

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Markus Steinfath
Akademischer Vertreter: Prof. Dr. med. Norbert Weiler)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN
ZUM EINFLUSS VON INTERLEUKIN-1 β
AUF DAS KARDIALE REMODELLING

Eine experimentelle Studie

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
Der Medizinischen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

BERENICE BRANDT

aus Kiel

Kiel, 2012

Die erhobenen Daten wurden an den folgenden Stellen veröffentlicht:

Publikation: Zitta K, Brandt B, Wuensch A, Meybohm P, Bein B, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Interleukin-1beta regulates cell proliferation and activity of extracellular matrix remodelling enzymes in cultured primary pig heart cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;399(4):542-547.

Posterpräsentation: Zitta K, Brandt B, Wuensch A, Bein B, Albrecht M. IL-1 β regulates cell proliferation and activity of extracellular matrix remodelling enzymes in cultured primary pig heart cells. *Euroanesthesia, Meeting of the European Society of Anesthesiology*, Helsinki, Finnland, 2010.

1. Berichterstatter: PD Dr. Albrecht

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kremer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 13.06.2013

Gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi (Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Histologie des Myokards.....	1
1.2 Der Myokardinfarkt.....	2
1.2.1 Pathophysiologie des Myokardinfarktes	2
1.2.2 Zelluläre Mechanismen	3
1.2.3 Modellsysteme des Myokardinfarktes	4
1.3 Zytokine und die Familie der Interleukine	5
1.3.1 Das IL-1 β	5
1.3.2 Die IL-1 β Rezeptoren	5
1.3.3 IL-1 β Wirkungen auf zellulärer Ebene	7
1.4 Das kardiale Remodelling	9
1.4.1 Zellproliferation und Apoptose.....	9
1.4.2 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren.....	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Zellkultur	15
2.1.2 Molekularbiologie.....	15
2.1.3 Proteinbiochemie	17
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
2.2.2 Molekularbiologie.....	22
2.2.3 Proteinbiochemie	27
3 Ergebnisse	30
3.1 Charakterisierung der primären Schweineherzzellen	30

3.2	Expression des IL-1RI.....	32
3.3	Regulation der Proliferation durch IL- 1 β	34
3.4	Regulation der Expression und Aktivität der Pro-Caspase-3 durch IL- 1 β	35
3.5	Regulation der Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 durch IL-1 β	37
3.6	Regulation der Genexpression von TIMP-2 durch IL-1 β	39
4	Diskussion	41
4.1	Kultivierung primärer Schweineherzzellen und Nachweis des IL-1RI.....	41
4.2	Effekte von IL-1 β auf die Proliferation und Apoptose.....	42
4.3	Effekte von IL-1 β auf das Remodelling	46
4.4	Ausblick.....	49
5	Zusammenfassung.....	50
6	Literaturverzeichnis	51
7	Danksagung.....	56
8	Lebenslauf	57

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Anatomie und Histologie des Herzens	1
Abbildung 2: IL-1 β Rezeptoren.....	6
Abbildung 3: Wirkungen von IL-1 β	8
Abbildung 4: Das kardiale Remodelling.....	9
Abbildung 5: Die Apoptosekaskade.....	11
Abbildung 6: Regulation der MMPs	12
Abbildung 7: Stimulation der Schweineherzzellen mit IL-1 β	22
Abbildung 8: Strukturformeln von MTS und Formazan	26
Abbildung 9: Morphologie der Schweineherzzellen und Expression von Troponin C.....	31
Abbildung 10: Expression des IL-1RI	33
Abbildung 11: Effekte von IL-1 β auf die Zellproliferation	34
Abbildung 12: Effekte von IL-1 β auf die Expression und Aktivierung der Pro- Caspase-3	36
Abbildung 13: Effekte von IL-1 β auf die Genexpression von MMP-2 und MMP-9	38
Abbildung 14: Effekte von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität von MMP-2 und MMP-9.....	39
Abbildung 15: Effekte von IL-1 β auf die Genexpression von TIMP-2.....	40

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide.....	16
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	17
Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	18

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Aqua dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ANOVA	analysis of variances
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl₂	Calciumchlorid
Caspase	Cysteiny-Asparyl-Proteasen
cDNA	complementary Desosyribonucleic acid (komplementäre DNA)
CKMB	Creatinin-Kinase-Muscle-Brain (Kreatininkinase)
cm	centimeter
CO₂	carbon dioxide (Kohlenstoffdioxid)
D	Deutschland
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desosyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated kinase)
et al.	et alii (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	forward
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	hour(s) [Stunde(n)]
HBSS	Hank's buffered salt solution
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IkB	Inhibitor κB
IL	Interleukin
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1Ra	Interleukin Rezeptor Antagonist
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Histologie des Myokards

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, welches den Blutkreislauf des Körpers antreibt. Die Herzwand besteht aus drei Schichten: Innen an den Blutstrom angrenzend liegt das aus Endothel und Bindegewebe aufgebaute Endokard. In der Mitte bildet das Myokard als Herzmuskelschicht die stärkste Wandschicht. Außen grenzt das Epikard das Organ über Bindegewebe und Mesothel gegen den Perikardbeutel ab.

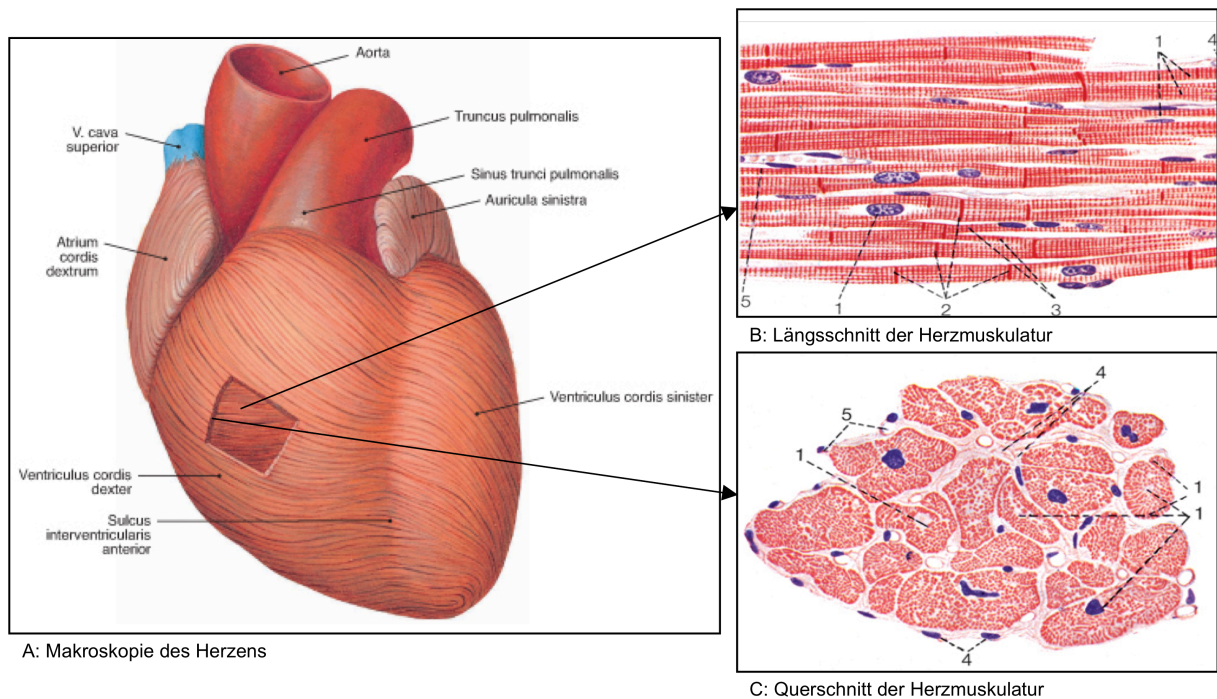


Abbildung 1: Anatomie und Histologie des Herzens

Die makroskopische Ansicht des Herzens verdeutlicht an Hand der Fensterung des rechten Ventrikels den dreischichtigen Aufbau der Muskulatur: Die äußere, subepikardiale Schicht geht an der Ventrikelspitze in die mittlere und innere, subendokardiale Schicht über (A). Histologisch lassen sich sowohl im Längsschnitt (B), als auch im Querschnitt (C) des Myokardgewebes die großen kardialen Myozyten (1) mit ihren Glanzstreifen (2) und Verzweigungen (3) sowie dem umgebenden Bindegewebe mit vielen Fibroblasten (4), welches die versorgenden Gefäße (5) führt, differenzieren.

