

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz**

**Aktivator Protein 2 vermittelte Regulation der
Gentranskription in Herzmuskelzellen**

**Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von
Boschin, Sylvia geb. Kemper
aus
Soest**

Münster 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität.

Dekan:	Univ. Prof. Dr. med. H. Jürgens
1. Berichterstatter:	Univ. Prof. Dr. med. F.U. Müller
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Böcker
Tag der mündlichen Prüfung:	22.11.2005

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Münster

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. F. U. Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. D. Böcker

ZUSAMMENFASSUNG

Aktivator Protein 2 vermittelte Regulation der Gentranskription in Herzmuskelzellen

Sylvia Boschin

Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens, bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck ein den metabolischen Bedürfnissen des Körpers entsprechendes Herzzeitvolumen zu fördern und stellt das häufige gemeinsame Endbild verschiedener Erkrankungen des Herzens dar. Für morphologische und funktionelle Veränderungen des insuffizienten Herzens wird unter anderem eine veränderte Expression von kardialen regulatorischen Genen als Folge einer chronischen Stimulation des β -adrenergen und cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges verantwortlich gemacht. Das Aktivator Protein 2 (AP-2) vermittelt eine Aktivierung der Gentranskription nach Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges, und eine erhöhte Expression von AP-2 α wurde in Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß AP-2 α in embryonalen Hühnerkardiomyozyten exprimiert wird und daß eine Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges mit Forskolin bzw. Isoprenalin zu einer Aktivierung der durch das AP-2 Element vermittelten Transkription führt, die mit einer vermehrten Expression von AP-2 α einhergeht. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die in früheren Untersuchungen in insuffizienten menschlichen Herzen beobachtete gesteigerte Expression von AP-2 α (i) Folge einer chronischen Stimulation des β -adrenergen Rezeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasma-Katecholamine ist und (ii) zu einer Aktivierung von AP-2 Element kontrollierten Zielgenen führt und so zu der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen beiträgt.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2005

meinen Eltern
Ria und Hans-Georg Kemper

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Methoden	7
2.1 Primärkultur von Hühnerkardiomyozyten	
2.1.1 Isolation von Hühnerkardiomyozyten	7
2.1.2 Kulturbedingungen	8
2.1.3 Behandlung der Zellen	9
2.1.4 Aufarbeitung der Zellen	9
2.1.5 Substanzen, Lösungen und Geräte	10
2.2 Messung der AP-2 Element vermittelten transkriptionellen Aktivität	13
2.2.1 Transfektion	13
2.2.2 Herstellung von Zellextrakten	14
2.2.3 Dual-Luziferase Reporter Assay	14
2.2.4 Substanzen, Lösungen und Geräte	15
2.2.5 Statistische Auswertung	15
2.3 Immunologische Bestimmung von AP-2 α	16
2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose-Membran	16
2.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen	17
2.3.2.1 Immunologischer Nachweis von AP-2 α und Troponin	18
2.3.2.2 Immunologischer Nachweis von Calsequestrin	19
2.3.2.3 Kontrolle des immunologischen Signals durch AP-2 α -Peptid	19
2.3.2.4 Linearer Bereich der Bestimmung	20
2.3.3 Geräte, Antikörper, Lösungen und Substanzen	19
2.3.4 Auswertung	23

3. Ergebnisse	27
3.1 AP-2 Element vermittelte Aktivierung der Gentranskription in Hühnerkardiomyozyten	27
3.2 Expression von AP-2 α in Hühnerkardiomyozyten	27
3.2.1 Linearität des immunologischen Signals von AP-2 α und Tnl	28
3.2.2 Quantifizierung von Tnl	28
3.2.3 Einfluß der Behandlung mit Forskolin, Isoprenalin und Retinsäure auf die Expression von AP-2 α in Hühnerkardiomyozyten	29
3.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Expression von AP-2 α nach Stimulation mit Forskolin	30
3.2.5 Expression von AP-2 α nach Stimulation mit Isoprenalin	30
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	53
6. Abkürzungsverzeichnis	55
7. Literaturverzeichnis	58
8. Danksagung	72
9. Lebenslauf	73

1. Einleitung

Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens, bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck ein den metabolischen Bedürfnissen des Körpers entsprechendes Herzzeitvolumen zu fördern (WHO 1992). Als wesentliche Ursache für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität in westlichen Industrienationen (Cohn 1986) betrifft sie weltweit schätzungsweise 15 Millionen Menschen (Packer 1987). Die Letalität der Herzinsuffizienz ist mit der Sterblichkeit bösartiger Tumoren vergleichbar (Levy et al. 2000).

Die Herzinsuffizienz ist das gemeinsame Endbild verschiedener Erkrankungen des Herzens. Dazu zählen primär myokardiale Erkrankungen wie z.B. die ischämische Kardiomyopathie (ICM) als Folge einer koronaren Herzerkrankung oder die idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM) mit weitgehend unbekannter Genese. Außerdem tritt Herzinsuffizienz im Gefolge extrakardialer Ursachen, z.B. einer arteriellen Hypertonie, auf. Zusammengefasst zählen DCM und ICM mit mehr als 90 % zu den häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation (Durand et al. 1995; McMinn and Ross 1995).

Das insuffiziente Herz ist durch charakteristische morphologische Veränderungen gekennzeichnet. Diese umfassen eine Dilatation des Herzens mit gleichzeitiger Hypertrophie sowie eine Fibrosierung des Myokards (Braunwald 1997). Neben diesen morphologischen Auffälligkeiten zeigt das insuffiziente Herz charakteristische Unterschiede der myokardialen Funktion im Vergleich zum nicht insuffizienten Myokard; diese charakteristischen Veränderungen umfassen u.a. Störungen der Kontraktion und der Relaxation des Myokards sowie Arrhythmien (Braunwald 1997; Scheubel et al. 2002). Zu den Störungen der myokardialen systolischen und diastolischen Funktion gehören im Einzelnen eine verminderte Kontraktionskraft des insuffizienten Herzmuskels, eine verlangsamte Relaxation sowie eine verminderte Effektivität und Potenz von β -Adrenozeptor-Agonisten. Diese und weitere Veränderungen der Funktion des insuffizienten Myokards lassen sich zumindest zum Teil durch eine veränderte Expression verschiedener regulatorischer Proteine erklären

(Übersicht bei Mittmann et al. 1998) und eine veränderte Regulation der Genexpression wird als bedeutsam für die Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz angesehen. So geht beispielsweise eine verminderte Dichte von β_1 -Rezeptoren (Steinfarth et al. 1993) im insuffizienten Herzen mit einer gesteigerten Expression des inhibitorischen G-Proteins (G_i) einher (Neumann et al. 1988), so daß die verminderte Ansprechbarkeit des insuffizienten Myokards auf Stimulation mit β -Adrenozeptor-Agonisten zumindest zum Teil durch ein Überwiegen hemmender Einflüsse auf die Adenylylcyclase erklärt werden kann. Eine gesteigerte oder verminderte Expression vieler weiterer regulatorischer Proteine wurde im insuffizienten Herzen beschrieben (Mittmann et al. 1998), wobei die funktionelle Bedeutung in vielen Fällen nicht geklärt ist.

Die der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen zugrunde liegenden Mechanismen sind im Detail bislang nicht bekannt. Klinische und experimentelle Studien führten jedoch zu der Hypothese, daß eine chronische Stimulation des β -Adrenozeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasmakatecholamine einen wichtigen pathogenetischen Faktor der Herzinsuffizienz darstellt (Daly and Sole 1990). So korrelieren die erhöhten Plasmakatecholaminspiegel bei herzinsuffizienten Patienten invers mit deren Prognose (Daly and Sole 1990). Ebenso bewirken β -Adrenozeptor-Agonisten eine Verschlechterung der Prognose der Herzinsuffizienz (Felker et al. 2001). Umgekehrt führt eine langfristige Behandlung herzinsuffizienter Patienten mit β -Adrenozeptor-Antagonisten unter Beachtung bestimmter Dosierungsrichtlinien (u.a. sehr langsame Steigerung der Dosis) und Einschlusskriterien zu einer Verbesserung sowohl der Prognose als auch von klinischen und hämodynamischen Parametern (Packer et al. 1996) und zu einer Rückbildung charakteristischer Expressionsveränderungen (Motomura et al. 1990; Sigmund et al. 1996). Diese klinischen Befunde stehen im Einklang mit tierexperimentellen Daten, nach denen eine mehrtägige Stimulation durch den β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin *in-vivo* zu Veränderungen der myokardialen Funktion und Genexpression in Rattenherzen führt, die der menschlichen Herzinsuffizienz ähnlich sind (Eschenhagen et al. 1991; Mende et al. 1992). Neuere Befunde an genetischen Mausmodellen zeigen ähnliche Befunde an

transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression des β_1 -Adrenozeptors (Engelhardt et al. 1999) oder der Proteinkinase A (Antos et al. 2001). Somit können eine chronische β -adrenerge Stimulation und damit einhergehende Expressionsveränderungen als wichtige pathogenetische Faktoren der Herzinsuffizienz angesehen werden.

Die Kontrolle der Gentranskription, also der Ablesung der genomischen DNA zu mRNA, durch Transkriptionsfaktoren ist ein grundlegender Mechanismus der Expressionsregulation, der an der veränderten Genregulation im Herzen beteiligt sein könnte. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an ein Konsensus-Element in Promotorregionen entsprechend regulierter Zielgene binden. Durch Interaktion mit dem Transkriptionskomplex führen sie letztlich zu einer Aktivierung der RNA-Polymerase II und zu einer gesteigerten Transkription der entsprechenden mRNA in Abhängigkeit von verschiedenen intrazellulären Signalwegen (Hill and Treisman 1995) (s. Abb.1). Transkriptionsfaktoren können durch verschiedene Mechanismen in ihrer Aktivität beeinflusst werden: Dazu gehören u.a. (i) die Regulation der Expression von Transkriptionsfaktoren (Imagawa et al. 1987); (ii) posttranslationale Veränderungen von Transkriptionsfaktoren wie z.B. die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung durch Proteinkinasen oder -phosphatasen (Garcia et al. 1999) und (iii) die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (Mertens et al. 1998). Einige Transkriptionsfaktoren vermitteln eine Aktivierung der Transkription nach Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges. Sie könnten funktionell bedeutsame Expressionsveränderungen nach chronischer Stimulation des β -adrenergen Signaltransduktionsweges im Herzen vermitteln und dadurch für die Pathogenese der Herzinsuffizienz von großer Bedeutung sein.

Zu den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren gehört die Familie der cAMP response element (CRE) bindenden Proteine, z.B. CRE-bindendes Protein (CREB) und CRE-bindender Modulator (CREM) (Müller et al. 2001). Untersuchungen an menschlichen Herzen und an transgenen Tiermodellen legten eine Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren für die Pathogenese der

Herzinsuffizienz nahe (Müller et al. 1995; Fentzke et al. 1998; Müller et al. 1998; Müller et al. 2000; Müller et al. 2002).

Eine weitere Gruppe cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren stellen Transkriptionsfaktoren der Aktivator Protein 2 (AP-2) Familie dar. Zu dieser Familie gehören die auf verschiedenen Genen kodierten DNA-bindenden Proteine AP-2 α , β , γ und δ und ihre verschiedenen Spleißvarianten (Williams et al. 1988; Moser et al. 1995; Oulad-Abdelghani et al. 1996; Williamson et al. 1996; Zhao et al. 2001). Diese Proteine regulieren die Transkription einer Vielzahl von Genen (darunter z. B. Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren) durch das AP-2 Konsensus-Element (GCCNNNGGC) (Imagawa et al. 1987; Williams and Tjian 1991). Die für die Dimerisation von AP-2 α und die DNA-Bindung von AP-2 verantwortliche Domäne besteht aus zwei α -Helices, die durch eine lange Span-Region getrennt werden, also eine sogenannte Helix-Span-Helix-Domäne (Williams et al. 1991). Eine für die Transaktivierung notwendige glutamin- und prolinreiche Region ist in der N-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert (Williams and Tjian 1991). Die AP-2-Aktivität kann durch verschiedene Stimuli induziert werden, darunter Phorbolster, cAMP oder Retinsäure (Imagawa et al. 1987; Lüscher et al. 1989; Buettner et al. 1993; Imhof et al. 1999). AP-2 α ist in die Embryonalentwicklung neuroektodermaler, urogenitaler und ektodermaler Gewebe involviert (Philipp et al. 1994; Mitchell et al. 1998). So sind AP-2 α -gendifizierte Mäuse nicht lebensfähig und zeigen schwere kraniofaziale Dysmorphien sowie eine Anenzephalie (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996). Eine vermehrte Expression von AP-2 α in verschiedenen humanen Mammakarzinom Zell-Linien geht mit einer Induktion des Protoonkogens c-erbB-2 und mit einem hochaggressivem Tumorphänotyp einher (Bosher et al. 1995; Bosher et al. 1996), so daß AP-2 α eine funktionelle Rolle in der Regulation von Wachstum und Zelldifferenzierung zugeschrieben wird. Eine tumorsuppressive Funktion von AP-2 α wurde in Melanomzellen beschrieben (Gershenwald et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es eine durch AP-2 vermittelte Expressionsregulation in Kardiomyozyten gibt. Im einzelnen

wurde untersucht, ob eine Aktivierung der durch AP-2 vermittelten Gentranskription in Kardiomyozyten nach Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges erfolgt und ob eine solche Stimulation mit einer veränderten Expression von AP-2 α einhergeht.

Wichtige Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Befunde dar, daß AP-2 α in Herzmuskelzellen exprimiert wird und daß sowohl die durch das AP-2 Konsensus-Element vermittelte transkriptionelle Aktivierung als auch die Expression von AP-2 α unter Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges zeit- und konzentrationsabhängig gesteigert sind.

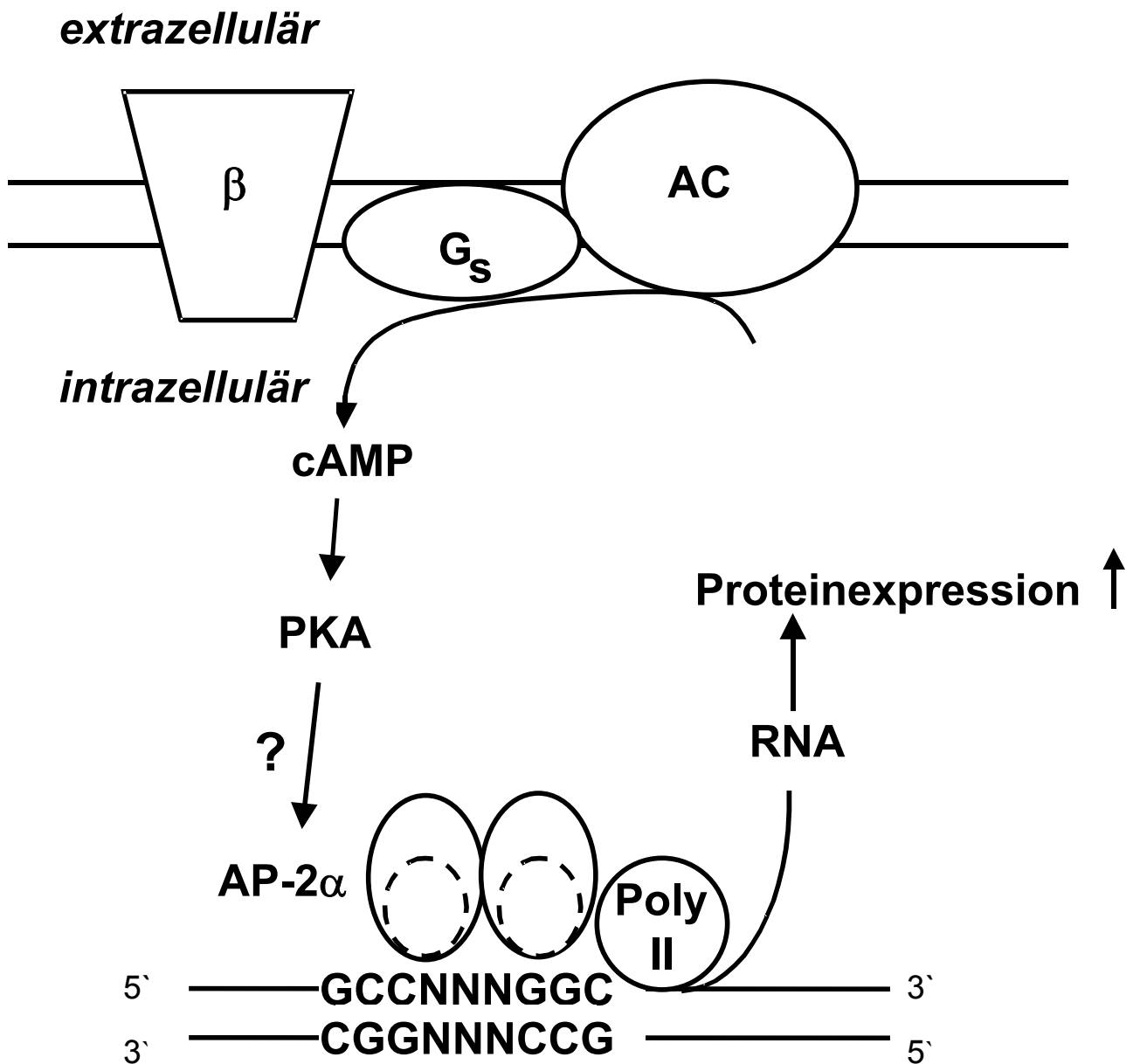


Abb.1: Vereinfachtes Schema einer Herzmuskelzelle zur möglichen funktionellen Bedeutung von AP-2 α am Herzen.

