M (1989) Regulation of myocardial Ca^{2+} -ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormon. Proc Natl Acad Sci USA 86: 29662970

Neer E, Clapham DE (1988) Roles of G-protein subunits in transmembran signalling. Nature 333: 129-134

Nemer M, Chamberland M, Sirois D, Argentin S, Drouin J, Dixon RA, Zivin RA, Condra JH (1984) Gene structure of human cardiac hormone precursor, pronatriodilatin. Nature 312: 654-656

Oikawa S (1984) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide, Letters to Nature, Nature 309: 21

Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi OP,_Pajusola K, Olofsson B, Eriksson U, Joukov V, Palotie A, Alitalo K (1996) Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to_chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. Circulation 93: 1079-1082

Padieu P, Frelin C, Pinson A, Charbonne F, Athias P (1978) Effect of enviromental factors and tissue culture methodology in producing and studying cultured cardiac cells. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab 12: 609-620

Parker T, Chow K, Schwartz F, Schneider M (1990) Differential regulation of skeletal α-actin transcription in cardiac muscle by two fibroblast growth factors. Proc Natl Acad Sci 87: 7066-7070

Parker TG, Packer SE, Schneider MD (1990) Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. J Clin Invest 85: 507-514

Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER (1997) Vasoactive peptides modulates vascular endothelian cell growth factor production and endothelian cell proliferation and invasion. J Biol Chem 272: 17097-17103

Pegg W, Michalak M (1987) Differentiation of sarcoplasmic reticulum durin cardiac myogenesis. Heart Circ Physiol 21: H22-H31

Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D (1990) Regulation of hexose transport in aortic endothelian cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor alpha, but not by insulin. J Biol Chem 265: 18051-18054

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991) Vascular endothelian growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelian cells. Biochem Biophys Res Commun 181: 902-908

Pinson A, Padieu P, Harary I (1987) Techniques for culturing heart cells. in: Pinson a (ed) the heart cell in culture, vol 1. CRC, Boca Raton, pp 7-22

Pissarek M, Bigard X, Mateo P, Guezennec CY, Hoerter JA (1997) Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. Am J Physiol 272: H1690-1695

Pope B, Hoh JFY, Weed A (1980) The ATPase activities of rat myosin isoenzymes. FEBS Lett 188: 205-208

Roberts WG, Palade G (1995) Increased microvascular permeability and endothelian fenestration induced by vascular endothelian growth factor. J Cell Sci 108: 2369-2379

Rohrer DK, Hartong R, Dillmann WH (1991) Influence of thyroid hormon and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-acting DNA elements that confer responsivness to thyroid hormon but not retinoid acid. J Biol Chem 266: 8638-8646

Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T (1989) Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. J Clin Invest 83: 298-305

Sakamoto S, Liand CS (1989) Opiate rezeptor inhibition improves the blunted bororeflex function in concious dogs with right-sided congestive heart failure. Circulation 80: 1010-1015

Samuels HH (1997) Chromatin, transcription factors, and regulation of gene expression. In: O'Malley BW, Birnbaumer L. (eds) Hormones and Signaling, Academic Press 3: 35-74

Sheer D, Morkin E (1984) Myosin isoenzyme expression in rat ventricle: effects of thyroid hormon analogs, catecholamine, glucocorticoids and high carbohydrate diet. J Pharmacol Exp Ther 220: 872-878

Shigekawa M, Finegan J-AM, Katz AM (1976) Calcium transport ATPase of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with that of rabbit fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 251: 6894-6900

Simpson PC, Long CS, Waspe LE, Henrich CJ, Ordah CP (1989) Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 21: 79-89

Speicher D, Peace J, McCarl R (1981) Effects of plating density and age in culture on growth and cell division of neonatal rat heart primary cultures. IN VITRO Vol. 17 No. 10

Spindler SR, Mellon SH, Baxter JD (1982) Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor cells. J Biol Chem 257: 11627-11632

Springhorn J, Claycomb W (1989) Präproenkephalin mRNA expression in developing rat heart and in cultured ventricular cardiac muscle cells. Biochem J 258: 73-78