Putz, Pabst, Sobotta Atlas der Anatomie 2, 22.A, Elsevier GmbH / Lippert, Anatomie 7.A, Elsevier GmbH

Der Hauptbestandteil des Myokardes sind Kardiomyozyten, ca. 100 µm lange Zellen mit einer hohen Dichte an Mitochondrien im Zytosol zwischen den Myofibrillen. Unter den Kardiomyozyten bilden sich viele Zellkontakte, vor allem Adhärens-Kontakte und

Desmosomen aus. Über Gap junctions werden die Kardiomyozyten elektrophysiologisch zu einer mechanischen Einheit vereint. Das Myokard wird durch das Endomysium gegliedert. Diese bindegewebigen Straßen umhüllen jede Myozytenkette und enthalten die Mikrogefäße des Myokardgewebes. Dieses dichte Kapillarsystem verläuft parallel zu den Myozyten und sichert die Blutversorgung¹ (Abbildung 1).

Die kleineren Fibroblasten, welche in Bezug auf die Zellzahl mit 60% im humanen Herzgewebe am stärksten vertreten sind, stellen nur einen Drittel des Volumens des Myokardgewebes dar². Sie liegen in Strängen und Bahnen parallel zu den Myozyten im Endomysium und sichern die Integrität des Myokardgewebes². Die größeren Myozyten dominieren das mikroskopische Bild, stellen jedoch nur 30% der Zellen. 90% der Zellen im Myokard sind Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten. Der restliche Anteil wird durch mesenchymale Zellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen gebildet³.

Im Gegensatz zu den kardialen Myozyten, deren Replikationskapazität im adulten Herz begrenzt ist, behalten die kardialen Fibroblasten ihre Fähigkeit zur Proliferation. Die Zellzahl kann sich im Laufe des Lebens zum Beispiel im Rahmen eines Herzinfarktes erhöhen². Darüber hinaus sind kardiale Fibroblasten die wichtigsten Produzenten von Botenstoffen, z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β), die Kardiomyozytenwachstum, Proliferation der Fibroblasten und Homöostase der extrazellulären Matrix (EZM) regulieren⁴.

1.2 Der Myokardinfarkt

1.2.1 Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Der Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen bei Männern und Frauen^{5, 6}. In Deutschland lagen als Todesursachen im Jahr 2009 Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit letalem Ausgang mit 41,7% weit vor Neoplasien (26,0%) und Erkrankungen des respiratorischen Systems (7,4%)⁷.

Ein Herzinfarkt entsteht meist im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit⁸. Eine Lymphozyten- und Lipidanreicherung führt dabei zur Verdickung und Verkalkung der

Gefäßintima. An dieses vorgeschädigte Endothel können leicht Thromben adhären und die stenosierten Gefäße komplett verschließen. Da die Koronargefäße Endarterien ohne Kollateralen sind, kann der Sauerstoffbedarf des Herzgewebes nicht gedeckt werden. Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation WHO liegt ein Myokardinfarkt vor, wenn zwei der folgenden Kriterien zutreffen: Ischämische Symptome wie retrosternale Schmerzen mit charakteristischer Ausstrahlung für ≥ 20 Minuten, EKG-Veränderungen oder pathologischer angiographischer Befund und Nachweis einer Myokardschädigung im Blut an Hand der Marker Troponin T/I oder CKMB^{8,9}.

40% der Patienten überleben die ersten 48 Stunden nach einem Infarkt nicht. Die durch die Ischämie induzierten Prozesse führen zu Extrasystolen und Kammerflimmern. Ausgedehnte Nekrosen bergen die Gefahr einer Herzwandruptur mit Herzbeuteltamponade, Ventrikelseptumruptur und Papillarmuskelabriss. Spätkomplikationen sind die Linksherzinsuffizienz bei 33% und Herzwandaneurysmata bei 20% der Patienten⁸.

1.2.2 Zelluläre Mechanismen

Nach einem Myokardinfarkt setzen im infarzierten, nekrotischen Gewebe und im umgebenden gesunden Myokard Umbauprozesse auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene sowie in der EZM ein, die als Remodelling bezeichnet werden. Dabei verändert sich die Größe, Form und Funktion des Herzens durch Dilatation und Hypertrophie des betroffenen Ventrikels.

Die Ischämie und ihre Folgen wie Azidose und Hypoglykämie schädigen die Zellen, es werden nekrotische und apoptotische Vorgänge eingeleitet. Im Kerngebiet des Herzinfarktes mit den geringsten Sauerstoffkonzentrationen ist der Verlust an Kardiomyozyten durch Nekrose am größten. In dem Randbereich des Infarktes zeigen die Zellen Anzeichen des programmierten, apoptotischen Zelltodes¹⁰. Auf das gesunde Myokardgewebe wirkt eine erhöhte Wandspannung, die dort zur Hypertrophie oder Apoptose der Kardiomyozyten und zur interstitiellen Fibrose führen kann¹¹.

Bei der Nekrose kommt es zu einem Austritt zytosolischer Bestandteile in das umgebende Gewebe. Durch chemotaktische Prozesse infiltrieren Entzündungszellen das geschädigte Gebiet. Sie entfernen Zellreste und koordinieren die Reparatur,

indem sie die lokale Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β durch ortsständige Fibroblasten und Immunzellen stimulieren. Pathologisch lassen sich an Hand der Entzündungszellinfiltration mehrere Stadien des Infarktes unterscheiden:

1. Die akute Ischämie ist charakterisiert durch die Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten, welche Neovaskularisation, Fibroblastenproliferation und die Freisetzung von Interleukinen induzieren⁹.
2. Nach 6-7 Tagen ist der heilende Infarkt durch den Ersatz der Leukozyten durch mononukleäre Zellen und Fibroblasten gekennzeichnet⁹, welche Kollagene synthetisieren und die Umbauprozesse der Extrazellulärmatrix durch die gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) modulieren¹⁰.
3. Nach fünf bis sechs Wochen besteht der abgeheilte Infarkt aus einer bindegewebigen Narbe ohne zelluläre Infiltration⁹.

1.2.3 Modellsysteme des Myokardinfarktes

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle für Studien am kardiovaskulären Systems entwickelt: Versuche an Ratten eigneten sich dabei sehr gut, um Grundlagen zellulärer und molekularer Mechanismen zu verstehen¹² und um Reperusionsversuche an großen Arterien durchzuführen¹³. Hunde wurden lange Zeit für Studien an Koronargefäßen verwendet, doch sie besitzen im Gegensatz zur menschlichen Anatomie variable Kollateralgefäße, welche die Perfusion verschlossener Gefäße ersetzen können¹⁴. In letzter Zeit hat sich insbesondere das Schwein als geeignetes Modell für Versuche in der Ischämie- und Reperusionsforschung etabliert, da die Anatomie und Physiologie der Koronararterien mit dem Menschen weitgehend vergleichbar sind¹⁴: Die Koronararterien besitzen kaum vorbestehende Kollateralgefäße, welche die Perfusion nach einem Gefäßverschluss aufrecht erhalten könnten. Das Reizleitungssystem ist im Vergleich zum menschlichen sehr ähnlich aufgebaut und die relative Größe des Herzens im Vergleich zum Körpergewicht ist entsprechend. Darüber hinaus ist der Metabolismus beim Schwein im Vergleich zum Menschen nahezu identisch: Unter normalen Bedingungen decken ungesättigte Fettsäuren den Energiebedarf. Stärkere körperliche Aktivität oder subletale Umstände wie eine Myokardischämie führen zu einer stärkeren Verwertung von Glukose^{13, 14}. Aus den genannten Gründen wurde auch in unserer Klinik das Schwein als Versuchstier in

Bezug auf das kardiovaskuläre System gewählt: Das Schweinemodell diente sowohl für Großtierstudien¹⁵, als auch für diese experimentelle Arbeit als Grundlage.

1.3 Zytokine und die Familie der Interleukine

1.3.1 Das IL-1 β

Bei den Zytokinen handelt es sich um eine heterogene Klasse von Glykoproteinen. Sie üben eine Regulatorfunktion des Immunsystems auf Gewebe und Zellen aus, indem sie die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen vieler Organsysteme des menschlichen Organismus beeinflussen¹⁶⁻²¹. Die Zytokine gliedern sich in vier Hauptgruppen: Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren und Interleukine. Von diesen nehmen die Interleukine als Signalstoffe des Immunsystems während einer Entzündung eine zentrale Stellung ein. Interleukine bilden eine inhomogene Gruppe aus über dreißig strukturell ähnlichen Molekülen mit unterschiedlichen, teils gegensätzlichen Wirkungen.