Die Aktivität der membranständigen Adenylylcyclase (AC) wird über die Stimulation von β -Adrenorezeptoren (β) und durch das stimulierende G-Protein (G_s) vermittelt. Durch die Adenylylcyclase (AC) wird der second messenger cAMP gebildet, der die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) steigert. Eine durch Aktivierung der PKA vermittelte erhöhte Expression von AP-2 könnte an der veränderten Genregulation nach chronisch β -adrenerger Stimulation im insuffizienten Herzen beteiligt sein. (Poly II = Polymerase II)

2. Methoden

2.1 Primärkultur von Hühnerkardiomyozyten

Für alle Experimente wurden 10 Tage alte Hühnerembryonen (Firma Brinkschulte in Münster Roxel) verwendet.

2.1.1 Isolation von Hühnerkardiomyozyten

Kultivierte embryonale Hühnerkardiomyozyten stellen ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Regulation der Gentranskription am Herzen dar; die Präparation erfolgte nach publizierten Protokollen (Goldspink and Russell 1994; Eschenhagen et al. 1996; Müller et al. 2000).

Nachdem die für 10 Tage bebrüteten Eier an dem stumpfen Ei-Pol mit einer Pinzette geöffnet und die Hühnerembryonen aus dem Ei herausgezogen wurden, erfolgte die Tötung durch Dekapitation. Die Herzen wurden nach Öffnung des Brustkorbes freipräpariert und in eine mit Dulbecco's Medium (DMEM) gefüllte Petrischale (10 cm Durchmesser) gegeben. Pro Präparation wurden 5-10 Herzen verwendet.

Nach Säuberung von Gefäßen und anderen Geweben wurden die Herzen mit einem Skalpell in Gewebestücke von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und anschließend bei 640 x g und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert (Hettich Zentrifuge 16/16R). Das Pellet wurde für fünf Minuten mit Trypsin (0,25%) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absinken der Gewebestücke wurde der trypsinhaltige Überstand abgesaugt, und ein zweiter Verdau der Gewebestücke mit Trypsin (0,25%) wurde für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Der trypsinhaltige Überstand wurde erneut abgesaugt und die pelletierten Gewebestücke wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit Kollagenase (0,1%) inkubiert. Der Überstand wurde in eine mit 0,15%igem Kollagen beschichtete Petrischale pipettiert, die mit 15%igem fetalen Kälberserum (FKS) angereicherte DMEM Lösung enthielt. Dabei diente der Anteil an FKS der

Inaktivierung der Kollagenase. Dieser Vorgang - Zugabe von Kollagenase und Überführen des zellhaltigen Überstandes - wurde bis zum vollständigen Verdau der Gewebestücke wiederholt. Die Zellsuspension aus Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (u.a. Gefäßwandzellen und Fibroblasten) wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach Absetzen der im Vergleich zu Kardiomyozyten schneller sedimentierenden Fibroblasten am Boden der Petrischale (Werdan 1987) wurde der Überstand mit der auf diese Weise angereicherten Kardiomyozytensuspension bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 350 x g (Hettich Zentrifuge, Universal 16/16R) zentrifugiert, der so erhaltene Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Primärkulturmedium (PKM) aufgenommen. Zur Bestimmung der vitalen Zellen pro Mikroliter wurde eine Probe dieser Suspension mit Trypanblau versetzt, da tote Zellen über Membranschäden Trypanblau aufnehmen und sich so tiefblau gefärbt von vitalen Zellen unterscheiden lassen. Mit einer Neubauerkammer (Fischer Labworld, Bremen) wurde die Konzentration vitaler Zellen in Vierfachbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro cm² in 6 cm große, mit Primärkulturmedium (PKM) gefüllte Kulturschalen ausgebracht.

Eine schematische Übersicht über den Präparationsablauf zeigt Abb. 2.

2.1.2 Kulturbedingungen

Nach der Präparation wurden die Zellen bei 37 °C in einem Brutschrank mit 5% CO₂ bei 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. 24 Stunden später zeigte sich ein spontan rhythmisch kontrahierender einschichtiger Zellverband (Werdan 1987). Alle 24 Stunden fand ein Wechsel des Primärkulturmediums bis zu einer maximalen Kultivierungsdauer von 5 Tagen statt.

2.1.3 Behandlung der Zellen

Ab dem zweiten Kultivierungstag erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylylcyclase in Konzentrationen von 1, 10 und 100 μM , in An- bzw. Abwesenheit von 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (100 μM), einem Hemmstoff der Phosphodiesterase, mit Retinsäure (0,3 μM) sowie dem nicht selektiven β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin (100 μM).

Die Behandlung der Zellen fand zeitgleich mit dem Wechsel des Primärkulturmediums statt, so daß die jeweiligen Substanzen alle 24 Stunden erneuert wurden.

Forskolin und Retinsäure wurden bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Isoprenalinbitartrat wurde zum Schutz vor schneller O-Methylierung in einer Pufferlösung aus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ und phosphathaltigen Salzen (phosphate buffered saline = PBS) gelöst. Es wurden jeweils Stammlösungen einer Konzentration von 10^{-2} M verwendet. Den Kontrollproben wurden jeweils gleiche Mengen von DMSO bzw. der Pufferlösung aus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ und PBS zugegeben.

2.1.4 Aufarbeitung der Zellen

Die Präparation von Zellextrakten wurde 8, 24, 48 oder 72 Stunden nach Stimulationsbeginn durchgeführt. Nach Absaugen des Mediums aus den Petrischalen wurde den am Boden haftenden Kardiomyozyten PBS hinzugefügt, direkt anschließend wurde das PBS wieder abgesaugt. Die Kardiomyozyten wurden mit einem sterilen Kratzer in je 100 μl einer Pufferlösung A mit Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS, 10%) und Natriumfluorid (NaF, 0,5%) manuell abgelöst. Nach Aufnehmen der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 100 μl einer Lösung B von SDS (10%) und Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.1.5 Substanzen, Lösungen und Geräte

Medien und Lösungen:

Alle Lösungen und Medien wurden durch Autoklavieren oder durch Filtration sterilisiert.

1. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,4):

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 1,5 mM KH₂PO₄

2. Trypsin-Lösung (0,25%):

- 250 ml Trypsin-EDTA (0,5%) (Boehringer, Mannheim)
- 250 ml PBS

3. Kollagenase-Lösung (0,1%):

- 500 mg lyophilisierte Kollagenase CLS II (Biochrom Berlin, Lot: D7S1129; Typ 2 Kollagenase)
- 500 ml PBS

4. Kollagen-Lösung (0,15%):

- 150 mg Kollagen aus Kälberachillessehne CL (Worthington Biochemical Co, NJ, USA)
- 100 ml PBS

5. Dulbecco's Medium/15% FKS:

- 85% (v/v) Dulbecco's Medium (GibcoBRL, Eggenstein)
- 15% (v/v) Fetales Kälber-Serum (FKS) (GibcoBRL)

6. Primärkulturmedium (PKM):

- 86% (v/v) Dulbecco's Medium (GibcoBRL)
- 10% (v/v) Pferde-Serum (GibcoBRL)
- 2% (v/v) Embryonales Huhnextrakt (GibcoBRL)
- 1% (v/v) 2 mM L-Glutamin (ICN Biochemicals GmbH, Eschwege)
- 1% (v/v) 100.000 E/I Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (GibcoBRL)

7. Pufferlösung A:

1000 µl 10%iges Natriumdodecylsulfat (SDS) (ICN Biochemicals GmbH)
in Aqua bidest.

5 µl NaF (1M)

8. Lösung B:

1000 µl Lysis Puffer nach Lämmli (Zusammensetzung nach Lämmli, 1970) ohne SDS mit 6 mg Dithiothreitol (DTT) (Cleland Reagent electrophoresis grade, ICN Biochemicals GmbH)

5. Weitere Substanzen:

Forskolin

3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)

Retinsäure (all trans retinoic acid)

Isoprenalin (Isoprenalinbitartrat)

alle Substanzen wurden von Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen

6. Dulbecco`s Medium (DMEM)

Mit Natriumpyruvat, 1000 mg/l Glukose and Pyridoxin (GibcoBRL)

11. 0,5%iges Trypanblau (E. Merck AG, Darmstadt) in NaCl 0,9%

Verwendete Geräte:

- Sterilbank, Lamin Air, HB 2472 (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- CO₂-Inkubator, Cellstar Nunc (Nunc GmbH, Wiesbaden)
- Falcon sterile 1x Pipetten 10 ml, (Advantage™, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Hettich Zentrifuge, Universal 16/16R (A. Hettich, Tuttlingen)
- Kolbenhubpipetten 5-10, 2-20, 10-100, 50-250, 200-1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Mikroskop, Labovert FS (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar)
- Pasteur-Pipetten (Brandt GmbH, Wertheim)
- sterile Petrischalen, 6 cm, 10 cm Durchmesser (Nunclon™, Brand Products, Dänemark)
- sterile anatomische und chirurgische Pinzetten

- Pipettenhelfer, accu-jet (Brand GmbH)
- Reaktionsgefäße mit Deckelverriegelung 1,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH)
- 1 sterile Schere
- 1 steriles Skalpell
- Solia-State CCD Camera (Pieper GmbH, Schwerte)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH)
- Wasserbad mit konstanter Temperatur bei 37 °C, Heizstab Julabo U3, (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)

2.2 Messung der AP-2 Element vermittelten transkriptionellen Aktivität

Um die durch das AP-2 Konsensus-Element vermittelte Aktivierung der Gentranskription in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden für 24 Stunden kultivierte embryonale Hühnerkardiomyozyten mit einem AP-2 Element kontrollierten Luziferase-Reporterkonstrukt (Photinus pyralis-Luziferase) transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde durch Kotransfektion eines Renilla reniformis-Luziferase Kontrollvektors ermittelt. Mit Hilfe des Dual Luciferase Reporter Assay Systems, (Promega GmbH, Mannheim) wurde durch getrennte Bestimmung der Aktivitäten der verschiedenen Luziferase-Isoenzyme die AP-2 vermittelte transkriptionelle Aktivität unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz gemessen.

2.2.1 Transfektion

Das zur Bestimmung der AP-2 vermittelten transkriptionellen Aktivität verwendete Plasmid enthielt die kodierende Sequenz der Photinus pyralis-Luziferase hinter einem Tyrosinkinase- (TK-) Promotor und AP-2 Konsensus-Elementen (s. Abb. 3), der pRL-CMV Kontrollvektor enthielt die kodierende Sequenz der Renilla reniformis-Luziferase hinter dem *early gene promoter* des Zytomegalievirus (Abb. 4). Reporter-genkonstrukt und Kontrollvektor wurden über 10 Minuten mit DMEM (30 µl/µg DNA) und Transfektionsreagenz (Superfect 3 µl pro µg DNA) in einem Reaktionsgefäß inkubiert, bevor pro Kulturschalenvertiefung (well) 200 µl auf 37 °C vorgewärmtes PKM hinzugegeben wurden.

Während der Inkubationszeit des DNA/Superfect-Reagenz Gemisches wurde das PKM von den kultivierten Kardiomyozyten abgesaugt, und es wurden 200 µl pro well auf 37 °C vorgewärmtes PBS hinzugefügt. Pro 400.000 Zellen (entspricht 1 well von 15 mm Durchmesser) wurden 0,4 µg AP-2-pT81 und 0,1 µg pRL-CMV Plasmid in PKM (insgesamt 400 µl/well) zugegeben. Die Kardiomyozyten wurden über 2 Stunden mit dem DNA/Superfect-Gemisch bei

37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden wie beschrieben (s. 2.1.1 und 2.1.2) kultiviert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen wie unter 2.1.3 beschrieben behandelt und nach weiteren 1, 2 oder 3 Tagen zur Herstellung von Zellextrakten abgelöst.

2.2.2 Herstellung von Zellextrakten

Nach Absaugen des Mediums wurde auf die am Boden haftenden Kardiomyozyten PBS (100 µl/well) gegeben und im Anschluß daran direkt wieder abgesaugt. Pro well wurden anschließend 100 µl „Passiver Lysepuffer“ (Passive Lysis Buffer (PLS)) hinzugefügt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Kardiomyozyten manuell mit einem sterilen Kratzer gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellhomogenate wurden bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt. Kurz vor Beginn der Bestimmung der Luziferase Aktivität wurden die Zell-Lysate für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 14000 x g in einer Tischzentrifuge (Promega GmbH, Mannheim) zentrifugiert. Mit 10 µl des Überstandes wurden die Messungen durchgeführt.

2.2.3. Dual-Luziferase Reporter Assay

Die getrennte Bestimmung der Photinus pyralis- und Renilla reniformis-Luziferase Aktivitäten erfolgte nach Angaben des Herstellers des Dual-Luziferase Reporter Assay Systems. Vor jedem Experiment wurden das „Luziferase Assay Reagent II“ (LAR II) und das „Stop & Glo Reagent“ frisch verdünnt. Nach 10 µl LAR II wurden 10 µl der Probe in ein Luminometerreaktionsgefäß gegeben. Die Aktivität der Photinus pyralis-Luziferase wurde mit einer Meßzeit von 6 Sekunden im Luminometer bestimmt. Anschließend wurden 10 µl des „Stop & Glo Reagents“ hinzugefügt. Dieses Reagenz blockiert die Photinus pyralis-Luziferase Aktivität und dient der

Einstellung von optimalen Bedingungen zur Messung der Renilla reniformis-Luziferase Aktivität, die wiederum mit einer Meßzeit von 6 Sekunden bestimmt wurde.

2.2.4. Substanzen, Lösungen und Geräte

Lösungen und Substanzen:

- Superfect, Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Hilden)
- Dual-Luziferase Reporter Assay System (Promega Corporation, Madison, USA) bestehend aus
 - Passive Lysis Buffer (PLS)
 - Luziferase Assay Reagent II (LAR II)
 - Stop & Glo Reagent
- Plasmide s. 2.3.1 und Abb. 3 und 4

- s. 2.1.5

Geräte:

- s. 2.1.5

2.2.5 Statistische Auswertung

Die für jede Probe bestimmte Photinus pyralis-Luziferase Aktivität wurde auf die jeweilige Renilla reniformis-Luziferase Aktivität bezogen, um eventuell unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu korrigieren. Die so normalisierten Messwerte der mit Forskolin bzw. Isoprenalin stimulierten Zellen wurden auf die Messwerte der mit Lösungsmittel behandelten Kontrollzellen bezogen.

Alle Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für nichtparametrische Stichproben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.3 Immunologische Bestimmung von AP-2 α

2.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembran

Die Expression von AP-2 α in Kardiomyozyten wurde immunologisch auf Western Blots untersucht: Die bereits in Lysis-Puffer nach Lämmli (1970) gekochten Zellhomogenate (s. 2.1.4) wurden im Heizblock bei 37 °C aufgetaut. Die Gelelektrophorese wurde wie von Lindemann und Watanabe (1985) beschrieben durchgeführt, pro Spur wurden 70 μ l Homogenat aufgetragen. In jedem Gel liefen ein auf allen Gelen identisches Kontrollproteinextrakt zum Abgleich der verschiedenen Blots und ein Molekulargewichtsstandard mit. Der Molekulargewichtsstandard setzte sich aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa) und Alpha-Laktalbumin (14 kDa) zusammen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Polyacrylamidgelen, die aus einem Sammelgel mit 4 % Polyacrylamid (PAA) und einem Trenngel mit 10 % PAA bestanden. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (Hoefer SE 600) bei 4 °C für ca. 30 Minuten und einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt (Elektrophorese im Sammelgel). Anschließend erfolgte die Elektrophorese im Trenngel bei einer Stromstärke von 60 mA für ca. 150 Minuten.