Takemura G (1989) Ventricular expression of atrial natriuetic polypeptide and ist relation with hemodynamics and histology in dilates human hearts. Circulation 80: 1137-1147

Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 266: 11947-11954

Tokola H, Salo K, Vuolteenaho O, Ruskoaho H (1994) Basal and acidic fibroblast growth factor-induced atrial natriuretic peptide gene expression and secretion is inhibited by staurosporine. Eur J Pharmacol 267: 195-206

Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992) Vascular endothelian growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelian cells. J Cell Physiol 153: 5567-562

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G (1990) Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 265: 19461-19469

Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I, Drexler H (1995) Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na^{+}-Ca^{2+}-exchanger and SERCA2 in rat heart. J Mol Cell Cardiol 27: 1689-1701

Vincan E, Neylon C, Graham R, Woodcock E (1995) isolation of neonatal cardiomyocytes reduces the expression of the GTP-binding protein, $G_{h.}$ J Mol Cell Cardiol 27: 2393-2396

Vitolo E, Castini, Colombo A, Collini P, Gueli-Allietti, Bianchi M, Panarai AE (1990) Plasma beta-endorphin and beta-lipotropin in congestive heart failure. Acta cardiol 45: 65-74

Watras J (1988) Regulation of calcium uptake in bovine aortic sarcoplasmic reticulum by cyclic AMP-dependent protein kinase. J Mol Cell Cardiol 20: 711-723

Weil J, Eschenhagen T, Fleige G, Mittmann C, Orthey E, Scholz H (1998) Localization of preproenkephalin mRNA in rat heart: selective gene expression in left ventricular myocardium. Am J Physiol 275: H378-384

Witte K, Parsa-Parsi R, Vobig M, Lemmer B (1995) Mechanisms of the circadian regulation of ß-adrenoceptor density and adenylyl cyclase acivity in cardiac tissue from normotensiv and spontaneously hypertensive rats. J Mol Cell Cardiol 27: 1195-1202

Woodcock EA, Tanner JK, Fullerton M, Kuraja IJ (1992) Different pathways of inositol phosphate metabolism in intact neonatal rat hearts and isolated cardiomyocytes. Biochem J 281: 683-688

Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y (1997) Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. Genomics 42: 483-488

Yamanaka M, Greenberg B, Johnson L, Seilhamer J, Brewer M, Friedemann T, Miller J, Atlas S, Laragh J, Lewicki J (1984) Cloning and sequence analysis of the cDNA for the rat atrial natriuretic factor precursor. Nature 309: 719-722

Younes A, Boluyt M, O'Neill L, Meredith A, Crow M, Lakatta E (1995) Age-associated increase in rat ventricular ANP gene expression correlates with cardiac hypertrophy. Am J Physiol 269: H1003-H1008

Zagon IS, Rhodes RE, McLaughlin PJ (1985) Distribution of enkephalin immunoreactivity in germinative cells of developing rat cerebellum. Science 227: 1049-1051

Zagon IS, Rhodes RE, McLaughlin PJ (1986) Localization of enkephalin immunoreactivity in diverse tissues and cells of the developing and adult rat. Cell Tissue Res 246: 561-565

Zak R (1974) Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. Circ Res 34/35 [Suppl. II]: II17-II26

Zamir N, Haass M, Dave JR, Zukowska-Grojec Z (1987) Anterior pituitary gland modulates the release of atrial natriuretic peptides from cardiac atria. Proc Natl Acad Sci USA 84: 541-545

Zerain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990) Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene. J Biol Chem 265: 4670-4677

Zimmerman RS, Gharib H, Zimmerman D, Heublein D, Burnett JC Jr (1987) Atrial natriuretic peptide in hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab 64: 353-355

Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. Biotechnol Bioeng 68: 106-14

7. Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits wie folgt publiziert:

Mittmann C, Eschenhagen T, Münstermann U, Ptak M, Scholz H, Weil J, Zimmermann W.-H. (1997) Gene Expression of Cardiomyocytes growing in a three dimensional Collagen Matrix. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 355 (Suppl): R 96