Das Interleukin-1 ist ein pleiotropes, hormonähnliches Polypeptid (17 kDa), welches von vielen Zellen, wie mononukleären inflammatorischen Zellen, Epithelzellen, Endothelzellen, mesangialen Zellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten, produziert wird²². Die Mitglieder der Interleukin-1-Familie sind: IL-1 α , IL-1 β , IL-18 und der IL-Rezeptorantagonist (IL-1Ra)²³.

Das IL-1 β ist der wichtigste Entzündungsmediator aus dieser Gruppe, welcher im gesamten Körper, insbesondere im Myokard, eine essentielle Rolle in Remodellingprozessen einnimmt²⁴. IL-1 β -Vorläufer werden biologisch inaktiv im Zytosol und in sekretorischen Lysosomen gespeichert. Sobald die Zelle aktiviert wird, spaltet die angelagerte Caspase-1 das Pro-IL-1 β zum aktiven IL-1 β , welches nach der Sekretion an einen der beiden IL-1 Rezeptortypen bindet und seine spezifischen zellulären Wirkungen vermittelt²⁵.

1.3.2 Die IL-1 β Rezeptoren

IL-1 β bindet an zwei verschiedenen Rezeptoren mit unterschiedlichen Funktionen: den signalvermittelnden IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) und den IL-1 Rezeptor Typ II

(IL-1RII), welcher keine intrazelluläre Signalkaskade besitzt und dementsprechend als Decoy-Rezeptor fungiert.

Der IL-1RI hat eine Größe von 80 kDa und besitzt eine transmembranäre Domäne, worüber die Wirkungen des IL-1 β vermittelt werden (Abbildung 2). Sein zytoplasmatischer Teil, das IL-1 Rezeptor assoziierte Protein, ist wesentlich für die Signaltransduktion²⁶. Durch IL-1 β Bindung werden Kinasen aktiviert, welche weitere Enzyme und Faktoren phosphorylieren. Diese Verstärkung durch die intrazelluläre Kaskade aus Proteinen und Enzymen ist essentiell, da viele Zellen mit weniger als 100 IL-1RI besetzt sind^{22, 26}. IL-1 β greift hauptsächlich über zwei Signalwege in die Gentranskription ein: Einerseits werden Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktiviert²⁷, andererseits kann der nukleäre Faktor NF κ B, nach Inaktivierung seines Inhibitors I κ B, in den Zellkern translozieren und die Transkription bestimmter, durch IL-1 β regulierter Gene beeinflussen²⁶. Der IL-1RI ist der einzige Rezeptor, welcher die IL-1 β Wirkung vermittelt. Durch Applikation einer großen Menge des IL-1 Rezeptorantagonisten IL-1Ra, welcher den IL-1RI kompetitiv hemmt (s.u.), kann die Wirkung vollständig aufgehoben werden¹².

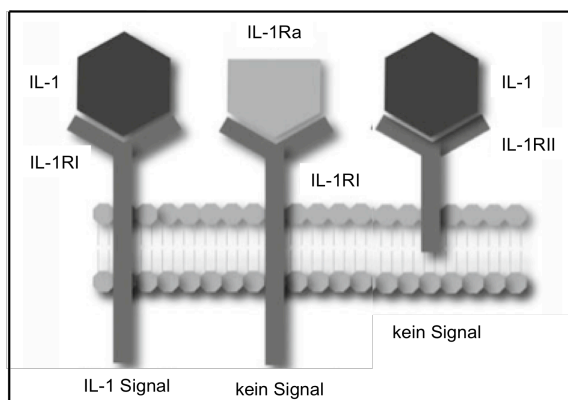


Abbildung 2: IL-1 β Rezeptoren

Der IL-1RI vermittelt die Wirkungen von IL-1 β über eine signalverstärkende, intrazelluläre Signalkaskade. Die Signaltransduktion kann durch die Bindung des Antagonisten IL-1Ra verhindert werden. Der IL-1 Rezeptor Typ II besitzt keine intrazelluläre Domäne und fungiert somit als Decoy-Rezeptor.

Modifiziert nach Bujak et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. 2009

Die Bindung des Antagonisten IL-1Ra an den IL-1RI verhindert eine Zusammenlagerung mit dem IL-1 Rezeptor assoziierten Protein und hemmt kompetitiv die Wirkung von IL-1 α und IL-1 β ²⁸.

Neben dem IL-1RI gibt es einen zweiten Rezeptor: Der IL-1RII besitzt als Decoy-Rezeptor keine intrazelluläre Domäne zur Signalweiterleitung²³. Dieser Rezeptor dient vorwiegend zum Abfangen von IL-1 β Molekülen und greift regulierend in die IL-1 β Wirkung ein²⁹.

1.3.3 IL-1 β Wirkungen auf zellulärer Ebene

Als proinflammatorisches Zytokin wird IL-1 β bei Gewebeverletzungen ausgeschüttet. Es spielt in vielen inflammatorischen Kaskaden im gesamten Organismus eine essentielle Rolle¹⁴⁻¹⁸. Eine kürzlich publizierte Studie unseres Institutes am Schweinmodell ergab, dass nach einem Myokardinfarkt und kardiopulmonaler Reanimation die Spiegel von IL-1 β im Myokardgewebe stark ansteigen (s. 1.2.3)¹⁵. Auch andere Arbeiten belegen die Anwesenheit und verstärkte Sekretion von IL-1 β im ischämischen Myokard³⁰⁻³². Diese Ergebnisse weisen auf eine essentielle Rolle von IL-1 β in der Koordination von zellulären Ereignissen und Geweberemodelling nach einem Myokardinfarkt hin.

Um seine Effekte präzise vermitteln zu können, besteht eine Kontrolle auf mehreren Ebenen: IL-1 β wird von verschiedene Zellarten sezerniert, die Spaltung des Pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β ist durch die enzymatische Aktivität der Caspase-1 limitiert, die Expression des IL-1RI auf den Zielzellen ist begrenzt und IL-1 β kann kompetitiv durch IL-1Ra gehemmt oder von dem IL-1RII abgefangen werden²³.

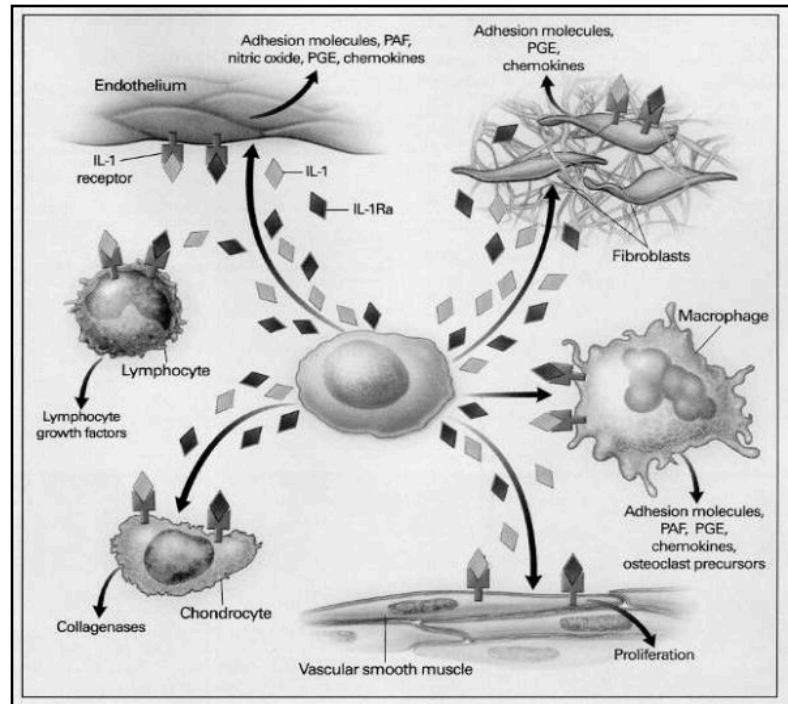
Die Wirkungen von IL-1 β im kardiovaskulären System auf zellulärer Ebene sind vielfältig und beeinflussen nicht-myokardiale Zellen ebenso wie die Kardiomyozyten²⁸:

Die Effekte von IL-1 β auf nicht-myokardiale Zellen im Herz sind verschiedenartig: In Endothelzellen bewirkt IL-1 β durch die Sekretion von Mediatoren (z.B. NO, PGE) eine Vasodilatation der Gefäße. Chemokine und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche erleichtern die Migration von zirkulierenden Leukozyten in das Gewebe. Durch IL-1 β stimulierte Lymphozyten modulieren die Entzündung und sezernieren Prostaglandine, welche die Vasodilatation verstärken und den Blutfluss sowie die Kapillarpermeabilität steigern²⁶.²⁷ Darüber hinaus stimuliert IL-1 β Makrophagen zur Phagozytose und aktiviert Fibroblasten zur Freisetzung von Inflammediatoren (Abbildung 3). Die aktivierten Zellen produzieren weitere Zytokine (v.a. IL-1 β), welche die Vorgänge autokrin und parakrin verstärken und die Myozyten beeinflussen (siehe unten)²⁸.