Die Proteine wurden elektrophoretisch von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Townbin et al. 1979). Bei einem konstanten Strom von 1,5 A erfolgte der Transfer bei 4 °C für 3 Stunden in einem Puffersystem aus 42 mmol/l Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 8 mmol/l Natrium-Dihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) (Neumann et al. 1991). Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau-Lösung gefärbt, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Immunologischer Nachweis der Proteine

2.3.2.1 Immunologischer Nachweis von AP-2 α und Troponin

Die Expression von AP-2 α wurde im Vergleich mit einem nach Forskolinstimulation in Hühnerkardiomyozyten nicht veränderten Kontrollprotein, Troponin I (TnI), bestimmt (Müller et al. 2001).

Der AP-2 α -Antikörper war ein polyklonaler Kaninchenantikörper (J037, Firma Santa Cruz, Kalifornien/USA), der gegen die letzten 18 Aminosäuren der menschlichen Sequenz (AS 420-437) gerichtet war. Der TnI-Antikörper wurde uns von Dr. G. S. Bodor (Denver Health Center, Denver/USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er erkennt sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form von TnI.

Aus den mit Ponceau-Lösung gefärbten Nitrozellulosemembranen wurden zunächst in der Migrationshöhe der zu untersuchenden Proteine entsprechende Streifen ausgeschnitten, so daß ein immunologischer Nachweis von AP-2 α (45 kDa) und TnI (28-30 kDa) auf demselben Blot möglich war. Die Streifen wurden in Plexiglaskammern entsprechender Größe überführt und mit Aqua bidest. für 10 Minuten gespült. Anschließend folgte eine 30minütige Inkubation mit Puffer B, um eine nicht spezifische Antikörperbindung zu blockieren. Nach Abnahme des Puffers B erfolgte eine Inkubation mit den Antikörpern (anti-AP-2 α , 1:500; bzw. anti-TnI, 1:5000) bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Nitrozellulosemembranstreifen jeweils 2 Minuten mit den Puffern A, C, C und A gespült, anschließend wurden die Streifen für 2 Stunden mit ¹²⁵I-markiertem Protein A (1:1000 in Puffer B verdünnt) inkubiert. Nicht spezifisch gebundenes Protein A wurde durch erneutes 10minütiges Spülen mit den Puffern A, C, C und A entfernt.

Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung des PhosphorImager-Systems.

2.3.2.2 Immunologischer Nachweis von Calsequestrin

Calsequestrin (CSQ) ist ein im Sarkoplasmatischen Retikulum von Herzmuskelzellen lokalisiertes Ca^{2+} -speicherndes Protein mit einem Molekulargewicht von 50-60 kDa. Die Expression von Calsequestrin im menschlichen insuffizienten Herzen ist im Vergleich zu nicht insuffizienten Spenderherzen sowie in vielen Tiermodellen der Herzinsuffizienz nicht verändert (Movsesian et al. 1994). Daher wurde Calsequestrin als weiteres Kontrollprotein bestimmt. Der immunologische Nachweis von Calsequestrin erfolgte entsprechend der Bestimmung von AP-2 α und Troponin (s. 2.3.2.1). Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um ein affinitätsgereinigtes Kaninchen-Antiserum gegen CSQ, das uns freundlicherweise von Dr. L. R. Jones (Indianapolis/USA) zur Verfügung gestellt wurde.

2.3.2.3 Kontrolle des immunologischen Signals durch AP-2 α -Peptid

Zur Überprüfung der Spezifität des gegen AP-2 α gerichteten Antikörpers wurden Blockierungsexperimente mit Hilfe des zur Immunisierung verwendeten AP-2 α -Peptids durchgeführt. Hierfür wurden zwei Aliquots eines Homogenates embryonaler Hühnerkardiomyozyten gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (s. 2.3.1). Der immunologische Nachweis von AP-2 α erfolgte bei einer Antikörperverdünnung, die gerade noch ein Signal erkennen ließ. Für das Blockierungsexperiment wurde die Antikörperlösung mit 6 μg des AP-2-Peptids für 30 Minuten bei 4 °C vorinkubiert, bevor sie auf die Membran pipettiert wurde. Als Negativkontrolle wurden 6 μg eines unabhängigen Peptids (spezifisch für den Transkriptionsfaktor SP-1) in gleicher Weise verwendet.

2.3.2.4 Linearer Bereich der Bestimmung

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Proteinexpression zu erheben, wurde jeweils der lineare Bereich jeder Messung anhand verschiedener Homogenatmengen überprüft. Dazu wurden 30, 70 und 140 µl eines Pools aus fünf verschiedenen Kardiomyozytenhomogenaten aufgetragen.

2.3.3 Geräte, Antikörper, Lösungen und Substanzen

Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembran

- Probenpuffer:
 - 20 % Glycerol
 - 10 % SDS
 - 40 mM DL-DTT
 - Bromphenolblau
 - 62,5 mM Tris-HCl,
 - pH 6,8
- Stammlösung:
 - 0,2 M Tris
 - 0,6 M Glycerin
 - 0,12 M Glycerin
 - 0,2 % SDS
 - 10 % Glycerin
 - 0,4 % Polyacrylamid
 - pH 8,8
- Oberer Puffer:
 - 0,5 M Tris
 - 0,4 % SDS
 - pH 6,8

- 4%iges Sammelgel:
 - 25 % Oberer Puffer
 - 13,4 % Acrylamidlösung
 - 60 % Aqua bidest.
 - 0,06 % TEMED
 - 0,1 % APS

- 10%iges Trenngel:
 - 50 % Stammlösung
 - 33 % Acrylamidlösung
 - 16,6 % Glycerin / Aqua bidest. (1:1)
 - 0,08 % TEMED
 - 0,04 % APS

- Acrylamidlösung:
 - 30 % Acrylamid
 - 1,5 % Bis-acrylamid

- Porzio Puffer:
 - 0,2 M Tris
 - 0,6 M Glyzin
 - 0,12 mM EDTA
 - 0,2 % SDS
 - 10 % Glycerin

- Elektrodenpuffer:
 - 0,2 M Tris
 - 0,6 M Glyzin
 - 4 % SDS
 - pH 8,8

- 50 mM Transferpuffer:
 - 42 mM Na_2HPO_4
 - 8 mM NaH_2PO_4
 - pH 7,4

- Acrylamid (ICN Biochemicals, Aurova, Ohio, USA)

- Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Bis-N,N`-Methylene-Bis-Acrylamid (Bis-Acrylamid) (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)
- DTT (Sigma Chemie GmbH)
- Glycerin (ICN Biomedicals)
- Glyzin (Merck)
- Molekulargewichtsstandard (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ, USA)
 - Phosphorylase b (94 kDa)
 - Rinderserumalbumin (67 kDa)
 - Ovalbumin (43 kDa)
 - Carboanhydrase (30 kDa)
 - Trypsininhibitor (20 kDa)
 - α -Laktalbumin (14 kDa)
- N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (Sigma Chemie GmbH)
- Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4) (Merck)
- Natriumphosphat (NaH_2PO_4) (Merck)
- Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 μm) (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Polyacrylamid (BDH Chemicals, Poole, England)
- Ponceau S-Lösung (Sigma Chemie GmbH)

Immunologischer Nachweis von AP-2 α , Tnl und CSQ

- Puffer A: 154 mM NaCl
 13 mM Tris
 pH 7,4
- Puffer B: Puffer A + 2 % BSA
 pH 7,4
- Puffer C: Puffer A + 0,1 % Tween 20
- AP-2 α -Antikörper, polyklonaler Kaninchenantikörper cat# sc-184 (Santa Cruz, Kalifornien, USA)

- AP-2 α -Peptid (Santa Cruz)
- SP-1-Peptid (Santa Cruz)
- Anti-CSQ-affinity-purified-Antiserum Dr. L.R. Jones, Indianapolis, USA
- ¹²⁵I-markiertes Protein A (30 μ Ci/ μ g, 1,11 MBq/ μ g) (ICN Biomedicals)
- Anti-TnI Dr. G. S. Bodor, Denver Health Medical Center, Denver, USA
- Natriumchlorid (NaCl) (Merck)
- Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma Chemie GmbH)
- SP-1 (PEP 2) P control peptide (Santa Cruz)
- Tween 20 (Sigma Chemie GmbH)

Geräte:

- PhosphorImager (Molecular Dynamics GmbH, Sunnyvale Kalifornien, USA)
Programm: Image Quant[®]
- Hoefer SE 600 Gelkammer (HSI, San Francisco, Kalifornien, USA)
- Kühlbad Haake F3 digital (Haake GmbH, Karlsruhe)

2.3.4 Auswertung

Mit Hilfe des PhosphorImager-Systems wurde unter Abzug der Hintergrundsignalstärke (entspricht der unspezifischen Bindung) die Höhe der jeweiligen spezifischen Signale für AP-2 α , TnI bzw. Calsequestrin ermittelt. Um die verschiedenen Blot-Membranen abzugleichen, wurden alle Werte eines Blots auf die jeweilige Signalstärke einer auf jedem Blot mitgeführten Referenzprobe (Homogenat aus verschiedenen Proben) bezogen.

Für jedes Homogenat wurden auf diese Weise die Meßwerte für AP-2 α und TnI ermittelt und als AP-2 α /TnI-Verhältnis aufeinander bezogen. Die TnI-korrigierten Meßwerte wurden in Prozent der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt. Um eine unveränderte Expression von TnI unter bestimmten Bedingungen zu überprüfen, wurden Meßwerte für TnI mit Meßwerten für CSQ als weiteres Kontrollprotein verglichen.

Alle Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für nichtparametrische Stichproben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

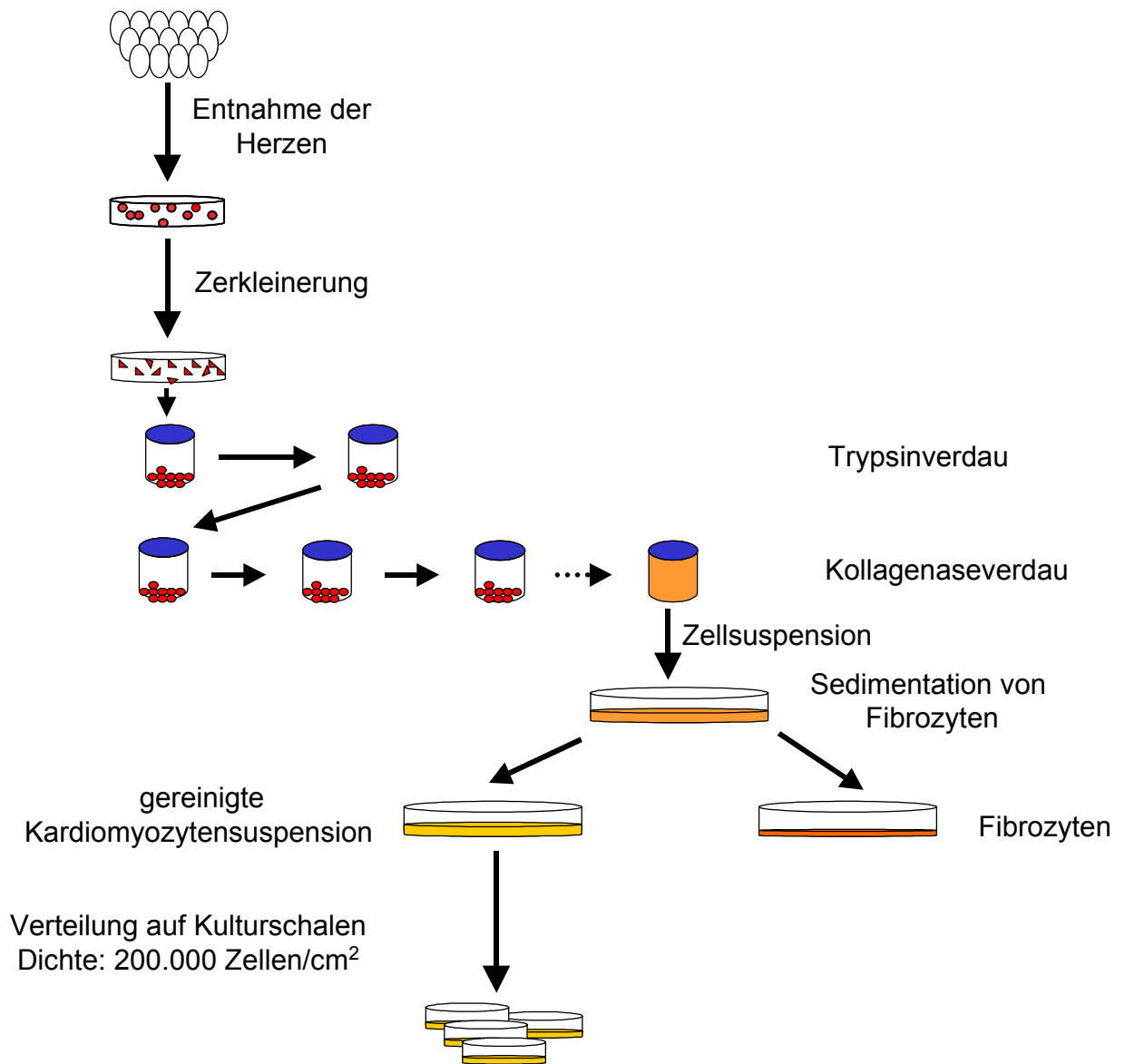


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hühnerkardiomyozytenpräparation

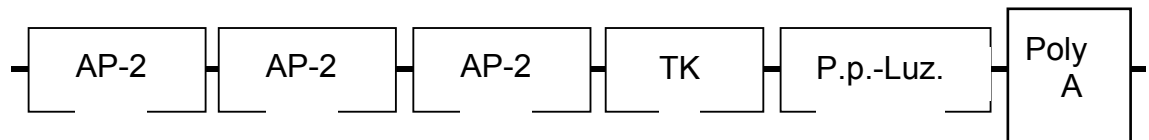


Abbildung 3: Schematische linearisierte Darstellung von AP-2-pT81. Das zur Bestimmung der AP-2 vermittelten transkriptionellen Aktivität verwendete Plasmid enthält die kodierende Sequenz der Photinus pyralis-Luziferase (P.p.-Luz.) hinter einem Tyrosinkinase- (TK-) Minimalpromotor und drei davor lokalisierten AP-2 Konsensus-Elementen (AP-2). Nach dem Photinus pyralis Gen folgt ein Polyadenylationssignal (Poly A).

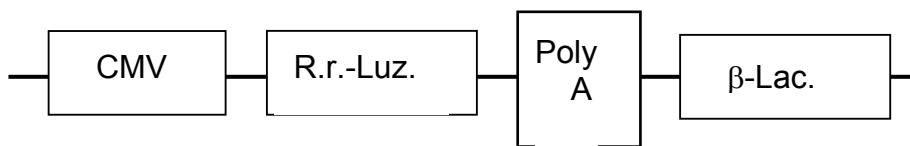


Abbildung 4: Vereinfachte linearisierte Darstellung von pRL-CMV: Der pRL-CMV Kontrollvektor enthält die kodierende Sequenz der Renilla reniformis-Luziferase (R.r.-Luz.) hinter dem *early gene promoter* des Zytomegalievirus (CMV). Dem Renilla reniformis Gen folgt ein Polyadenylationssignal (Poly A) und das β -Lactamase Gen (β -Lac.), das antibiotikahaltiges Kulturmedium plasmidhaltige Zellen von nicht transfizierten Zellen ohne Plasmid unterscheiden lässt.