Ptak M, Eschenhagen T, Mittmann C, Scholz H, Weil J (1997) Die Expression kardialer Gene der Ratte unterliegt einer unterschiedlichen Entwicklung in kultivierten Herzmuskelzellen und im intaktem Herzen. Z Kardiol 86: 184

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Hasso SCHOLZ und Herrn Professor Dr. med. Thomas ESCHENHAGEN danke ich für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die vorbildliche Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion und von wissenschaftlichen Beiträgen. Durch die Möglichkeit der Teilnahme an wissenschaftlichen Kolloquien und Kongressen wurde mir ermöglicht, den kritischen Umgang und die Analyse wissenschaftlicher Arbeiten zu erlernen.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Clemens MITTMANN für die vorbildliche Betreuung bei der Konzeption, für die Einarbeitung in die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden und die kritische Beurteilung der Promotion. Mit Rat und Tat stand er zu jeder Zeit an meiner Seite und hat durch die hervorragende Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion den wesentlichen Anteil an der Entstehung dieser Promotion.

Herrn Wolfram ZIMMERMANN danke ich für die Herstellung der verwendeten EHTs. Herrn Ralf BENNDORF danke ich für die Klonierung der VEGF-cDNA.

Frau Ursula MÜNSTERMANN, Frau Monika NOSE, Frau Ellen ORTHEY und Frau Cornelia WÖRMANN gilt mein Dank für die geduldige Einarbeitung im Labor und die Bereitschaft, mir mit Ihren Erfahrungen im Umgang mit den verschiedenen Methoden zur Seite zu stehen. Durch das nette, freundschaftliche Zusammenarbeiten sorgten sie für eine angenehme Atmosphäre, die mir das Anfertigen dieser Promotion erleichtert hat.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Gerrit FLEIGE, Frau Dr. med. Stefanie GSELL, Herrn Meinhard VOSS, Herrn Dr. med. Joachim WEIL für das freundschaftliche und hilfsbereite Miteinander.

Ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen, die mich immer liebevoll unterstützt und mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht hat.

9. Lebenslauf

Zur Person

Matthias Ptak
geboren am 4. Mai 1971 in Hamburg

Eltern

Vater:	Richard Bohlmann geb. Ptak, Programmierer
Mutter:	Rita Ptak geb. Stiebel, Bibliothekarsassistentin
Bruder:	Jens Schierhorn geb. Ptak, Erzieher

Schulausbildung

08/77 - 07/81: Grundschule Hamburg-Hausbruch

08/81 - 07/87: Gesamtschule Süderelbe

08/87 - 07/90: gymnasiale Oberstufe der Gesamtschule Harburg

Wehr-/Ersatzdienst

08/90 - 03/92: Krankenhaus Mariahilf, Hamburg

- Ausbildung zum Pflegediensthelfer

Studienlaufbahn

04/92: Humanmedizin Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg

- 1994 Physikum
- 1995 1. Staatsexamen
- 1998 2. Staatsexamen
- 1999 3. Staatsexamen

Arzt im Praktikum

Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg

6/99 - 3/00: I. Medizinische Abteilung, Gastroenterologie
Leitender Krankenhausarzt Prof. Dr. med. F. Hagenmüller

6/00 - 8/00: Zentrale Notaufnahme

3/00 - 12/00: III. Medizinische Abteilung, Kardiologie/Pneumologie
Leitender Krankenhausarzt Prof. Dr. med. K. von Olshausen

Assistenzarztzeit

seit 02/01: Klinikum-Lippe-Detmold GmbH
Medizinische Klink I
Gastroenterologie, Hämatologie/Onkologie, Pulmonologie
Leitender Krankenhausarzt Prof. Dr. med. habil. E.-H. Egberts

10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Vergleichende Untersuchung von Genexpressionsmustern in zweidimensional und dreidimensional kultivierten Herzmuskelzellen und im intakten Myokard der Ratte.

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Hasso SCHOLZ mit der Unterstützung von Herrn Dr. med. Clemens MITTMANN ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 13.03.2002

Matthias Ptak