Abbildung 3: Wirkungen von IL-1 β

IL-1 β wirkt auf verschiedene Zelltypen. Im Herzgewebe wird der IL-1RI auf Endothelzellen, Myozyten, Fibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert. IL-1 β vermittelt über diese Zellen unterschiedliche Effekte, z.B. die Freisetzung weiterer Mediatoren wie NO, PGE, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und die Induktion von Gewebeumbau, dem Remodelling.

Dinarello et al., N. Engl. J. Med. 2000



Die Wirkung von IL-1 β auf Myozyten betrifft vor allem die Proliferation, Apoptose und Kontraktilität: Es liegen bisher nur wenige Studien zur Wirkung von IL-1 β auf Myozyten mit teils gegensätzlichen Ergebnissen vor: Sowohl die Größe als auch die Menge translatierter Proteine in kardialen Myozyten nehmen proportional zur Konzentration von IL-1 β im Myokard zu²⁷. Außerdem kann durch IL-1 β die DNA-Synthese der Kardiomyozyten reinitiiert¹² und die Sekretion von Wachstumsfaktoren stimuliert werden²⁸. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 β in Kardiomyozyten die Caspase-8 vermittelte Apoptose veranlasst¹⁰. Des Weiteren wirkt IL-1 β sowohl auf den gesamten Herzmuskel als auch auf isoliertes Myokard und kardiale Myozyten in der Zellkultur negativ inotrop, indem es die Kalziumkanalaktivität und Sensitivität der Myofilamente für Kalzium reguliert³³.

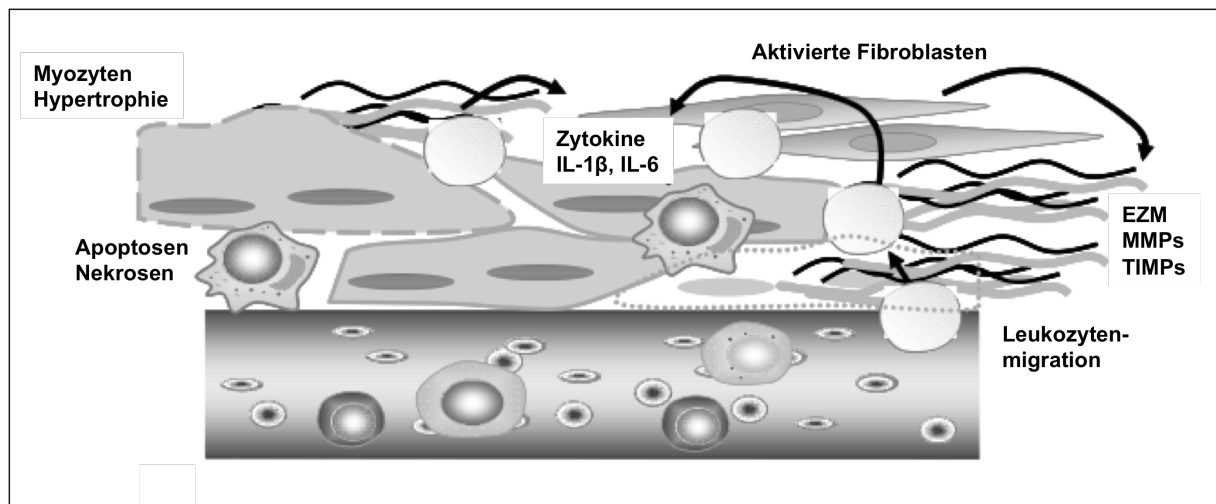
Liegen lokal erhöhte Konzentrationen von IL-1 β vor, so kann dieses in das Kreislaufsystem übergehen und Einfluss auf systemische Reaktionen nehmen: IL-1 β reguliert u.a. die Synthese von Akute-Phase-Proteinen zur Lokalisation und Eindämmung einer Entzündung, von C-reaktivem Protein und α -Antitrypsin in der Leber und von Glukokortikoiden in der Nebenniere²⁶.

Zusammenfassend stellen sich die zellulären Wirkungen von IL-1 β sehr heterogen dar: Auf der einen Seite wirkt es auf verschiedene nicht-myokardiale Zellarten stimulierend, fördert die Sekretion von Entzündungsmediatoren und die Phagozytose. Auf der anderen Seite regt IL-1 β Myozyten zur Proliferation und

Sekretion von Wachstumsfaktoren an. Im Gegensatz dazu kann es unter anderen Umständen die Caspase-8 vermittelte, Rezeptor induzierte Apoptose einleiten (siehe unten).

1.4 Das kardiale Remodelling

Die Gewebeumbauprozesse (Remodelling) im Herzgewebe umfassen einerseits Zellen, die zur Proliferation angeregt und apoptotisch oder nekrotisch dem Zelltod zugeführt werden, andererseits die Regulation der extrazellulären Matrix (EZM) durch die MMPs und ihre Inhibitoren (Abbildung 4).



Modifiziert nach Nian et al., *Circulation Research*, 2004

Abbildung 4: Das kardiale Remodelling

Im Rahmen des Remodelling werden Zellen aktiviert und zum Wachstum angeregt, andere sterben kontrolliert apoptotisch oder nekrotisch. Im Gewebe werden Zytokine zur Modulation der Entzündung freigesetzt und Leukozyten wandern ein. Komponenten der extrazellulären Matrix werden produziert und durch das Zusammenspiel zwischen Proteasen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) modifiziert.

1.4.1 Zellproliferation und Apoptose

Das kardiale Gewebe passt sich äußeren Umständen wie geänderter mechanischer Belastung an. Durch höhere Beanspruchung des Herzmuskels kann die Muskelmasse zunehmen. Dieser Effekt beruht vor allem auf einer Vergrößerung (Hypertrophie) der Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu werden Gewebedefekte nach einem Infarkt vor allem durch Fibroblastenproliferation gedeckt¹. Umgewandelt

zu Myofibroblasten besitzen Fibroblasten die Fähigkeit Kollagenetzwerke zu kontrahieren und sind essentiell für die Integrität des Narbengewebes².

Ein Herzinfarkt bewirkt im geschädigten Gebiet zwei Arten des Zelltodes, im zentralen Infarktgebiet vorwiegend Nekrosen, peripher vermehrt Apoptosen¹⁰ (s.1.2.2). Die Nekrose wird dabei durch externe Einflüsse wie Hypoxie, physikalische und chemische Schädigung verursacht. Nekrosen gehen mit der Ruptur von Zellmembranen einher, zytoplasmatische Bestandteile und Enzyme treten aus und entfalten ihre chemotaktische Wirkung. Einer Nekrose folgt zwingend eine Entzündungsreaktion¹. Die Apoptose dagegen ist der geregelte, physiologische Zelltod. Die Apoptosekaskade kann über verschiedene intrinsische oder extrinsische Reize ausgelöst werden. Es kommt zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA im Zellkern. Die Zelle schrumpft und zerfällt in apoptotische, von Plasmamembran umgebene Fragmente, welche von Makrophagen über Oberflächenmoleküle erkannt und phagozytiert werden¹⁶.

Die Caspasen (Cysteiny-Aspartyl-Proteasen) sind die Schlüsselenzyme der apoptotischen Kaskade. Die Caspase-3 ist ein zentraler Mediator der Apoptose, sie bildet die Endstrecke der intrinsischen und extrinsischen Apoptosekaskade: Die intrinsische Apoptosekaskade wird durch DNA-Schädigung, Hypoxie oder Glukokortikoide aktiviert. Die Freisetzung von Cytochrom-c aus der Wand der Mitochondrien führt durch Aktivierung der Caspase-9 zur Caspase-3 vermittelten Einleitung der Apoptose. Der extrinsische Weg bewirkt die gezielte Eliminierung einzelner Zellen. Die Bindung eines Todesliganden, wie beispielsweise IL-1 β ¹⁰, aktiviert die Caspase-8, welche Pro-Caspase-3 aktiviert¹⁶. Die Caspase-3 setzt die gemeinsame Endstrecke in Gang, es kommt zur Fragmentierung der DNA und Spaltung der Zytoskelettproteine¹ (Abbildung 5).