3. Ergebnisse

3.1 AP-2 Element vermittelte Aktivierung der Gentranskription in Hühnerkardiomyozyten

Die mit AP-2-pT81 und pRL-CMV transient transfizierten embryonalen Hühnerkardiomyozyten wurden mit dem β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin (100 μ M) in Anwesenheit des Phosphodiesterasehemmstoffes IBMX (100 μ M) oder dem Aktivator der Adenylylcyclase Forskolin (10 μ M) über 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Anschließend wurden luminometrisch die Photinus pyralis- und Renilla reniformis-Luziferase Aktivitäten gemessen. Zur Kontrolle wurden transient transfizierte Hühnerkardiomyozyten untersucht, die mit den entsprechenden Volumina des Lösungsmittels DMSO bzw. des Puffers zur Lösung von Isoprenalin behandelt wurden. Als Messgröße diente der Quotient aus den Photinus pyralis- und Renilla reniformis-Luziferase Aktivitäten, letztere zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (s. 2.2.5). Es wurden 8 unabhängige Experimente (in Doppelbestimmung) durchgeführt.

Die Mittelwerte der vorliegenden Proben wurden auf den 24-Stundenwert der Lösungsmittelkontrolle (Ctr) bezogen.

Nach 72 Stunden Stimulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der AP-2 Element vermittelten Luziferase Aktivität auf das 10fache nach Forskolin und das 9fache nach Isoprenalin/IBMX-Behandlung (s. Abb. 5).

3.2 Expression von AP-2 α in Hühnerkardiomyozyten

Um zu untersuchen, ob die nach mehrtägiger Stimulation von Hühnerkardiomyozyten mit Isoprenalin bzw. Forskolin beobachtete gesteigerte AP-2 Element vermittelte transkriptionelle Aktivität durch eine vermehrte Expression von AP-2 α bedingt sein kann, wurde die Proteinexpression von AP-2 α immunologisch auf Western Blots in entsprechend behandelten

Hühnerkardiomyozyten untersucht. Der verwendete AP-2 α spezifische Antikörper erkannte eine Bande von 45 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht von AP-2 α (Williams et al. 1988; Mitchell et al. 1987), und eine zweite Bande bei 72 kDa. Die 45 kDa Bande wurde durch Vorinkubation mit dem zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptid gehemmt, hingegen zeigte die Vorinkubation mit einem nicht AP-2 α -spezifischen SP-1-Peptid keine Hemmung der 45 kDa Bande. Dies belegte die Spezifität des AP-2 α Nachweises (s. Abb. 6).

3.2.1 Linearität des immunologischen Signals von AP-2 α

Als Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung von AP-2 α wurde untersucht, ob das immunologische Signal für AP-2 α zu der auf dem Blot aufgetragenen Proteinmenge proportional ist. Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen AP-2 α -Signal und Proteinmenge bis zu 140 μ l aufgetragenem Proteinhomogenat (s. Abb. 7).

3.2.2 Quantifizierung von Tnl

In Vorarbeiten wurde gezeigt, daß die Expression von Tnl in Hühnerkardiomyozyten nach Stimulation mit Forskolin bzw. Isoprenalin nicht verändert ist (Müller et al. 2001). Daher wurde das immunologische Signal für Tnl auf denselben Blotstreifen als Beladungskontrolle bestimmt, die für den AP-2 α -Nachweis verwendet wurden. Dabei war die Signalstärke für Tnl proportional zu der auf dem Gel geladenen Proteinmenge (s. Abb. 8). Verschiedene Arbeiten belegten eine unveränderte Expression von Calsequestrin im insuffizienten menschlichen Herzen sowie in verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz (Hasenfuss et al. 1997). Daher wurde Calsequestrin zusätzlich zu Tnl als weiteres Kontrollprotein bestimmt, um die Eignung von Tnl als Standard zu

überprüfen. Im Vergleich mit Calsequestrin zeigte sich eine unveränderte Expression von Tnl nach Stimulation mit Isoprenalin (s. Abb. 9).

3.2.3 Einfluß der Behandlung mit Forskolin, Isoprenalin und Retinsäure auf die Expression von AP-2 α in Hühnerkardiomyozyten

Nachdem die Messung der AP-2 Element vermittelten transkriptionellen Aktivität in Hühnerkardiomyozyten eine gesteigerte Aktivität erst nach 3tägiger Behandlung ergeben hatte, wurde der Einfluß der Behandlungsdauer einer Stimulation mit Forskolin und Isoprenalin auf die Expression von AP-2 untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt einer Behandlung mit Retinsäure untersucht, die in verschiedenen Zelltypen zu einer gesteigerten AP-2 α -Expression führte (Lüscher et al. 1989; Oulad-Abdelghani et al. 1996).

Nach 8, 24 und 48 Stunden zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung von AP-2 α unter Behandlung mit Forskolin (100 μ M) sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IBMX (10 μ M). Nach 72 Stunden kam es zu einer signifikanten Steigerung auf 141 % ($P < 0,05$) unter Stimulation mit Forskolin (100 μ M) in Kombination mit IBMX (10 μ M) Stimulation und auf 132 % bei alleiniger Forskolin (100 μ M) Stimulation ($P < 0,05$).

Unter Retinsäurebehandlung wurden über einen Zeitraum von 8, 24, 48 und 72 Stunden keine signifikante Expressionsveränderungen von AP-2 α ($P < 0,05$) beobachtet (s. Abb. 10-13).

3.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Expression von AP-2 α nach Stimulation mit Forskolin

Um die Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Expressionsanstieges von AP-2 α zu untersuchen, wurde das immunologische Signal für AP-2 α nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Forskolin (1, 10, 100 μ M) gemessen (72 Stunden Behandlung).

Eine 3tägige Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit 10 (auf 122 %, $P < 0,05$) und 100 μ M (auf 132 %, $P < 0,05$) Forskolin führte zu einer gesteigerten Expression von AP-2 α . Kein signifikanter Effekt wurde nach 3tägiger Behandlung mit Forskolin 1 μ M beobachtet (s. Abb. 14).

3.2.5 Expression von AP-2 α nach Stimulation mit Isoprenalin

Nachdem ein Effekt einer rezeptorunabhängigen Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges auf die Expression von AP-2 in Hühnerkardiomyozyten beobachtet worden war, wurde der Effekt einer Stimulation des β -Adrenozeptors mit Isoprenalin untersucht. Eine Behandlung von Kardiomyozyten mit Isoprenalin für 3 Tage führte zu einer gesteigerten Expression von AP-2 α auf 165 % der Kontrolle ($P < 0,05$) (s. Abb.15).

Hühnerkardiomyozyten, AP-2/pT81

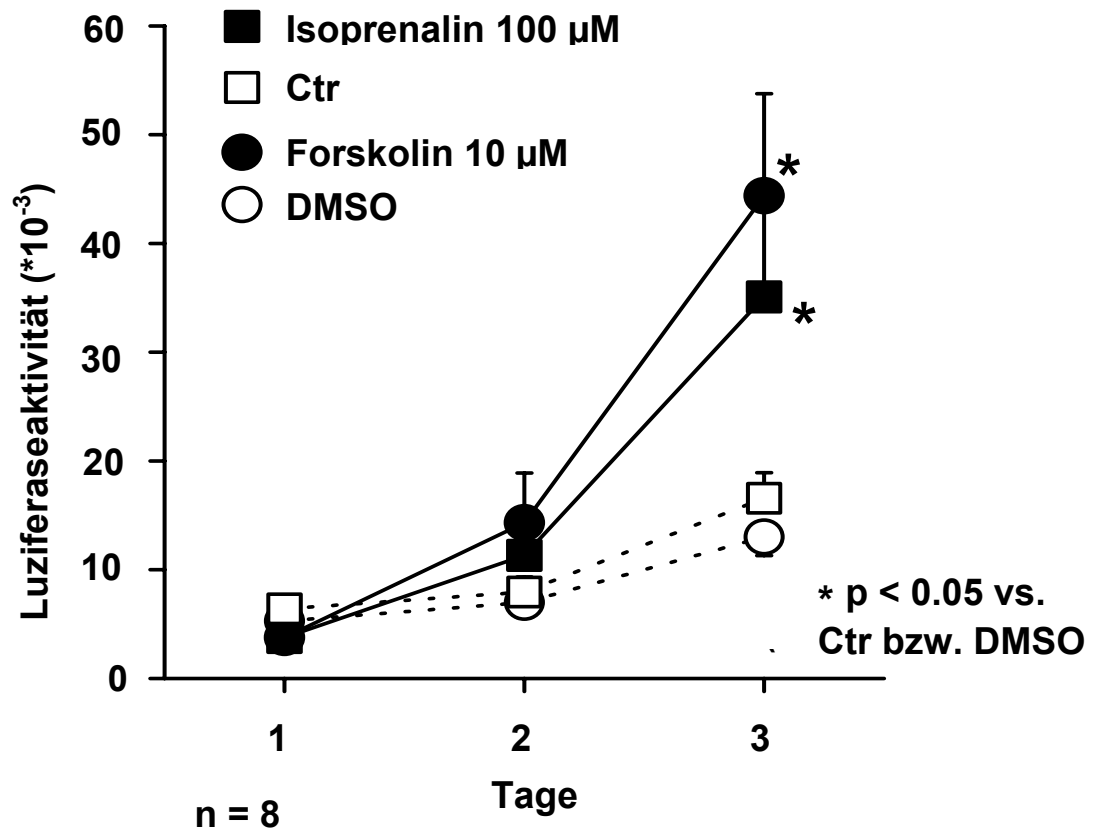


Abbildung 5: AP-2 Element vermittelte transkriptionelle Aktivität in mit einem entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukt transient transfizierten Hühnerkardiomyozyten (AP-2/pT81) nach 72stündiger Behandlung mit Isoprenalin (■) in Kombination mit IBMX (100 μ M) bzw. Forskolin (●) und im Vergleich zu entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (□ Ctr entspricht der Kontrolle der Isoprenalin Stimulation, ○ DMSO entspricht der Kontrolle zur Forskolin Stimulation). Nach 3tägiger Behandlung mit Forskolin und Isoprenalin/IBMX zeigte sich eine signifikante Erhöhung der durch das AP-2 Element vermittelten Luziferase Aktivität.

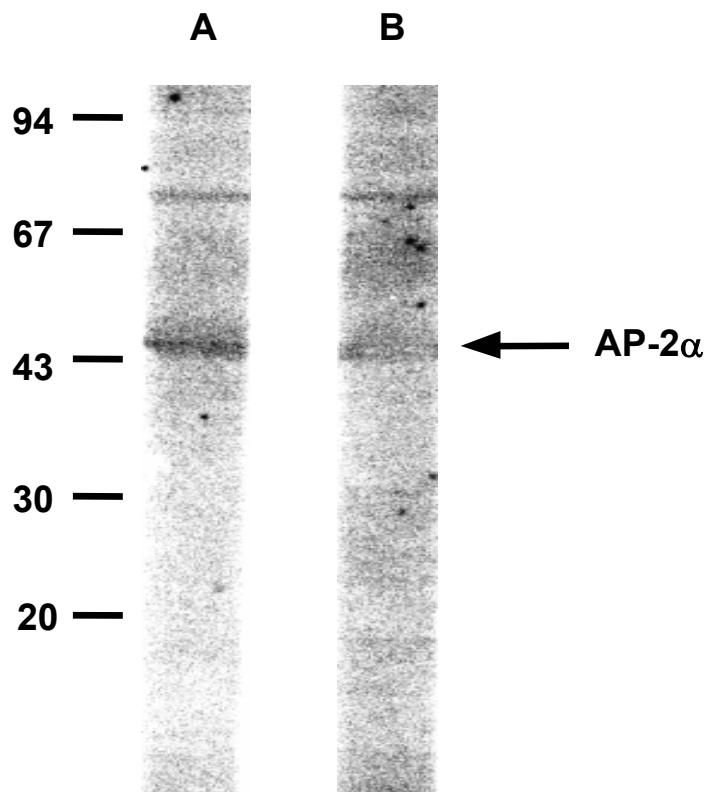


Abbildung 6: Blockadeexperiment zur Spezifität des AP-2 α -Nachweises in Hühnerkardiomyozyten.

Zwei Aliquots eines Homogenates embryonaler Hühnerkardiomyozyten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Der immunologische Nachweis von AP-2 α erfolgte bei einer Antikörperverdünnung von 1:1000, die gerade noch ein Signal erkennen ließ. Für das Blockierungsexperiment wurde die Antikörper-Lösung mit dem zur Herstellung des Antikörpers verwendeten AP-2-Peptid vorinkubiert, bevor sie auf die Membran pipettiert wurde (B). Zur Kontrolle (A) wurden gleiche Mengen eines nicht von AP-2 abgeleiteten Peptids (spezifisch für den Transkriptionsfaktor SP-1) in gleicher Weise verwendet. Der AP-2 α spezifische Antikörper erkannte zwei Banden von 45 und 72 kDa, von denen nur die 45 kDa-Bande durch Vorinkubation mit dem AP-2 α -Peptid, gehemmt wurde (Pfeil). Diese Bande wurde durch das SP-1-Peptid nicht gehemmt.

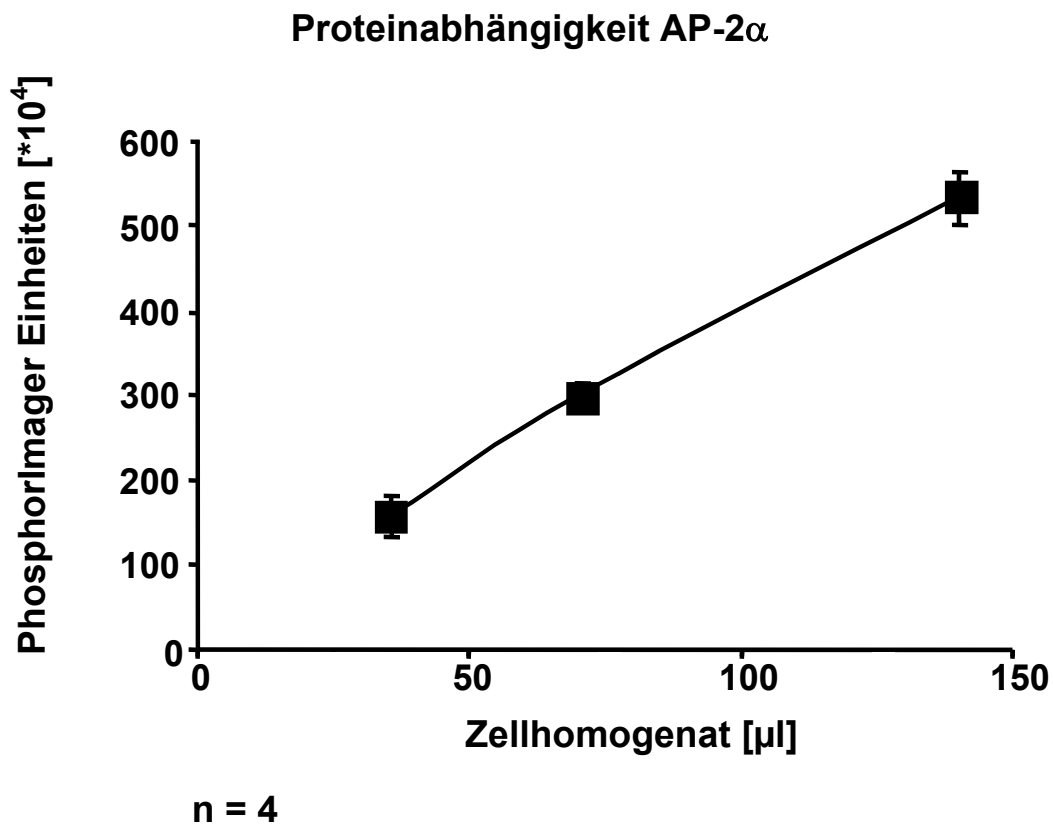


Abbildung 7: Abhängigkeit des immunologischen Signals für AP-2 α (45 kDa-Bande PhosphorImager Einheiten) von der Menge des geladenen Zellhomogenats.

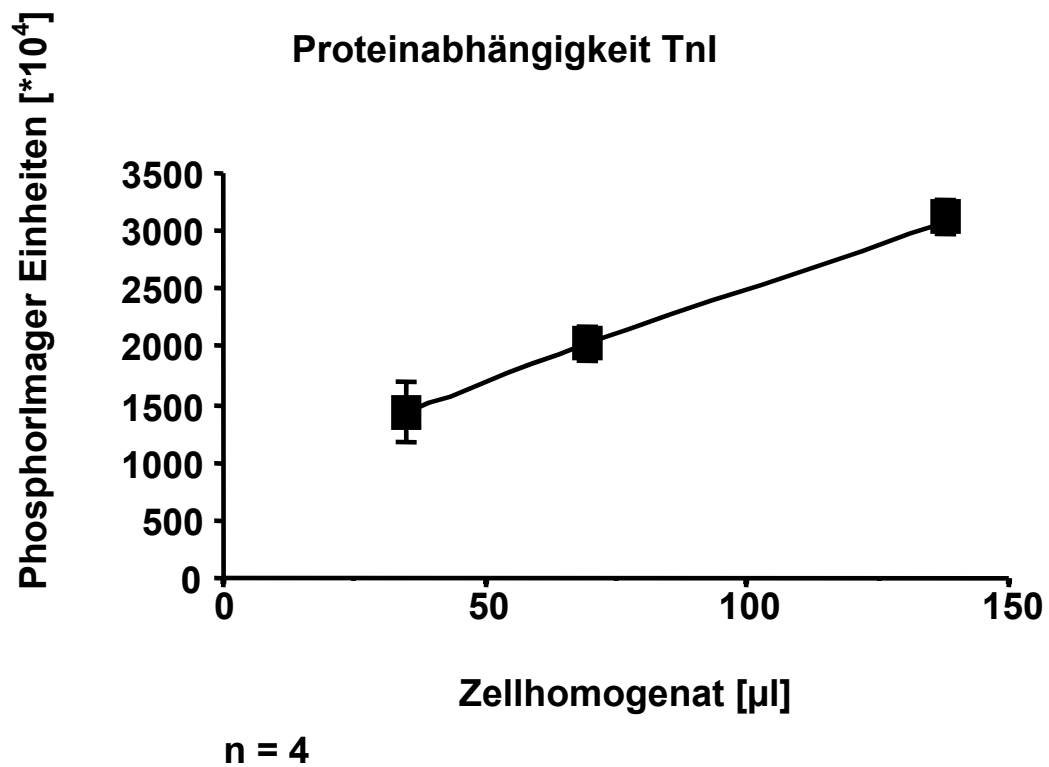


Abbildung 8: Abhängigkeit des immunologischen Signals für AP-2 α (28-30 kDa-Bande PhosphorImager Einheiten) von der Menge des geladenen Zellhomogenats.

TnI-Gehalt nach 72 h Stimulation

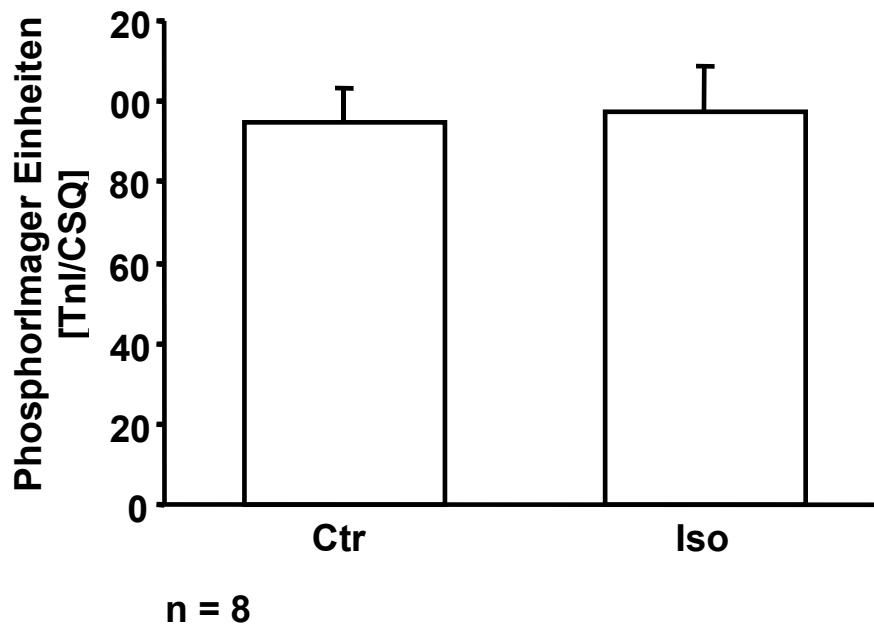


Abbildung 9: Effekt einer Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Isoprenalin (100 μ M) für 72 Stunden auf die Expression von TnI, normiert auf das immunologische Signal von Calsequestrin. Es zeigte sich keine Veränderung der TnI-Expression bezogen auf die Calsequestrin-Expression.

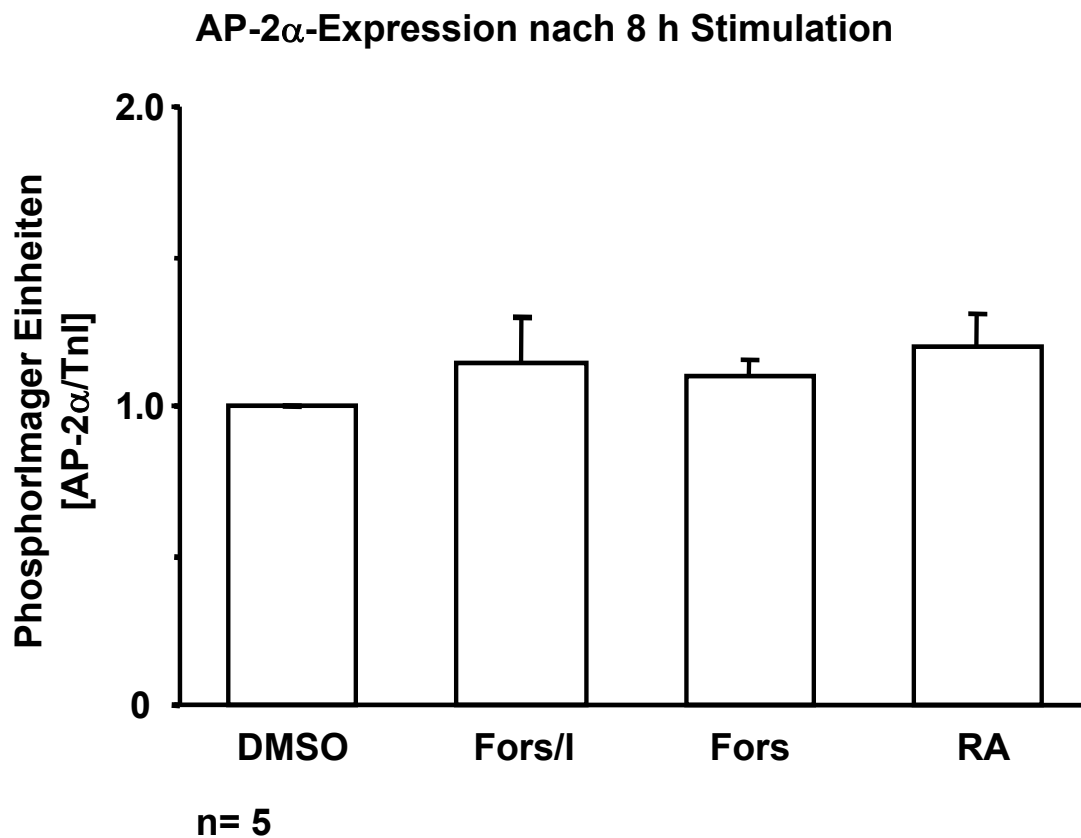


Abbildung 10: Effekt einer 8stündigen Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin 100 μ M in Anwesenheit von IBMX 10 μ M (Fors/I), Forskolin 100 μ M (Fors), Retinsäure 3 μ M (RA). Es zeigten sich keine Unterschiede in der AP-2 α -Expression nach 8 Stunden Behandlung.

AP-2 α -Expression nach 24 h Stimulation

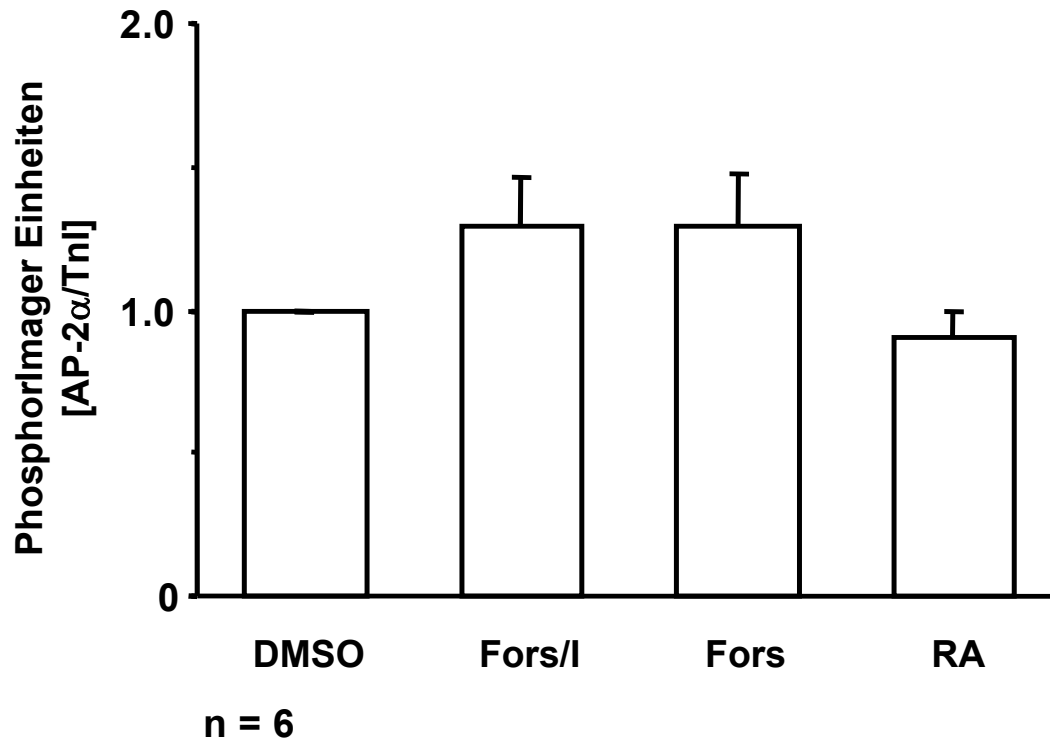


Abbildung 11: Effekt einer 24stündigen Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin 100 μ M in Anwesenheit von IBMX 10 μ M (Fors/I), Forskolin 100 μ M (Fors), Retinsäure 3 μ M (RA). Es zeigten sich keine Unterschiede in der AP-2 α -Expression nach 24 Stunden Behandlung.

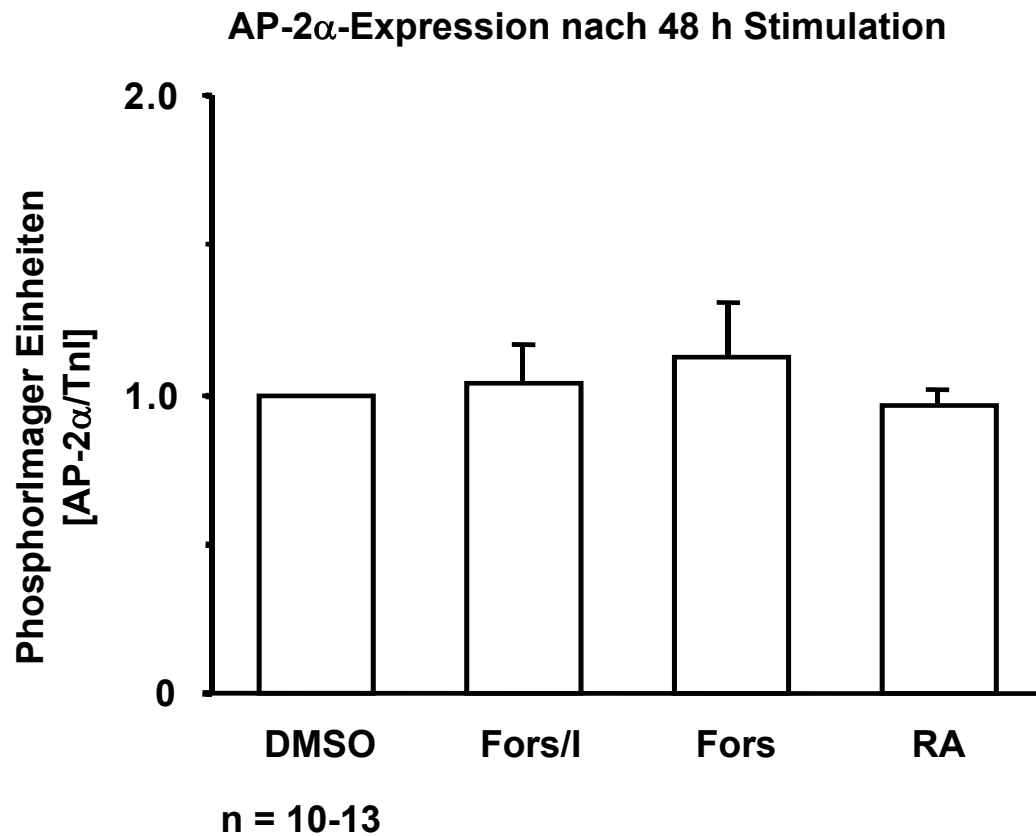


Abbildung 12: Effekt einer 2tägigen Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin 100 μ M in Anwesenheit von IBMX 10 μ M (Fors/I), Forskolin 100 μ M (Fors), Retinsäure 3 μ M (RA). Es zeigten sich keine Unterschiede in der AP-2 α -Expression nach 48 Stunden Behandlung.

AP-2 α -Expression nach 72 h Stimulation

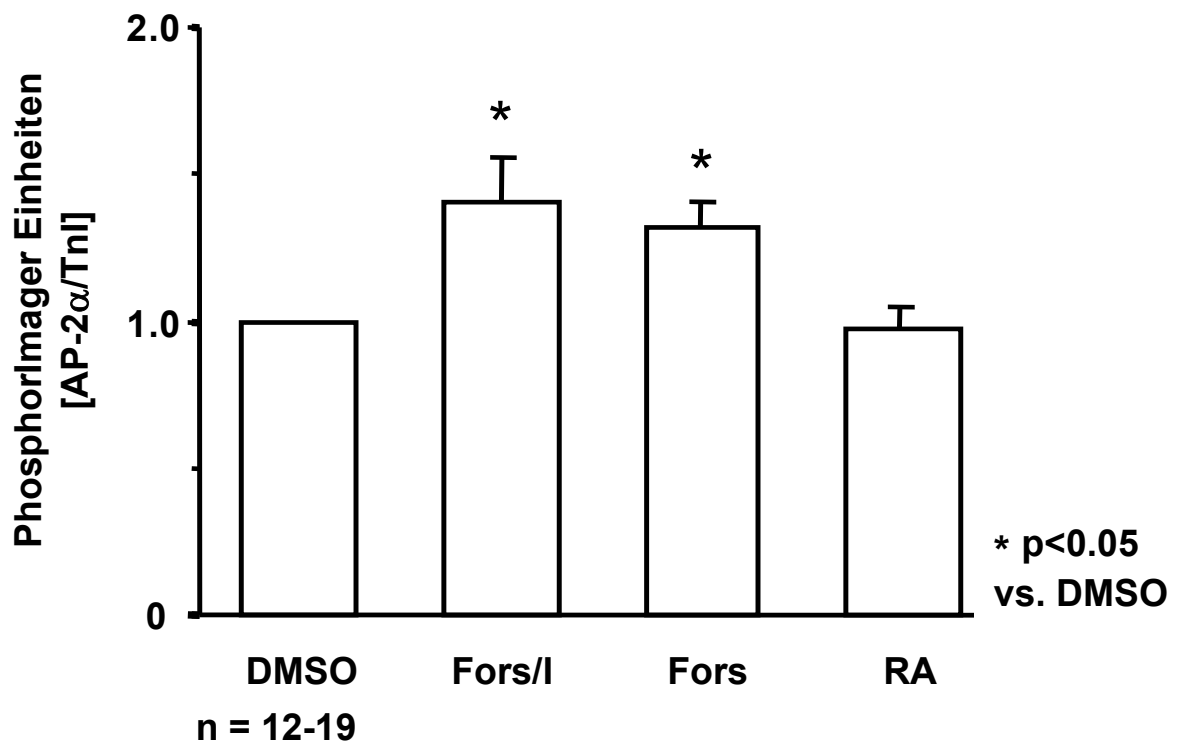


Abbildung 13: Effekt einer 3tägigen Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin 100 μ M in Anwesenheit von IBMX 10 μ M (Fors/I), Forskolin 100 μ M (Fors), Retinsäure 3 μ M (RA). Nach 72 h Behandlung mit Forskolin 100 μ M in Anwesenheit von IBMX 10 μ M (Fors/I) und Forskolin 100 μ M (Fors) war die Expression von AP-2 α auf 141% bzw. 132% erhöht (P < 0,05 vs. DMSO). Es zeigten sich keine Unterschiede in der AP-2 α -Expression nach 72 Stunden Behandlung mit Retinsäure.