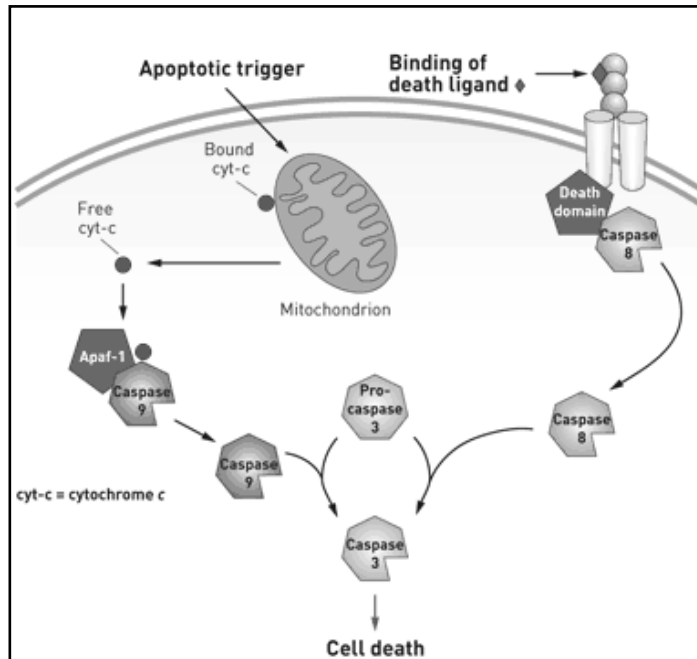


Abbildung 5: Die Apoptosekaskade

Der regulierte Zelltod kann durch zwei Hauptsignalwege initiiert werden: Der intrinsische Weg aktiviert über Cytochrom-c Freisetzung die Caspase-9, der extrinsische Weg über Ligandenbindung an den spezifischen Rezeptor die Caspase-8. Beide Wege aktivieren das Schlüsselenzym Caspase-3, welche die DNA-Fragmentierung und weitere zum Zelltod führende Prozesse reguliert.

Chemical & Engineering News, American Chemical Society, 2010

Nach einem Herzinfarkt könnten folglich beide Wege aktiviert werden, die intrinsische Kaskade durch die Hypoxie und die extrinsische Kaskade IL-1 β vermittelt. Apoptosen findet man nach einem Myokardinfarkt ubiquitär im Herzgewebe und bis zu 8 Wochen nach dem Infarktereignis sind apoptotische Parameter erhöht³⁴.

1.4.2 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Das Remodelling nach einem Myokardinfarkt betrifft nicht nur die zellulären Komponenten des Gewebes, sondern auch die EZM des Herzgewebes. Sie formt ein dreidimensionales Netzwerk bestehend aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Die wichtigsten fibrillären Kollagene sind Typ I und Typ III, welche 80% und 10% der Komponenten der EZM darstellen².

Spezifische Hormone, Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1 β) regulieren die kardialen Fibroblasten als Hauptproduzenten der EZM. Fibroblasten induzieren den Umbau des Interstitiums durch erhöhten Kollagenumsatz, Sekretion und Aktivierung von MMPs, TIMPs (tissue inhibitors of matrixmetalloproteinasen) und Zytokinen (IL-1 β und TNF- α).

Bei den MMPs handelt es sich um eine Gruppe von 28 zinkabhängigen Proteasen, die in der gesamten ischämischen Region nach einem Myokardinfarkt auftreten und am Gewebeumbau beteiligt sind¹¹. MMPs bilden nach ihren Strukturen, den zu spaltenden Substraten und ihrer Lokalisation (sezerniert oder membranständig)

mehrere Fraktionen. Im Myokard sezernieren Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen die Pro-MMPs folgender Gruppen: Kollagenasen (MMP-1, -13, -8), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -7) und die membranständige MMP-14. Alle sezernierten MMPs werden als inaktive Pro-MMPs abgegeben und erst am Wirkort durch Proteasen gespalten und so aktiviert (s.u.)³⁵.

Die Aktivität der MMPs kann auf verschiedenen Ebenen der Gentranskription und Translation, der Aktivierung durch proteolytische Spaltung durch andere MMPs, über posttranslationale Modifikation, durch die Interaktion mit endogenen Inhibitoren wie TIMPs und Degradierung durch Proteasen reguliert werden³⁶ (Abbildung 6).

Die Transkription der MMPs wird unter anderem durch Glukokortikoide, Noradrenalin und durch die Zytokine TNF und IL-1 β moduliert. Darüber hinaus erhöhen Sauerstoffradikale und mechanischer Stress, wie eine erhöhte Wandspannung im Herzen, die Transkription der MMPs³⁵. Posttranslational müssen Pro-MMPs durch den „Cysteinswitch“ aktiviert werden: Proteasen induzieren die Freigabe des katalytischen Zinkions, indem die cysteinhaltige Propeptiddomäne von dem aktiven Zentrum abgespalten wird. Bestimmte Kinasen können MMPs phosphorylieren und auf diesem Wege inaktivieren. Des Weiteren regulieren die Inhibitoren TIMP-1 bis TIMP-4 die Wirkungen der MMPs³⁷.

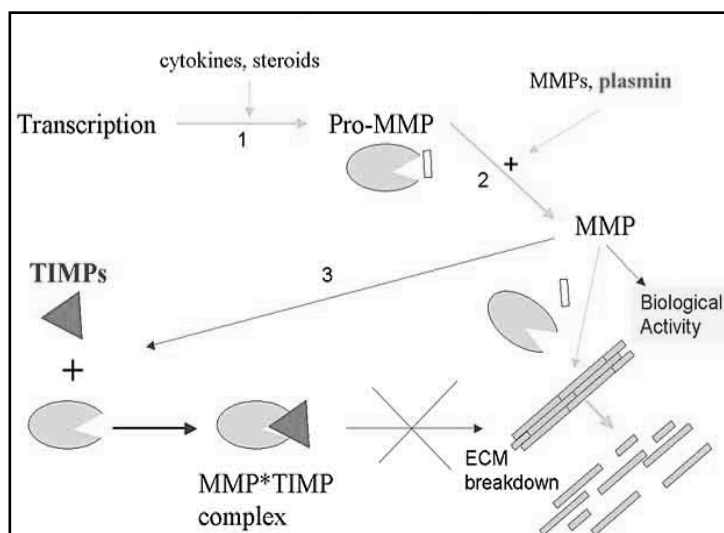


Abbildung 6: Regulation der MMPs

Die Aktivität der MMPs wird durch die Transkription (1), Aktivierung (2) und durch spezifische Inhibitoren, die TIMPs (3), reguliert. Sobald MMPs aktiviert sind, können sie Komponenten der EZM degradieren. Darüber hinaus können sie verschiedene biologische Aktivitäten regulieren indem sie Signalmoleküle aktivieren.

Zhang et al., *Frontiers in Bioscience* 10, 2005

MMPs übernehmen im Körper vielfältige Aufgaben: Sie spielen in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle und sind in Pathologien wie Tumormetastasierung, Entzündung und das Remodelling nach einem Myokardinfarkt

involviert³⁷. Neben der Eigenschaft Proteine der EZM zu spalten, besitzen sie die Fähigkeit, Zelloberflächenrezeptoren und Chemokine zu aktivieren. Die zwei sezernierten Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 gelten als essentielle Mediatoren in einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Atherosklerose, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz. Sie besitzen spezifische Aufgabenbereiche im Gewebeumbau: MMP-2 (Pro-MMP-2: 72 kDa, MMP-2: 64 kDa) spaltet vor allem die Kollagene Typ I, II, VI, V, VII, X und Fibronectin. Außerdem werden Proteoglykane, Elastin und IL-1 β durch MMP-2 inaktiviert^{38, 39}. MMP-9 (Pro-MMP-9: 92 kDa, MMP-9: 84 kDa) hydrolysiert Elastin und die Kollagene Typ I, III, IV, V, XI und XIV³⁸. Folglich können die MMPs sehr gezielt geschädigte Matrix abbauen, während z.B. die Fibroblasten neue Matrixbestandteile sezernieren.