**AP-2 α -Expression nach 72 h Stimulation
mit unterschiedlichen Konzentrationen von Forskolin**

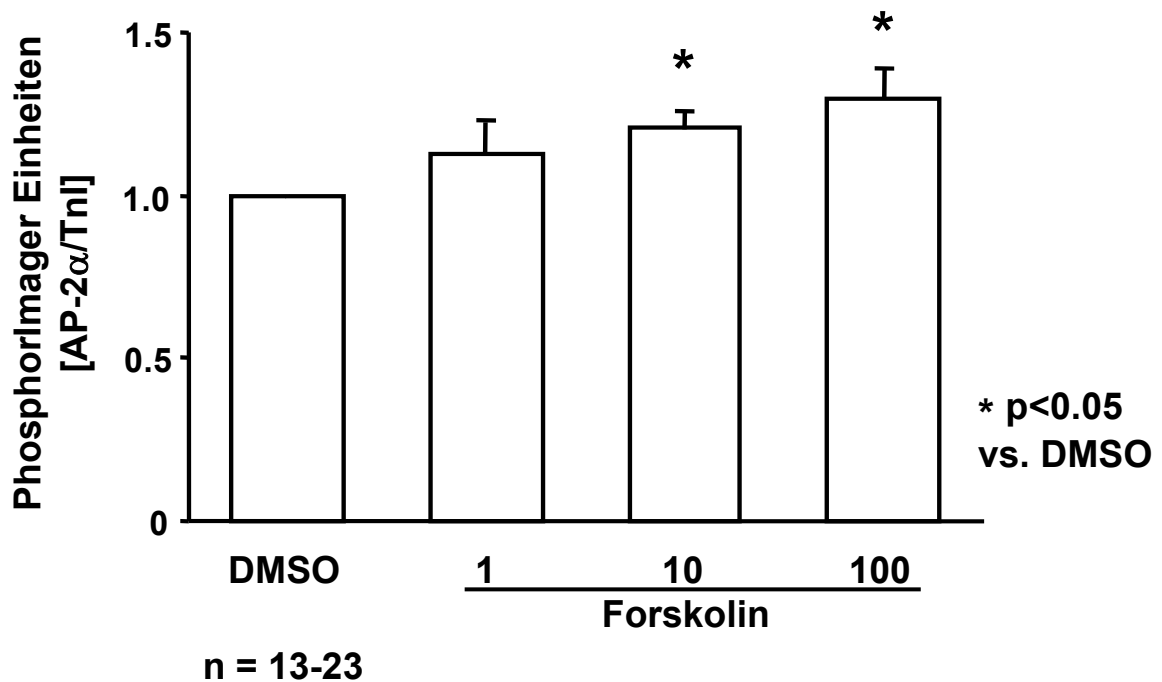


Abbildung 14: Effekt einer Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin in Konzentrationen von 1, 10, 100 μ M über 72 Stunden. In der Kontrollgruppe wurden die Kardiomyozyten mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Kein Effekt auf die AP-2-Expression wurde bei der Behandlung mit 1 μ M Forskolin beobachtet. Nach Stimulation mit 10 bzw. 100 μ M Forskolin zeigt sich nach 3tägiger Behandlung eine Erhöhung der AP-2 Expression auf 132% bzw. 122% (P < 0,05 vs. DMSO).

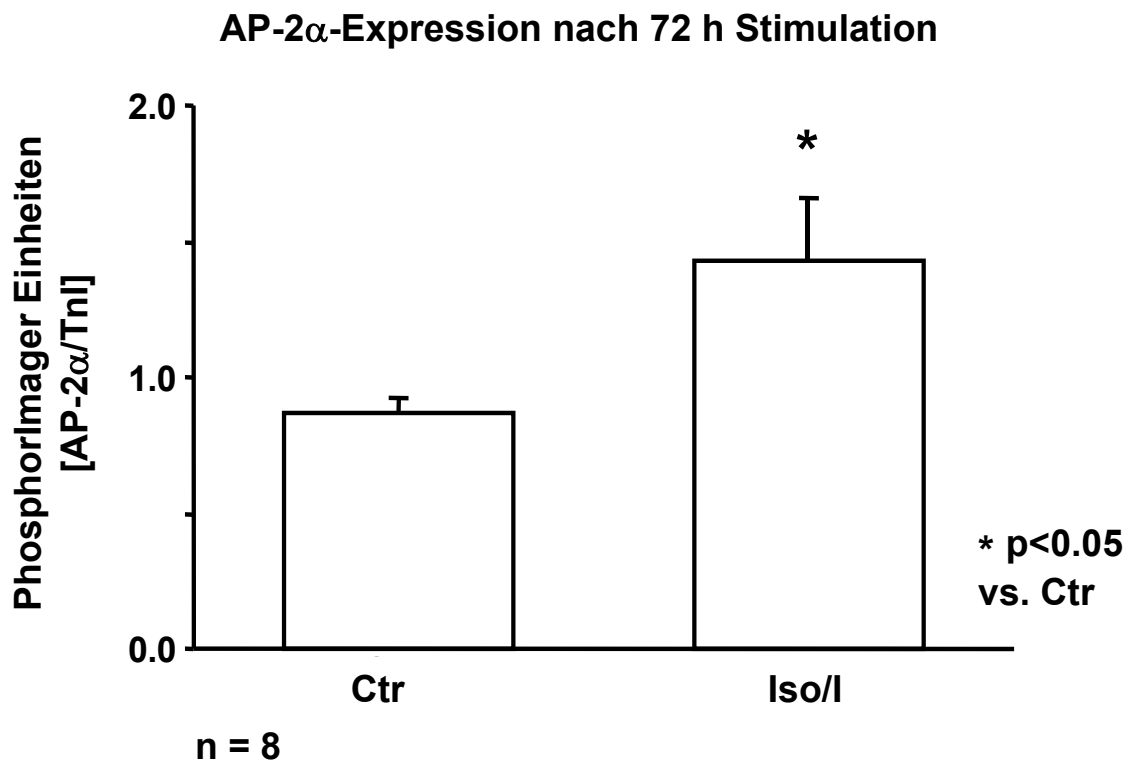


Abbildung 15: Effekt einer Behandlung von Hühnerkardiomyozyten mit Isoprenalin (Iso) in Anwesenheit von IBMX (I) jeweils in einer Konzentration von 100 μ M bzw. Lösungsmittel (Ctr) über 72 Stunden. Unter Isoprenalinbehandlung zeigt sich eine Erhöhung der AP-2-Expression auf 165% (P < 0,05 vs. Ctr).

4. Diskussion

Das insuffiziente Herz ist durch charakteristische Störungen der Herzfunktion gekennzeichnet, u.a. durch eine verminderte Kontraktilität, eine verlangsamte Relaxation sowie durch gesteigerte Apoptose. Diese und weitere Veränderungen werden zumindest zum Teil durch eine veränderte Expression myokardialer regulatorischer Proteine erklärt. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt im allgemeinen auf verschiedenen Ebenen, u.a. durch Regulation der Transkription und der Translation oder durch eine Kontrolle der Lebensdauer von mRNA und Protein. Bislang sind die Mechanismen weitgehend unbekannt, die der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen zugrunde liegen, klinische und experimentelle Studien belegen jedoch die Hypothese, daß eine chronische Stimulation des β -Adrenozeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasmakatecholamine sowohl zu der Entstehung und der Progression der Herzinsuffizienz als auch zu der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen beiträgt.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren vermitteln eine Aktivierung der Gentranskription als Antwort auf eine Stimulation des cAMP-abhängigen Signalübertragungsweges, darunter die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren mit den Mitgliedern AP-2 α , β , γ und δ , die auf unterschiedlichen Genen kodiert werden, und die eine Bedeutung für die Embryonalentwicklung des ZNS sowie für die Pathogenese des Mammakarzinoms haben (Buettner et al. 1994; Schorle et al. 1996). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von AP-2 α im menschlichen Herzen nachgewiesen und eine vermehrte Expression von AP-2 α in ventrikulären Gewebeproben explantierter menschlicher insuffizienter Herzen im Vergleich zu nicht insuffizienten Spenderherzen beobachtet (Müller et al. 2004). Da in verschiedenen Zelltypen, z.B. in HeLa-Zellen, eine Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Gentranskription durch eine vermehrte Expression von AP-2 α reguliert wird (Lüscher et al. 1989), könnte die Heraufregulation von AP-2 α in insuffizienten menschlichen Herzen Ausdruck einer Aktivierung der AP-2 Element vermittelten

Transkription als Folge einer chronischen β -adrenergen Stimulation sein. In der vorliegenden Arbeit sollte demnach untersucht werden, ob eine Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges in Kardiomyozyten eine Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Gentranskription zur Folge hat und, wenn ja, ob dies mit einer vermehrten Expression von AP-2 α einhergeht.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine durch das AP-2 Element vermittelte Regulation der Gentranskription in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, daß in embryonalen Hühnerkardiomyozyten (i) sowohl eine rezeptorabhängige als auch eine rezeptorunabhängige Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges zu einer Steigerung der durch das AP-2 Element vermittelten Transkription führt und daß (ii) diese vermehrte transkriptionelle Aktivität tatsächlich mit einer Heraufregulation von AP-2 α einhergeht.

Eine dreitägige Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges mit dem β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin (rezeptorabhängige Aktivierung) oder dem Aktivator der Adenylylcyclase Forskolin (rezeptorunabhängige Aktivierung) führte in embryonalen Hühnerkardiomyozyten zu einer Steigerung der AP-2 Element vermittelten Transkription auf das 8-10fache verglichen mit entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Eine cAMP vermittelte Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Transkription wurde schon früher in HeLa Zellen (Imagawa et al. 1987) und in Astrozyten (U87 Zell-Linie; Garcia et al. 1996) beschrieben. Die transkriptionelle Aktivierung in HeLa-Zellen verläuft stark und schnell, eine 60fache Aktivierung wurde innerhalb von drei Stunden nach Stimulation von HeLa-Zellen mit 10 μ M Forskolin in Kombination mit 100 μ M Ro20-1724, einem Phosphodiesteraseinhibitor, beobachtet. Im Vergleich dazu verläuft die Aktivierung in Astrozyten eher schwächer und verzögert (4facher Anstieg der AP-2 Element vermittelten Transkription nach 48 Stunden Stimulation mit 1 mM dibutyryl-cAMP). Demnach zeigen Kardiomyozyten ähnlich Astrozyten und im Gegensatz zu HeLa-Zellen eine schwache und langsame Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Gentranskription nach

Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges, und wie in Astrozyten ging diese Aktivierung mit einer vermehrten Expression von AP-2 α einher. Es ist nicht bekannt, welche Mechanismen den Unterschieden hinsichtlich Ausmaß und Verlauf der AP-2 Element vermittelten Transkription in verschiedenen Zelltypen zugrunde liegen. Prinzipiell könnten sie z.B. durch Einflüsse gewebsspezifischer Transkriptionsfaktoren auf den Promotor des AP-2 α -Genes und daraus folgende Unterschiede der AP-2 α -Expression oder durch Expression verschiedener Isoformen von AP-2 α bedingt sein.

Eine gesteigerte Expression von AP-2 α wird als ein wichtiger Mechanismus für eine Aktivierung der durch das AP-2 Element vermittelten Gentranskription angesehen. So wurde in HeLa-Zellen eine Heraufregulation von AP-2 α -mRNA, ein Anstieg von AP-2-Protein und eine maximale Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Transkription nach 48 bis 72stündiger Stimulation mit Retinsäure beobachtet (Lüscher et al. 1989). In der gleichen Studie wurde ebenfalls an HeLa-Zellen gezeigt, daß die AP-2-Expression nicht durch TPA, das Calcium-Ionophor A23187 oder durch intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhende Substanzen gesteigert werden kann. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die nach Stimulation von Kardiomyozyten mit Forskolin oder Isoprenalin gesteigerte, durch das AP-2 Element vermittelte transkriptionelle Aktivität mit einer Heraufregulation von AP-2 α einhergeht. So wäre es denkbar, daß in insuffizienten menschlichen Herzen eine chronische Stimulation des β -adrenergen Rezeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasmakatecholamine über eine Heraufregulation von AP-2 α eine gesteigerte AP-2 Element vermittelte Transkription bewirkt und daß schädliche Effekte einer chronischen β -adrenergen Stimulation zum Teil durch diesen Signaltransduktionsweg vermittelt werden.

AP-2 α Protein wurde auf Western Blots in Hühnerkardiomyozyten nachgewiesen. Der verwendete AP-2 α -spezifische Antikörper erkannte zwei Banden in Extrakten embryonaler Hühnerkardiomyozyten. Das apparente Molekulargewicht der stärkeren Bande lag bei 45 kDa und entsprach dem berechneten Molekulargewicht von AP-2 α (48 kDa) sowie apparenten

Molekulargewichten von 50-52 kDa in HeLa-Zellen (Mitchell et al. 1987), von 45-47 kDa in menschlichen Mammakarzinomzellen bzw. im menschlichen Herzen und in Rattenkardiomyozyten (Bosher et al. 1995; Müller et al. 2004). Die 45 kDa Bande war spezifisch für AP-2 α , da sie durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem antigenen Peptid, jedoch nicht durch Vorinkubation mit einem anderen, nicht von AP-2 α herrührenden Peptid gehemmt wurde. Dieser Befund steht in Einklang mit Untersuchungen der Expression von AP-2 α im adulten menschlichen Herzen unter Verwendung desselben Antikörpers (Müller et al. 2004). Hier zeigten sich starke Signale für AP-2 α nur in insuffizienten Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie; in nicht insuffizienten Spenderherzen wurde nur eine schwache Expression von AP-2 α -Protein beobachtet. Dieser Befund wurde auch durch immunhistologische Untersuchungen an menschlichem Myokard bestätigt, nach denen der auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper eine AP-2 α -spezifische Anfärbung von myozytären und nicht-myozytären Zellkernen zeigte, wobei der Prozentsatz AP-2 α -positiver Zellkerne in Gewebeschnitten insuffizienter Herzen erhöht war (Müller et al. 2004). Wang et al. (1994) beschrieben erstmals anhand von DNA-Footprint-Analysen eine AP-2 Element-spezifische Bindungsaffinität in kardialen Proteinextrakten adulter Ratten. An embryonalen Mausherzen wurde dagegen nur eine schwache und transiente Expression von AP-2 α -mRNA mittels in situ-Hybridisierung bzw. RNA-Protection Assay nachgewiesen (Mitchell et al. 1991). Imhof et al. (1999) wiesen AP-2 α -mRNA in kardialer Gesamt-RNA von Mäuseembryonen und Mäusen am vierten und zehnten Lebenstag nach. Auch hier zeigte sich nur eine schwache Expression von AP-2 α im Herzen, die nur 10 bzw. 20% der Expression in Gehirn bzw. Niere betrug. Unterschiedliche Befunde an adulten und embryonalen Geweben und eine gesteigerte Expression von AP-2 α in insuffizienten menschlichen ventrikulären Gewebeproben könnten demnach durch eine schwache Expression von AP-2 α in adulten Herzen erklärt werden, die die Folge einer Herabregulation der AP-2 α -Expression nach Abschluß der Embryonalentwicklung ist, und die im Sinne einer Reaktivierung embryonaler Expressionsmuster im insuffizienten Herzen

gesteigert ist. Ähnliches wurde bereits für andere myokardiale Proteine, z.B. Isoformen der Myofilamente Myosin und Aktin, beschrieben (Lompré et al. 1979; Schwartz et al. 1986).

Embryonale Hühnerkardiomyozyten wurden mit dem β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin, in Ab- und Anwesenheit des Phosphodiesterasehemmstoffes IBMX, oder unter Zugabe von Forskolin, einem Aktivator der Adenylylcyclase, stimuliert. Eine Heraufregulation von AP-2 α zeigte sich erst nach 72stündiger Stimulation mit Isoprenalin bzw. Forskolin. Dieser Effekt war abhängig von der Forskolinkonzentration. Der beobachtete Anstieg von AP-2 α Protein kann nicht durch Gelbeladungsfehler erklärt werden, da die Gleichmäßigkeit der Gelbeladung durch die Quantifizierung verschiedener myozytärer Proteine (Troponin I und Calsequestrin) bestätigt und überprüft wurde. Troponin I und Calsequestrin wurden als Kontrollproteine ausgewählt, da deren Expression nach Stimulation von embryonalen Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin und Isoprenalin (Troponin I) bzw. in insuffizienten menschlichen Herzen (Calsequestrin) nicht verändert ist (Movsesian et al. 1994; Müller et al. 2001).

Die maximale Heraufregulation von AP-2 α Protein nach Stimulation von Hühnerkardiomyozyten mit Forskolin bzw. Isoprenalin betrug 40%. Befunde zum Ausmaß einer Heraufregulation von AP-2 α auf Proteinebene nach Stimulation mit Forskolin oder Isoprenalin in anderen Zelltypen liegen nicht vor. Nach Stimulation von humanen Teratokarzinom-Zellen mit Retinsäure wurde eine Steigerung der AP-2 α -mRNA Spiegel um 500-1000% beschrieben (Williams et al. 1988). Eine ebenfalls stärkere Steigerung von AP-2-mRNA (auf 217%) wurde in afferenten Rattenneuronen ca. 1 Stunde nach Induktion einer akuten Entzündungsreaktion festgestellt, in den darauffolgenden Stunden konnte ein deutlicher Abfall der AP-2-mRNA Spiegel gemessen werden (Donaldson et al. 1995). An anderen neuronalen Zellen (P19) und primären Astrozyten konnten Philipp et al. nach Stimulation mit verschiedenen den cAMP-Gehalt erhöhenden Substanzen (Forskolin, Noradrenalin, Isoprenalin) eine deutliche nicht näher bestimmte Heraufregulation von AP-2-

mRNA zeigen (Philipp et al. 1994). Wenn auch die jeweiligen Befunde auf Protein- bzw. mRNA-Ebene nicht direkt verglichen werden können – für verschiedene Gene wurden Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteinspiegeln beschrieben (Linck et al. 1996) – scheint jedoch der Anstieg von AP-2 α Protein in Kardiomyozyten geringer ausgeprägt zu sein als in anderen Zelltypen. Dies steht auch in Einklang mit der geringer ausgeprägten Steigerung der AP-2 Element vermittelten transkriptionellen Aktivierung, spricht jedoch nicht gegen eine mögliche Relevanz für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.

Es ist nicht bekannt, welcher Mechanismus eine gesteigerte Expression von AP-2 α nach Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges vermittelt. Creaser et al. (1996) beschrieben jedoch eine positive Autoregulation der Expression von AP-2 α , vermittelt durch AP-2 Elemente im AP-2 α -Genpromotor. Demnach könnte eine einmalige oder kurzfristige Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges eine langanhaltende und starke Heraufregulation von AP-2 α bewirken. Dies könnte erklären, warum AP-2 α -Proteinspiegel in insuffizienten menschlichen Herzen erhöht sind, auch wenn cAMP-Spiegel im insuffizienten Herzen erniedrigt sind (Bristow et al. 1989; Danielsen et al. 1989) (s. Abb. 16). Imhof et al. zeigten, daß verschiedene „Zink-Finger“-Transkriptionsfaktoren, BTEB-1 und AP-2rep, die AP-2-Expression durch überlappende Bindung an eines der drei AP-2 Elemente im AP-2-Promotor regulieren (Imhof et al. 1999; Creaser et al. 1996). Die Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren am menschlichen insuffizienten Herzen ist bislang nicht bekannt. In verschiedenen Zelltypen (z.B. Teratokarzinom-Zellen, neuroektodermalen P19-Karzinomzellen) wurden eine Aktivierung der AP-2 vermittelten Transkription und eine Heraufregulation von AP-2 α nach Stimulation mit Retinsäure beobachtet (Lüscher et al. 1989; Buettner et al. 1993; Philipp et al. 1994; Oulad-Abdelghani et al. 1996). Dagegen wurde keine veränderte Expression von AP-2 α in embryonalen Hühnerkardiomyozyten (vorliegende Arbeit) und in primären Astrozyten beobachtet (Philipp et al. 1994). Dies deutet auf zelltypspezifische Unterschiede

der Expression von AP-2 α und deren Regulation hin. Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben einer Heraufregulation von AP-2 α weitere Mechanismen zu einer Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Transkription beitragen. So wurde durch Garcia et al. (Garcia et al. 1999) eine Modulation der AP-2 Element vermittelten Transkription durch eine Phosphorylierung von AP-2 beschrieben. Die (patho)-physiologische Bedeutung dieses Befundes ist bislang nicht klar, eine initiale Phosphorylierung von AP-2 α könnte jedoch möglicherweise einen Trigger für die Heraufregulation von AP-2 darstellen, die dann durch die oben beschriebene positive Autoregulation aufrechterhalten wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß AP-2 α in Kardiomyozyten exprimiert wird und daß eine Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges mit Forskolin bzw. Isoprenalin zu einer Aktivierung der AP-2 Element vermittelten Transkription führt, die mit einer vermehrten Expression von AP-2 α einhergeht. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die in früheren Untersuchungen in insuffizienten menschlichen Herzen beobachtete gesteigerte Expression von AP-2 α (i) Folge einer chronischen Stimulation des β -adrenergen Rezeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasmakatecholamine ist und (ii) zu einer Aktivierung von AP-2 Element-kontrollierten Zielgenen führt und so zu der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen beiträgt. Im menschlichen Herzen sind Zielgene von AP-2 α bislang nicht bekannt. Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegten eine Bedeutung von AP-2 α für die Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten (Müller et al. 2004). So führte eine Adenovirus vermittelte Überexpression von AP-2 α zur Auslösung von Apoptose in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und nach 3-6 Tagen zum Tod aller infizierten Zellen. Diese Auslösung von Apoptose ging mit erhöhten mRNA-Spiegeln für das pro-apoptische Protein Bax sowie für Bcl-x einher. Es ist bislang nicht bekannt, ob Bax und Bcl-x direkte Zielgene einer AP-2 vermittelten transkriptionellen Aktivierung darstellen, oder ob andere, indirekte Mechanismen involviert sind. Bax ist ein bekanntes Zielgen des Transkriptionsfaktors und

Tumorsuppressorgenes p53, und es wurden direkte Interaktionen von AP-2 α mit p53 beschrieben (Mertens et al. 2002). Jedoch war die Auslösung von Apoptose nach Überexpression von AP-2 α in Kardiomyozyten unabhängig von p53, da sie nicht durch Pifithrin- α , einen Inhibitor der p53 vermittelten transkriptionellen Aktivierung, gehemmt wurde. Weiterhin wurden antiapoptotische Effekte von AP-2 α beschrieben. So hemmt AP-2 α proapoptotische Effekte des Protoonkogenes und Transkriptionsfaktors c-myc, einmal durch direkte Interaktion, zum anderen durch überlappende AP-2- und c-myc-(E-box) Konsensus-Elemente in verschiedenen Zielgenen (Gaubatz et al. 1995). Ferner ist AP-2 α in antiapoptotische Effekte des Retinoblastomgenproduktes und eine zugrunde liegende Aktivierung der Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Proteins in Epithelzellen, jedoch nicht in NIH 3T3 Zellen mesenchymalen Ursprunges involviert (Decary et al. 2002). In insuffizienten menschlichen Herzen wurde eine gesteigerte Apoptose beobachtet (Schumann et al. 1997; Leri et al. 1998; Stein et al. 1998). So könnte die Heraufregulation von AP-2 α in insuffizienten menschlichen Herzen an der Auslösung von Apoptose beteiligt sein. Diese Hypothese wird durch immunhistologische Befunde gestützt, nach denen in Gewebsschnitten aus insuffizienten menschlichen Herzen sowohl die Zahl AP-2 α -positiver Zellkerne als auch die Zahl apoptotischer Zellkerne erhöht war (Müller et al. 2004). Dabei zeigte sich interessanterweise eine Kollokalisierung PARP-positiver Kerne nur mit AP-2 α -positiven aber nicht mit AP-2 α -negativen Zellkernen, was eine mögliche Bedeutung von AP-2 α für die Auslösung von Apoptose im menschlichen insuffizienten Herzen nahelegt.

In anderen Geweben wurden verschiedene Funktionen von AP-2 α nachgewiesen, die prinzipiell auch am Herzen von Bedeutung sein könnten. Nach diesen Befunden ist AP-2 α in die Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen involviert - u.a. in Mammakarzinomzellen durch Aktivierung des Protoonkogenes c-erbB-2 (Bosher et al. 1996) (s. hierzu auch Abb.17). Es ist nicht bekannt, inwieweit diese Mechanismen auch am Herzen bzw. bei Herzinsuffizienz von Bedeutung sind. Die Untersuchung von Zielgenen

einer AP-2 vermittelten Transkription im Herzen bzw. der oben genannten Mechanismen am menschlichen Herzen könnte daher in erheblichem Maße zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beitragen und prinzipiell zu der Identifizierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte beitragen.

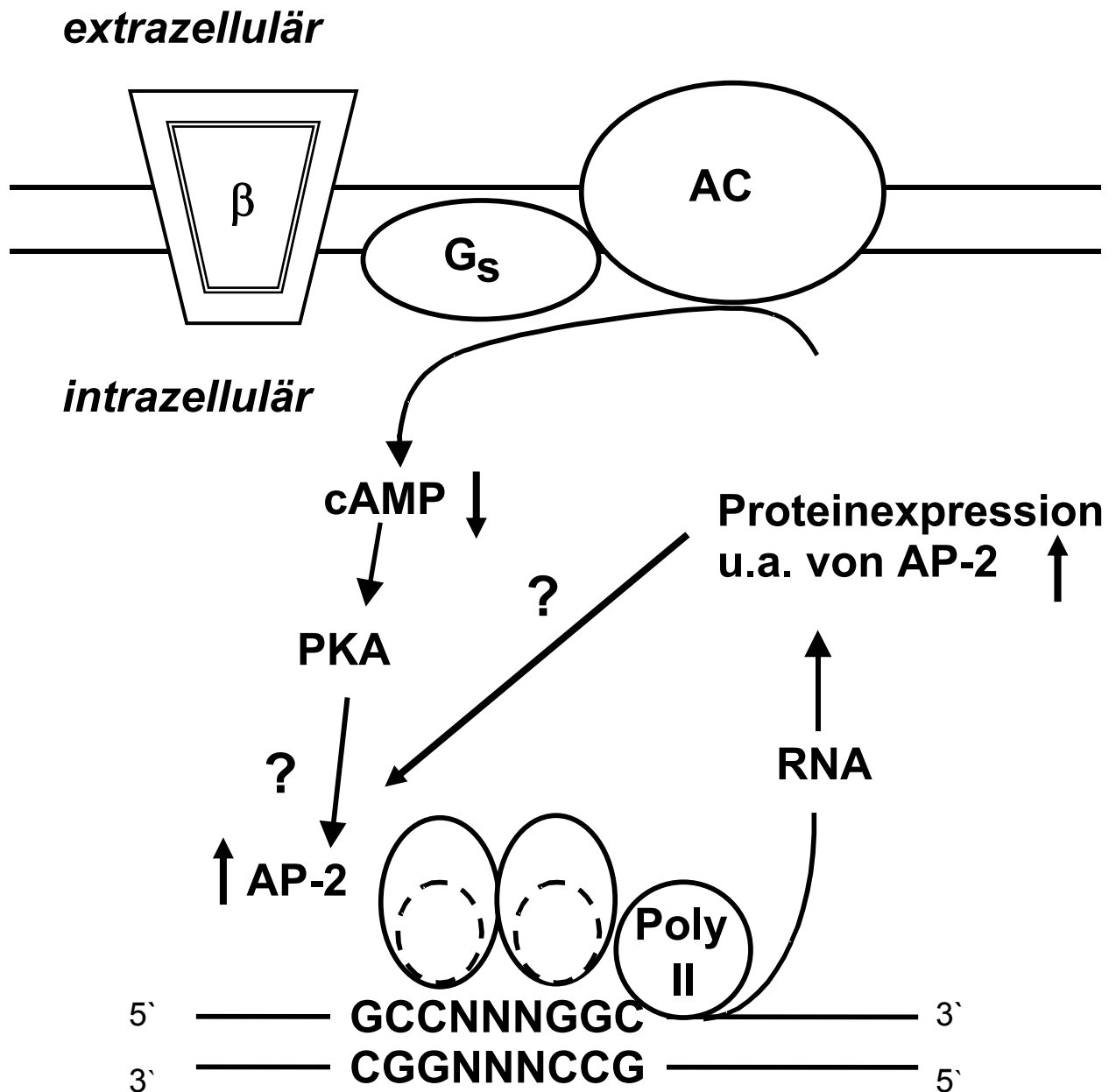


Abbildung 16: Vereinfachtes Schema einer Herzmuskelzelle zur möglichen funktionellen Bedeutung von AP-2 α am insuffizienten Herzen.

Eine durch Aktivierung der PKA vermittelte erhöhte Aktivität der AP-2-vermittelten Gentranskription könnte an der veränderten Genregulation nach chronisch β -adrenerger Stimulation im insuffizienten Herzen beteiligt sein. Doppellinien und Pfeile kennzeichnen bekannte Veränderungen bei Herzinsuffizienz. Nach Reduktion der β -Rezeptor-Expression ist eine Autoregulation durch AP-2 Elemente in AP-2-Genpromotoren denkbar.

Mögliche Zielgene von AP-2 (untersuchte Gewebe in Klammern)	Mögliche funktionelle Bedeutung von AP-2	Literatur
Wachstumshormon (Mensch)	Regulation der Expression von Wachstumshormon, von dem bei Patienten mit DCM positive Effekte auf kardiales Output und klinische Symptome gezeigt wurden	Bodner and Karin 1987; Courtois et al. 1990; Fazio et al. 1996
c-erbB-2 (Mensch)	Regulation des zellulären Protoonkogens in Mammakarzinom Zellen, nicht jedoch in Ovar-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinomzellen, die ebenfalls c-erbB2 überexprimieren	Bosher et al. 1996; Vernimmen et al. 2003
Tumor Nekrose Faktor β -3 (Maus)	bisher unbekannt	Lafyatis et al. 1990; Lafyatis et al. 1991
Kardiales Troponin T (cTnT) (Ratte)	(negative) Regulation von cTnT bei rechtsventrikulärer Hypertrophie im Rahmen einer pulmonalen Hypertension	Wang et al. 1994; Kogler et al. 2003
α_2 -Untereinheiten des G_i -Proteines (Mensch)	(positive) Regulation des G_i -Proteines bei Herzinsuffizienz	Neumann et al. 1988; Mittmann et al. 1998
Tyrosin Hydroxylase (Ratte)	Regulation der Expression dieses Schlüsselenzyms der Katecholaminsynthese	Yang et al. 1998
Atriales natriuretisches Peptid (ANP) (Ratte)	(positive) Regulation des ANP, das bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz erhöht ist	Mayer et al. 2002; Tran et al. 2004

Abbildung 17: Tabellarische Auflistung bekannter Proteine mit AP-2 Elementen in der Promotorregion und ihre mögliche funktionelle Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens, bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck ein den metabolischen Bedürfnissen des Körpers entsprechendes Herzzeitvolumen zu fördern und stellt das häufige gemeinsame Endbild verschiedener Erkrankungen des Herzens dar. Für morphologische und funktionelle Veränderungen des insuffizienten Herzens wird unter anderem eine veränderte Expression von kardialen regulatorischen Genen als Folge einer chronischen Stimulation des β -adrenergen und cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 2 (AP-2) als mögliche Einflußgröße auf die Veränderung der Genexpression im insuffizienten Herzen untersucht. Eine vermehrte AP-2 Expression wurde in Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie beobachtet.

Die vorliegende Arbeit zeigte, daß AP-2 α in kultivierten embryonalen Hühnerkardiomyozyten exprimiert wird und daß eine 3tägige Stimulation des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges mit Forskolin bzw. Isoprenalin zu einer Aktivierung der durch das AP-2 Element vermittelten Transkription führt, die mit einer vermehrten Expression von AP-2 α einhergeht. Dabei war die Höhe der AP-2 Expression abhängig von der Konzentration der Stimulationssubstanz in dem die Kardiomyozyten umgebenden Medium. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die in früheren Untersuchungen am insuffizienten menschlichen Herzen beobachtete gesteigerte Expression von AP-2 α zum einen Folge einer chronischen Stimulation des β -adrenergen Rezeptors durch vermehrt ausgeschüttete Plasma-Katecholamine ist und zum anderen zu einer Aktivierung von AP-2 Element kontrollierten Zielgenen führt und so zu der veränderten Genregulation im insuffizienten Herzen beiträgt.