Die Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, sind kleine (~23 kDa) cysteinreiche Proteine, die über sechs Disulfidbrücken stabilisiert werden. Sie bestehen aus einer kürzeren C-terminalen Domäne und einer langen N-terminalen Domäne, welche für die Inhibition der MMPs verantwortlich ist⁴⁰. Es gibt vier TIMP Proteine, TIMP-1 bis TIMP-4, welche alle im Herzgewebe von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten exprimiert werden⁴¹. TIMPs inhibieren die MMPs mit unterschiedlicher Substratspezifität³⁷, TIMP-2 beispielsweise zeigt die höchste Affinität gegenüber MMP-2 und -9⁴². Die Expression und Aktivität der TIMPs kann durch chemische und physikalische Stimuli reguliert werden, darüber hinaus scheinen Interleukine eine entscheidende Rolle bei der Regulation zu spielen².

1.5 Zielsetzung der Arbeit

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine führende Rolle in Remodellingprozessen im gesamten menschlichen Organismus spielt^{24, 43}. In vorhergehenden Studien an unserer Klinik konnten im kardialen Gewebe des Schweins nach induziertem Myokardinfarkt und kardiopulmonaler Reanimation erhöhte Konzentrationen des IL-1 β nachgewiesen werden¹⁵.

Aufbauend auf diesen Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung gesunder, juveniler Schweine ein Zellkultursystem primärer, kardialer Zellen etabliert, um die zellulären und molekularen Einflüsse von IL-1 β genauer zu untersuchen. Im Vordergrund der Untersuchungen standen einerseits die Zellproliferation und Apoptose, andererseits die Expression und Aktivität wichtiger, in

das kardiale Remodelling involvierter Gene, Proteine, Enzyme und deren Regulation durch unterschiedliche Konzentrationen von IL-1 β .

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse zu zellulären und molekularen Wirkungen von IL-1 β auf das kardiale Remodelling nach einem Myokardinfarkt zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Substanzen waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Roth, Sigma, Merck; Deutschland (D).

2.1.1 Zellkultur

Rekombinantes Schweine IL-1 β (#PSC0814, lot #N091301), Biosource, USA; Fötale Kälberserum Gold, Gentamycin 50 mg/ml, DMEM / Ham's F-12 mit L-Glutamine, Dulbecco's PBS 1x, Trypsin-EDTA 1x, HBSS mit Ca²⁺, PAA, Österreich; Penicillin/Streptomycin, Trypan Blau Lösung 0,4%, Sigma-Aldrich, USA; DMEM, Kollagenase II, Natriumpyruvat, Invitrogen, USA; Nunclon Surface 6 Well Platten und 96 Well Platten, Nunc, D; Cellstar Kulturflaschen, Greiner Bio-One, D; Neubauer Zählkammer improved, Neubauer, D; BD Falcon Zell-Schaber, BD Biosciences, USA; MTS-Assay: CellTiter 96® AQ One Solution Cell Proliferation, Promega, D; Microcon Zentrifugationssäulen, Centrifugal Filter Devices YM-10, Millipore, USA; Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific.

2.1.2 Molekularbiologie

RNAeasy Mini Kit (74106), RLT Puffer (RLT-Lysis Puffer, Mat. No. 1015750), Qiagen, D; Reverse Transkriptase MultiScribe (0812074), RNase Inhibitor, RT Puffer 10x, Random Primer 10xRT, Applied Biosystems, USA; Taq Polymerase (Hot Fire Pol DNA Polymerase 1, HF0573), dNTPs Mix 25x (100 mM) aus: dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM, 10x Reaktionspuffer B, dNTPs Mix 20 mM, MgCl₂ 25 mM, Solis BioDyne, Estland; BSA 5 mg/ml, New England BioLabs, USA; 100 bp Gen Ruler DNA-Ladder, 6x DNA Loading Dye, Ethidiumbromidlösung, Agarose GTQ, DEPC Wasser, Fermentas, D; Ethidiumbromid 10 mg/ml, Roth, D.

Caspase 3 (NM_214131) F: 5'-GCT GCA AAT CTC AGG GAG AC-3' R: 5'-GGC AGG CCT GAA TTA TGA AA-3' Annealing-Temperatur 58°C, 280 bp	TIMP-2 (AF156030) F: 5'-CAA AGC CGT CAG CGA GAA G-3' R: 5'-CCA GTC CAT CCA GAG ACA CT-3' Annealing-Temperatur 58°C, 391 bp
IL-1RI (BI182393) F: 5'-AAT GCA CTT CCT AGG CTT TCT G-3' R: 5'-GGA ACA GGA TGT GGT GAC AA-3' Annealing-Temperatur 58°C, 65 bp	Troponin-C (NM_001098599) F: 5'- AGA ACA TCA CGG AGA TCG CT -3' R: 5'- CCC TCA AAC TTT TTC TTG CG-3' Annealing-Temperatur 58°C, 271 bp
MMP-2 (AF295805) F: 5'-GAC AGT GAC ACC ACG TGA C-3' R: 5'-CAG GCG TCT GCA ATG AGC T-3' Annealing-Temperatur 58°C, 345 bp	MMP-9 (NM_001038004) R: 5'-GGA CGC CAA GTG TGG GTG-3' R: 5'-GTC CAC CTG ATT CAC CTC GT-3' Annealing-Temperatur 58°C, 326 bp
GAPDH (AF017079) F: 5'-ATT GCC CTC AAC GAC CAC T-3' R: 5'-GGC CTC TCT CCT CCT CGC-3' Annealing-Temperatur 58°C, 159 bp	

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Die für die molekularbiologischen Versuche verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion, D bezogen. Die Primer sind nach Sequenz F (forward) und R (reverse), Annealing-Temperatur und Größe des Produktes in Basenpaaren (bp) aufgelistet.

Pufferlösungen

M1: RLT-Puffer (Qiagen, s. 2.1.2)

M2: RT Puffer 10x (Applied Biosystems, s. 2.1.2)

M3: 10x Reaktionspuffer B (Solis BioDyne, s. 2.1.2)

M4: 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1000 ml Aqua dest., pH=8,0

M5: 6x DNA Loading Dye (Fermentas, s. 2.1.2)

2.1.3 Proteinbiochemie

Starting Block T20 (TBS), PVDF-Transfer-Membran (0,45 µm), Autoradiografie Film Amersham Hyperfilm MP High performance, GE Healthcare, D; Filterpapier Mini Trans-Blot, Bio Rad, D; Micro BCA Protein Assay Kit (#23235), Thermo Scientific, USA; ECL-Plus Western Blotting Detection System (W373638), Amersham Pharmacia Biotech, USA; Microcon, Centrifugal Filter Devices YM-10, Millipore, USA; Page Ruler Plus Ladder, Fermentas, D; Bromphenolblau Na-Salz, Coomassie Brilliant Blau R 250, Roth, D.

<u>Primärantikörper</u>				
Zielprotein	MW [kDa]	Spezies	Firma, Katalognummer	Verdünnung
Caspase-3	32	Kaninchen	Santa Cruz, sc-7148	1:200
IL-1RI	65	Maus	R&D Systems, MAB269	1:250
Aktin	42	Ziege	Santa Cruz, sc-1615	1:1000
<u>Sekundärantikörper</u>				
Schwein anti-Kaninchen IgG-HRP			Dako, PO217	1:10000
Kaninchen anti-Ziege IgG-HRP			Santa Cruz, sc-2922	1:10000

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Pufferlösungen

P1: 45,42 g Tris, 1 g SDS, ad 250 ml Aqua dest.

P2: 15,14 g Tris, 1 g SDS, ad 250 ml Aqua dest.

PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,78 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,24 g KH₂PO₄, ad 1000 ml Aqua dest., pH=7,4

P3: 4,38 g NaCl, 5 ml NP-40, 5 g SDC, 5 ml SDS (10%), 3,03 g Tris, ad 500 ml Aqua dest.

P4: 2,4 ml Tris (1 M), 0,8 g SDS, 4 ml Glycerol (100%), 0,01% BPB, ad 20 ml Aqua dest.

P5: 12,2 g Tris, 57,6 g Glycin, 4 g SDS/ Natriumlaurylsulfat, ad 4000 ml Aqua dest.

P6: 2,5 ml Triton X-100, ad 100 ml Aqua dest.

P7: 7,9 g Tris, 8,7 g NaCl, 0,55 g CaCl₂ x 2 H₂O, 10 µl ZnCl₂, ad 1000 ml Aqua dest.

P8: 0,5% Coomassie Brilliant Blau in 50 ml Methanol, 10 ml Essigsäure, ad 100 ml Aqua dest.

P9: 50 ml Methanol, 10 ml Essigsäure, ad 100 ml Aqua dest.

P10: 2,4 ml Tris (1 M), 0,8 g SDS, 4 ml Glycerol (100%), 0,01% BPB, 1 ml Mercaptoethanol, ad 13 ml Aqua dest.