Hingegen war in embryonalen Hühnerkardiomyozyten unter Stimulation mit Retinsäure über denselben Zeitraum anders als in anderen Zelltypen (wie Teratokarzinomzellen oder neuroektodermalen P19-Karzinomzellen) keine Veränderung der AP-2 α Expression zu beobachten. Diese Befunde deuten auf zelltypspezifische Unterschiede in Expression und Regulation von AP-2 α hin.

Daher sind Untersuchungen am insuffizienten Herzen auf die in anderen Geweben nachgewiesenen AP-2 Funktionen z.B. auf Wachstum und Differenzierung von Zellen nötig. Weitere Untersuchungen von Zielgenen einer AP-2 vermittelten Transkription am menschlichen Herzen tragen dann zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bei.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μm	Mikrometer
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-2	Activator Protein 2
AP-2 α	α -Isoform des AP-2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
bidest.	bidestillata
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
ca.	Circa
Ci	Curie
Cl ⁻	Chloridionen
cm	Centimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CRE	cAMP responsives Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CSQ	Calsequestrin
Ctr	Kontrolle
Da	Dalton
DCM	dilatative Kardiomyopathie

DMEM	Dulbecco's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
G _i	inhibitorisches GTP-bindendes Protein
G _s	stimulierendes GTP-bindendes Protein
PKM	Primärkulturmedium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fetales Kälber Serum
g	1. Erdbeschleunigung (1g = 9,80665 m/s ²) 2. Gramm
G	Guanin
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
I	Iod
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
ICM	ischämische Kardiomyopathie
k	Kilo-
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Mol
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N	beliebige Base
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NA ₂ S ₂ O ₅	Dinatriumsulfoxid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PKA	Proteinkinase A
PKM	Primärkulturmedium
Poly A	Polyadenylationssignal
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Tyrosinkinase
Tnl	Troponin I
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

7. Literaturverzeichnis

Antos C, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001)

Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a

Circ Res 89: 997-1004

Bodner M, Karin M (1987)

A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells

Cell 50: 267-275

Bosher JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC (1996)

A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma

Oncogene 13: 1701-1707

Bosher JM, Williams T, Hurst HC (1995)

The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma

Proc Natl Acad Sci USA 92: 744-747

Braunwald E (1997)

Pathophysiology of Heart Failure

Heart Disease: 393-418

Bristow M, Hershberger R, Port JD, Minobe W, Rasmussen R (1989)

β_1 - and β_2 -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium

Mol Pharm 35: 295-303

Buettner R, Kannan P, Imhof A, Bauer R, Yim SO, Glockshuber R, Van Dyke MW, Tainsky MA (1993)

An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2

Mol Cell Biol 13: 4174-4185

Buettner R, Moser M, Pscherer A, Imhof A, Bauer R, Hofstaedter F (1994)

Molecular cloning of a new AP-2 transcription factor, AP-2 β , and its function in cell differentiation

Verh Dtsch Ges Pathol 78: 38-42

Cohn JN (1986)

Nervous system control mechanisms in heart failure

Acta Med Scand Suppl 707: 15-20

Courtois SJ, Lafontaine DA, Lemaigre FP, Durviaux SM, Rousseau GG (1990)

Nuclear factor I and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to the overlapping promoter sequences and transactivate the human growth hormone

Nucl Acids Res 18: 57-64

Creaser PC, D'Argenio DA, Williams T (1996)

Comparative and functional analysis of the AP-2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity

Nucl Acids Res 24: 2597-2605

Daly P, Sole M (1990)

Myocardial catecholamines and the pathophysiology of heart failure

Circulation 82 (2 Suppl): 135-143

Danielsen W, Leyen v. der H, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmar P (1989)

Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations

J Cardiovasc Pharmacol 14: 171-173

Davies MJ, McKenna WJ (1994)

Dilated cardiomyopathy: an introduction to pathology and pathogenesis

Br Heart J 72 (Suppl.): 24

Decary S, Decesse JT, Ogryzko V, Reed JC, Naguibneva I, Harel-Bellan A, Cremisi CE (2002)

The retinoblastoma protein binds the promotor of the survival gene bcl-2 and regulates its transcription in epithelial cells through transcription factor AP-2

Mol Cell Biol 22: 7877-7888

Donaldson LF, McQueen DS, Seckl JR (1995)

Induction of transcription factor AP-2 mRNA expression in rat primary afferent neurons during acute inflammation

Neurosci Lett 196: 181-184

Durand JB, Abchee AB, Roberts R (1995)

Molecular and Clinical Aspects of Inherited Cardiomyopathies

Ann Med 27: 311-317

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999)

Progressive hypertrophy and heart failure in β_1 -adrenergic receptor transgenic mice

Proc Natl Acad Sci 96: 7059-7064

Eschenhagen T, Friedrichsen M, Gsell S, Hollmann A, Mittmann C, Schmitz W, Scholz H, Weil J, Weinstein LS (1996)

Regulation of the human $G_i \alpha_2$ gene promoter activity in embryonic chicken cardiomyocytes

Basic Res Cardiol: 41-46

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Warnholtz A, Wüstel JM (1991)

Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein α -subunits in rat heart

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 343: 609-615

Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B, Sacca L, Chang CC, Yang MW, Lin SM, Kuo TB, Chan KH, Lin CY (1996)

A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy

N Engl J Med 334: 809-814

Felker GM, O'Connor CM (2001)

Inotropic therapy for heart failure: an evidence-based approach

Am Heart J 142: 393-401

Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H, Leiden JM (1998)

Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart

J Clin Invest 101: 2415-2426

Garcia MA, Campillos M, Marina A, Valdivieso F, Vazquez J (1999)

Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation

FEBS 4444: 27-31

- Garcia M, Vazquez J, Gimenez C, Valdivieso F, Zafra F (1996)
Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells
J Neurosci 16: 7550-7556
- Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M (1995)
Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2
EMBO J 14: 1508-1519
- Gershenwald JE, Sumner W, Calderone T, Wang Z, Huang S, Bar-Eli M (2001)
Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo
Oncogene 20: 3363-3375
- Goldspink PH, Russell B (1994)
The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes
Circ Res 74: 1042-1049
- Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H (1997)
Calcium handling proteins in the failing human heart
Basic Res Cardiol 1:87-93
- Hill CS, Treisman R (1995)
Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity
Cell 80: 199-211
- Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossmann W, Levy D (1993)
Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects
Circulation 88: 107-115

Hosenpud JD, Novick RJ, Breen TJ, Daily OP (1994)
The registry of the international society for heart and lung transplantation:
eleventh official report 1994
J Heart Lung Transplant 13: 561

Imagawa M, Chiu R, Karim M (1987)
Transcription Factor AP-2 Mediates Induction by Two Different Signal-
Transduction Pathways: Protein Kinase C and cAMP
Cell Press 51: 251-260

Imhof A, Schuierer M, Werner O, Moser M, Roth C, Bauer R, Buettner R (1999)
Transcription regulation of the AP-2 α promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel
wt-1/egr-related zinc finger repressor
Mol Cell Biol 19: 194-204

Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen van P, Schott P, Brodde OE,
Hasenfuss G (2003)
Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-
induced right ventricular hypertrophy in the rat
Circ Res 93: 230-237

Lafyatis R, Lechleider R, Kim SJ, Jakowlew S, Roberts AB, Sporn MB (1990)
Structural and functional characterization of the transforming growth factor β 3
promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced
transcription
J Biol Chem 265: 19128-19136

Lafyatis R, Denhez F, Williams T, Sporn M, Roberts A (1991)
Sequence specific protein binding to and activation of the TGF-beta 3 promoter
through a repeated TCCC motif
Nucl Acids Res 19: 6419-6425

Leri A, Liu Y, Malhotra A, Li Q, Stiegler P, Claudio PP, Giordano A, Kajstura J, Hintze TH, Anversa P (1998)

Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes

Circulation 97: 194-203

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS (2002)

Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure

N Engl J Med 347: 1397-1402

Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, Müller FU, Neumann J, Nose M, Jones LR, Schmitz W, Scholz H (1996)

Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca²⁺ATPase in failing and nonfailing human hearts

Cardiovasc Res 31: 625-632

Lompré A, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, van Thieme N, Swynghedauw B (1979)

Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload

Nature 282: 105-107

Lüscher B, Mitchell PJ, Williams T, Tjian R (1989)

Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers

Genes Dev 3: 1507-1517

Malhotra R, Tyson D, Sone H, Aoki K, Kumagai A, Brosius F (2002)
Glucose Uptake and Adenoviral Mediated GLUT1 Infection Decrease Hypoxia-induced HIF-1 α Levels in Cardiac Myocytes
J Mol Cell Cardiol 34: 1063-1073

Mayer B, Kaiser T, Kempt P, Cornelius T, Holmer SR, Schunkert H (2002)
Molekular cloning and functional characterization of the upstream rat atrial natriuretic peptide promotor
J Hypertension 20: 219-228

McMinn TR, Ross J (1995)
Hereditary dilated cardiomyopathy
Clin Cardiol 18: 7-15

Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Steinfarth M (1992)
Isoprenaline induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart
Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol 345: 44-50

Mertens PR, Alfonso Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH (1998)
A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription
J Biol Chem 273: 32957-32965

Mertens, PR, Steinmann K, Alfonso-Jaume MA, En-Nia A, Sun Y, Lovett DH (2002)
Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells
J Biol Chem 277: 24875-24882

Mitchell PJ, Eschenhagen T, Scholz A (1998)

Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure
Cardiovasc Res 39: 267-275

Mitchell PJ, Wang C, Tjan R (1987)

Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV 40 T antigen
Cell 50: 847-861

Mittmann C, Eschenhagen T, Scholz A (1998)

Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure
Cardiovasc Res 39: 267-275

Mittmann C, Munstermann U, Weil J, Bohm M, Herzig S, Nienaber C, Eschenhagen T (1998)

Analysis of gene expression patterns in small amounts of human ventricular myocardium by a multiplex RNase protection assay
J Mol Med 76: 133-140

Moser M, Imhof A, Pscherer A, Bauer R, Amselgruber W, Sinowatz F, Hofstädter F, Schüle R, Buettner R (1995)

Cloning and expression of a second AP-2 transcription factor: AP-2
Development 121: 2779-2788

Motomura S, Deighton NM, Zerkowski HR, Doetsch N, Michel MC, Brodde OE (1990)

Chronic β_1 -adrenoceptor antagonist treatment sensitizes β_2 -adrenoceptors, but desensitizes M_2 -muscarinic receptors in the human right atrium
Br J Pharmacol 101: 363-369

Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR (1994)
Ca²⁺-transporting ATPase, phospholamban and calsequestrin levels in
nonfailing and failing human myocardium
Circulation 90: 653-657

Müller FU, Boknik P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U,
Böhm M, Deng MC, Scheld HH (1995)
cAMP Response Element Binding Protein Is Expressed and Phosphorylated in
The Human Heart
Circulation 92: 2041-2043

Müller FU, Boknik P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U,
Walter A (1995)
In vivo isoproterenol treatment leads to downregulation of the mRNA encoding
the cAMP response element binding protein in the rat heart
Biochem Biophys Res Commun 215: 1043-1049

Müller FU, Neumann J, Schmitz W (2000)
Transcriptional regulation by cAMP in the heart
Mol Cell Biochem 212: 11-17

Müller FU, Boknik P, Knapp J, Linck B, Lüss H, Neumann J, Schmitz W (2001)
Activation and inactivation of cAMP-response element-mediated gene
transcription in cardiac myocytes
Cardiovasc Res 52: 95-102

Müller FU, Loser K, Kleideiter U, Neumann J, von Wallbrunn C, Dobner T,
Scheld HH, Bantel H, Engels IH, Schulze-Osthoff K, Schmitz W
Transcription factor AP-2alpha triggers apoptosis in cardiac myocytes
Cell Death Differ 11:485-493.

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P (1988)
Increase in myocardial G_i-proteins in heart failure
Lancet 2: 936-937

Oulad-Abdelghani M, Bouillett P, Chazaud C, Dolle P, Chambon P (1996)
AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during
differentiation of P19 embryonal carcinoma cells
Exp Cell Res 225: 338-347

Packer M (1987)
Prolonging life in patients with congestive heart failure. The next frontier
Circulation 75 (5 Pt 2): IV 1-3

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM,
Shusterman NH (1996)
The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart
failure.
N Engl J Med 334:1349-1355

Philipp J, Mitchell PJ, Malipiero U, Fontana A (1994)
Cell Type-Specific Regulation of Transcription Factor AP-2 in Neuroectodermal
Cells
Developmental Biology 165: 602-614

Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D, Holtz J
(2002)
Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without
caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragil balance of myocyte
survival
J Am Coll Cardiol 39: 481-488

Schorle HP, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996)
Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development
Nature 381: 235-238

Schumann H, Morawietz H, Hakim K, Zerkowski HR, Eschenhagen T, Holtz J, Darmer D (1997)
Alternative splicing of the primary Fas transcript generating soluble Fas antagonists is suppressed in the failing human ventricular myocardium
Biochem Biophys Res Commun 239: 794-798

Schwartz K, De la Bastie D, Bouvere P, Oiviero P, Alonso S, Buckingham M (1986)
 α -skeletal muscle actin mRNA accumulate in hypertrophied adult rat hearts
Circ Res 59: 551-555

Sigmund M, Jakob H, Becker H, Hanrath P, Schumacher C, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M (1996)
Effects of metoprolol on myocardial β -adrenoceptors and G_i α -proteins in patients with congestive heart failure
Eur J Clin Pharmacol 51: 127-132

Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J, Scholz H, Forstermann U, Gath I (1998)
Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure
J Am Coll Cardiol 32: 1179-1186

Steinfath M, Lavicky J, Schmitz W, Scholz H, Doring V, Kalmar P (1993)
Changes in cardiac beta-adrenoceptors in human heart diseases: relationship to the degree of heart failure and further evidence for etiology-related regulation of β_1 and β_2 subtypes
J Cardiothorac Vasc Anesth 7: 668-673

Tran KL, Lu X, Lei M, Feng Q, Wu Q (2004)

Up-regulation of corin gene expression in hypertrophic cardiomyocytes and failing myocardium

Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: 1625-1631

Vernimmen D, Gueders M, Pisvin S, Delvenne P, Winkler R (2003)

Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers

Br J Cancer 98: 899-906

Wang G, Yeh HI, Lin JJ (1994)

Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene

J Biol Chem 269: 30595-30603

Werdan K, Reithmann C (1987)

Neonatale und embryonale Herzmuskelzellen als Myokardmodell

Stuttgart; New York, Thieme (Thieme Copythek)

WHO (1992)

Physicians guidelines (for GPS) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians

Williams T, Admon A, Lüscher B, Tjian R (1988)

Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements

Genes Dev 2: 1557-1569

Williams T, Tjian R (1991)

Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins

Science 251: 1067-1071

Williamson JA, Bosher JM, Skinner A, Sheer D, Williams T, Hurst HC, Denhez F, Lafyatis R (1996)

Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. Conservation of regulated alternative splicing and identification of functional domains in vertebrate homologs to the *Drosophila* splicing regulator, suppressor-of-white-apricot
Genomics 35: 262-264

Yang C, Kim HS, Seo H, Kim KS (1998)

Identification and characterization of potential cis-regulatory elements governing transcriptional activation of the rat tyrosine hydroxylase gene
J Neurochem 71: 1358-1368

Zhang J, Hagopian, Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowitch D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996)

Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2
Nature 381: 238-241

Zhao F, Satoda M, Lich JD, Hayashizaki Y, Gelb BD (2001)

Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2 δ , with unique DNA binding and transactivation properties
J Biol Chem 276: 40755-40760

8. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz danke ich für seine stets engagierte Kritik, sowie vielfältige Hilfe in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller für die Vergabe des Themas dieser Arbeit. Er hat mich in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit außerordentlich engagiert unterstützt.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Neumann danke ich für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit und mannigfache Hilfe.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den technischen Assistentinnen des Instituts. Insbesondere Frau Andrea Walter und Frau Cordula Vischedyck gebührt mein herzlicher Dank zum einen für die Hilfe beim Erlernen labortechnischer Methoden, zum anderen für die stete Unterstützung in besonders arbeitsintensiven Phasen des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Meinem Mann Matthias danke ich ganz herzlich für die aufgebrachte Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

9. Lebenslauf