P11: 28,8 g Glycin, 6,06 g Tris, 400 ml Methanol, ad 2000 ml Aqua dest.

P12: 6,06 g Tris, 20,25 g NaCl, 5 ml 0,5M EDTA, 2,5 ml Tween 20, ad 2500 ml Aqua dest., pH=7,5

Komponente	Trenngel (7%)	Trenngel (12,5%)	Sammelgel
P 1	2,5 ml	2,5 ml	-----
P 2	-----	-----	2,6 ml
Acrylamid	1,75 ml	3,12 ml	1,13 ml
Aqua dest.	4,66 ml	4,28 ml	6,19 ml
Gelatinelösung (10 mg/ml) (Nur für die Zymographie)	1 ml	-----	-----
APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Etablierung der primären Zellkultur

Hintergrund:

In einer vorherigen Studie an unserem Institut wurden am Großtiermodell des Schweins klinische Versuche und laborchemische Analysen nach induziertem Herzinfarkt und anschließender kardiopulmonaler Reanimation durchgeführt¹⁵. Das Schweinmodell ist in der Ischämie- und Reperfusionforschung führend, da viele Parallelen in der Anatomie und Physiologie der Koronararterien und im Metabolismus des Myokards zum Menschen bestehen¹⁴. Um die zellulären und molekularen Prozesse im kardialen Gewebe näher zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell primärer Schweineherzzellen etabliert.

Durchführung:

Die Schweine wurden gezüchtet und im Alter von drei Monaten geopfert um das Herz zu entnehmen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie durch Frau Dr. A. Wunsch (Ludwig Maximilians Universität, München) durchgeführt: Direkt nach dem Tod des Tieres wurde das Herz entnommen und in kaltem PBS, ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} , versetzt mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin aufbewahrt. Nach Entfernung des Endo- und Epikards wurde ein 8 cm² großes Stück Muskel isoliert und dreimal in PBS mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin gewaschen. Danach wurde das Präparat dissektiert, mit DMEM gewaschen, zentrifugiert (200 g, 5 min) und der klare Überstand wurde verworfen. Die Gewebestücke wurden unter Rühren oder Schütteln in HBSS mit Ca^{2+} und 0,1 bis 0,5% Kollagenase II bei 37°C enzymatisch aufgespaltet. Nicht aufgelöste Fragmente wurden zusätzlich für 10 min mit Trypsin-EDTA Lösung (0,25 Trypsin / 0,02% EDTA) behandelt.

Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm Sieb gefiltert, mit DMEM gewaschen und zentrifugiert (200 g, 5 min). Die Zellen wurden in DMEM mit 15% fötalem Kälberserum (FKS) resuspendiert, welches mit 293 mg/l L-Glutamin, 100

U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol, 1% (v/v) nichtessentieller Aminosäuren und 1% (v/v) Natriumpyruvat versetzt wurde. Zum Schluss wurden die Zellen in mit 0,1% Gelatine beschichtete Petrischalen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert. Nach dieser Periode wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin-EDTA Lösung (0,05% Trypsin / 0,004% EDTA) für 5 min bei 37°C von der Unterlage gelöst und in einem Medium bestehend aus 90% FKS und 10% DMSO eingefroren. Die kryokonservierten Zellen wurden auf Trockeneis nach Kiel transferiert, wo die anschließenden Versuche durchgeführt wurden.

Die tiefgefrorenen Zellen (Passage 1) wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in vorgewärmtem Medium gelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (200 g, 10 min), das Pellet anschließend in 20 ml DMEM mit 10% FKS aufgenommen, die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Morphologie durch ein mit einer Kamera kombiniertes Lichtmikroskop beobachtet (Leica DMIL mit einer LMscope Kamera, XnView v1.95.4 Software).

Für den Transfer wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch Trypsin-EDTA Lösung und leichtes Klopfen vom Untergrund gelöst und anschließend zentrifugiert (200 g, 5 min), um Reste des Trypsins mit dem Überstand entfernen zu können. Das Pellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zelllösung je nach Fragestellung in 6 oder 96 Well Zellkulturplatten ausgesät. In die Versuche wurden nur einfach passagierte Zellen der drei Versuchstiere eingeschlossen.

2.2.1.2 Stimulation der primären Zellkulturen mit IL-1β

Hintergrund:

Ein Herzinfarkt geht mit lokal erhöhten Spiegeln von Interleukinen im Myokard einher. Dabei wird insbesondere das proinflammatorische IL-1β, welches eine entscheidende Rolle beim Remodelling spielt, vermehrt exprimiert¹⁵. Um die Wirkungen von IL-1β im kardialen Gewebe auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene näher zu analysieren, wurden die primären kardialen Zellkulturen mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1β stimuliert.

Durchführung:

Für die molekularbiologischen Experimente wurden die Schweineherzzellen in 6 Well Platten ausgesät. Dazu wurde die konfluente Zellschicht durch Trypsin von dem Boden der Zellkulturflaschen gelöst, auf die 6 Well Platten verteilt und 3 bis 4 Tage bis zu ca. 30%iger Konfluenz kultiviert. In jedes Well wurden unterschiedliche Konzentrationen von IL-1 β pipettiert: 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml. Die RNA wurde nach 30 min, 1 h und 3 h isoliert: Nach dem Waschen mit PBS wurden 600 μ l Puffer **M1** in jedes Well gegeben. Mit Hilfe von Zellschabern wurden die Zellen von der Unterlage gelöst und in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Um Mediumproben für die Zymographie zu gewinnen, wurde eine 6 Well Platte, wie oben beschrieben, vorbereitet und bei etwa 30%iger Konfluenz mit 0, 1, 10 und 100 ng/ml IL-1 β stimuliert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden je 600 μ l Medium entnommen und bei -20°C eingefroren. Vor der Analyse wurden die Proben zweifach durch Millipore Zentrifugationssäulen konzentriert. Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurde die 1:1000 verdünnte Probe mit dem Micro BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben gefärbt und bei 560 nm photometrisch gemessen.

Für den Proteinnachweis durch den Western Blot wurden die Zellen wie oben beschrieben vorbereitet und 24 bzw. 96 Stunden nach Stimulation mit IL-1 β mit Trypsin gelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 μ l Puffer **P3** resuspendiert und die Proteinkonzentration mit Hilfe des Micro BCA Proteinassay Kits bestimmt (Abbildung 7A).

Die Stimulation der Zellen für den MTS-Assay (Promega, CellTiter 96® AQ One Solution Cell Proliferation Assay) erfolgte in drei 96 Well Platten: Die Zellen wurden durch Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und in 1 ml DMEM mit 10% FKS resuspendiert. 10 μ l Zellsuspension wurden mit 25 μ l 0,4% Trypan Blau gemischt und mit 65 μ l PBS verdünnt. 10 μ l der gefärbten Zellsuspension wurden in der Neubauer Zählkammer ausgezählt, um die Zellzahl zu ermitteln. In je 16 Wells der Platte wurden 5000 bzw. 2500 Zellen sowie in 4 Wells eine Leerprobe aus DMEM mit 10% FKS pipettiert, sodass jeweils eine 4-fach Bestimmung vorlag. Die Zellen wurden 3 bis 4 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen der Spalten 1 und 5 im Medium belassen, die Spalten 2 und 6 mit 1 ng/ml, die Spalten 3 und 7 mit 10 ng/ml und die Spalten 4 und 8 mit 100 ng/ml IL-1 β stimuliert. Die Spalte 12 diente als Leerprobe (Abbildung 7B).

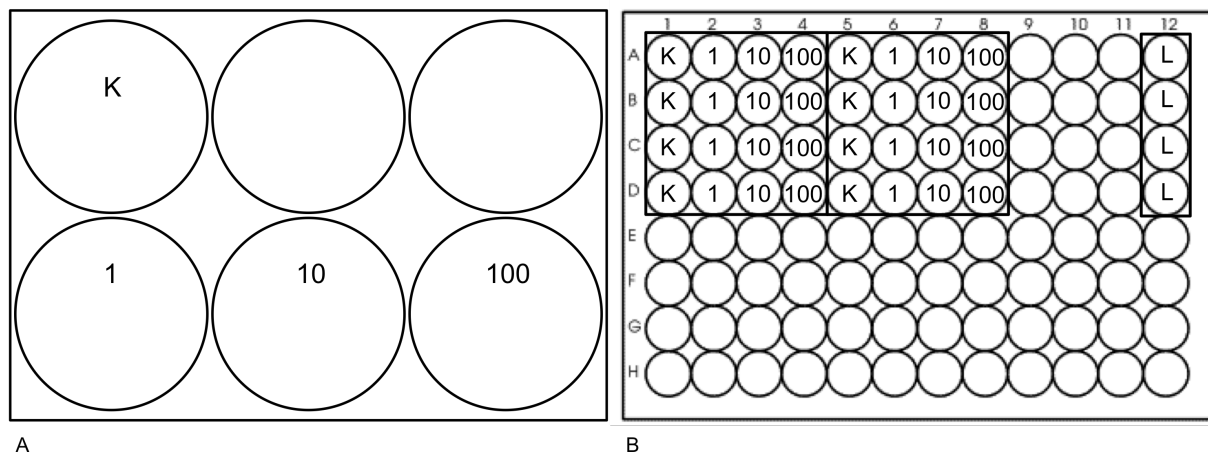


Abbildung 7: Stimulation der Schweineherzzellen mit IL-1 β

Die Zellen wurden für PCR, Zymographie und Western Blot auf 6 Well Platten verteilt und mit verschiedenen Konzentrationen IL-1 β stimuliert: 0, 1, 10 und 100 ng/ml (A). Für den MTS-Assay wurden in 96 Well Platten 5000 (A1-D4) bzw. 2500 (A5-D8) Zellen ausgesät und mit IL-1 β stimuliert: 0, 1, 10 und 100 ng/ml (B). K = Kontrolle = 0 ng/ml IL-1 β , 1 = 1 ng/ml IL-1 β , 10 = 10 ng/ml IL-1 β , 100 = 100 ng/ml IL-1 β , L = Mediumleerprobe.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Kombination zweier molekularbiologischer Methoden: In der reversen Transkription (RT) wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. In der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden spezifische cDNA-Fragmente amplifiziert und somit die Expression bestimmter Gene untersucht^{44, 45}.

Die Reverse Transkription

Hintergrund

Die reverse Transkription dient zum Umschreiben der RNA-Proben in cDNA. Die Reverse Transkriptase, auch als RNA-abhängige DNA-Polymerase bezeichnet, erstellt zu dem RNA-Einzelstrang zuerst einen RNA-DNA-Hybridstrang, welcher zu

doppelsträngiger DNA vervollständigt wird. Vor der Durchführung der RT-PCR muss die Reinheit der RNA-Probe durch eine Absorptionsmessung bei 260/280 nm geprüft werden. Nukleotide, RNA und DNA absorbieren das Licht bei 260 nm, Proteine und andere Stoffe wie Phenol bei 280 nm. Eine reine Probe ergibt einen 260/280 Quotienten größer als 1,8. Verunreinigungen durch Aminosäuren zeigen niedrigere Quotienten.

Durchführung

Aus den Schweineherzzellen wurde, wie in 2.2.1.2 beschrieben, RNA isoliert und bei - 80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Um die RNA-Konzentration in der Probe zu bestimmen, wurde die Absorption im Photometer (Photometer Genesys 10uv, Thermo Spectronic, USA) bei 260/280 nm gemessen. Die Reinheit der Probe wurde durch einen 260/280 Quotienten von 2 garantiert.

Für die Reverse Transkription wurde bei 4°C folgender Reaktionsansatz gemischt, der vier Temperaturschritte (Schritt 1 bis Schritt 4) im Thermozykler (Biometra, Thermocycler T Gradient) durchlief:

200 ng	RNA	Schritt 1:	25°C	10 min
2 µl	Puffer M2	Schritt 2:	37°C	120 min
0,8 µl	dNTPs Mix 25x (100 mM)	Schritt 3:	85°C	5 sec
2 µl	Randomprimer 10x	Schritt 4:	4°C	∞
1 µl	Reverse Transkriptase			
1 µl	RNase Inhibitor			
3,2 µl	DEPC Wasser			

ad 20 µl DEPC Wasser

Die Polymerasekettenreaktion

Hintergrund:

Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA. Durch Wahl der Primer können gewünschte Bereiche vervielfältigt werden. Das Schlüsselenzym dieser Methode ist die thermostabile Taq-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium


Thermus aquaticus isoliert wird⁴⁶. Die Polymerasekettenreaktion funktioniert nach einem zyklischen Prinzip aus drei Reaktionsstufen:

Der erste Schritt ist die Denaturierung der DNA-Probe. Durch Erhitzen brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen auf, wodurch die DNA-Doppelstränge und die Primer voneinander getrennt werden. Anschließend findet die Primerhybridisierung (primer annealing) statt, bei der sich komplementäre Oligonukleotide (Primer) an gewünschte DNA-Fragmente anlagern. Dieser Schritt ist die Voraussetzung für die Elongation, in der die DNA-Polymerase die Stränge durch Anheftung von freien Nukleotiden an das 3'-Ende des angelagerten Primers verlängert.

Durchführung

Bei 4°C wurde folgender Reaktionsansatz aus cDNA, Primern (s. Tabelle 1), Nukleotiden und der Polymerase erstellt:

2 µl	cDNA
1 µl	Primer F (forward)
1 µl	Primer R (reverse)
2 µl	Puffer M3
1 µl	dNTPs Mix 20 mM
3 µl	BSA 5 mg/ml
1,6 µl	MgCl ₂ 25 mM
0,5 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)
7,9 µl	DEPC Wasser

Schritt 1:	95°C	15 min	
Schritt 2:	95°C	30 sec (Denaturierung)	
Schritt 3:	58°C	30 sec (Primerhybridisierung)	
Schritt 4:	72°C	30 sec (Elongation)	
Schritt 5:	72°C	10 min	
Schritt 6:	4°C	∞	

Der Reaktionsansatz folgte im Thermocycler (Biometra, Thermocycler T Gradient) dem beschriebenen Programm, wobei sich Denaturierung, Hybridisierung und Elongation 35 bis 40 mal wiederholten. Anschließend wurden die Proben bis zur Auftrennung durch die Agarosegelelektrophorese bei 4°C gekühlt.

2.2.2.2 Die Agarosegelelektrophorese

Hintergrund:

Die Agarosegelelektrophorese beruht auf dem Prinzip der Bewegung von Molekülen durch ein Gel unter dem Einfluss von elektrischer Spannung und dient unter anderem zur Auftrennung von DNA-Proben nach der Länge.

Die DNA-Probe wird in die Taschen eines Agarosegels aufgetragen und läuft auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatreste durch die Maschen des Agarosegels zur Anode. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch die netzartige Matrix, als größere. Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Dieser rote Phenanthridin-Farbstoff interkaliert in die Doppelhelix zwischen die Basen und verstärkt durch diese Reaktion die Anregbarkeit durch ultraviolettes Licht. Durch diese Eigenschaft kann die DNA als leuchtende Bande unter einer UV-Lampe nachgewiesen werden.

Durchführung:

Um ein 2,5%iges Agarosegel herzustellen, wurden 3,75 g Agarose mit 150 ml **M4** gemischt, aufgekocht und in eine Elektrophoreseapparatur (PeqLab Biotechnologie, D) gegossen. 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl **M5** versetzt und in die Taschen pipettiert.

In eine weitere Tasche wurden 10 µl 100 bp Gen Ruler DNA-Ladder aufgetragen, um die Größe der Fragmente zu bestimmen. Die Elektrophorese erfolgte unter einer Spannung von 90 V für 60 Minuten. Das Gel wurde entnommen, für 30 Minuten in einer Lösung aus 750 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in 500 ml Aqua dest. gefärbt und anschließend unter einer UV-Licht Kamera (Raytest) fotografiert. Die Signale wurden mit Hilfe der Software ImageJ (v.1.41) ausgewertet. Um semiquantitative Aussagen zur Expression der untersuchten Gene treffen zu können, wurde die Bandenintensität des amplifizierten Produktes zu der Bandenintensität des Housekeeping-Gen

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ins Verhältnis gesetzt. Die Expression der GAPDH als Enzym der Glykolyse ist nahezu konstant⁴⁷.

2.2.2.3 MTS-Zellproliferationsassay

Hintergrund:

Der MTS-Proliferationsassay (CellTiter 96® AQ One Solution Cell Proliferation) ist ein kolorimetrischer Test um die Anzahl vitaler Zellen zu bestimmen. Die Reaktionslösung enthält MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium] sowie eine Elektronen bindende Komponente (Phenazin-Ethosulfat). Die Tetrazoliumkomponente wird von Zellen zu einem farbigen Formazanprodukt reduziert, welches in dem Zellmedium löslich ist (Abbildung 8). Für diese Reaktion ist durch Dehydrogenase hergestelltes NADPH oder NADH notwendig, welches nur von den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen bereitgestellt wird.

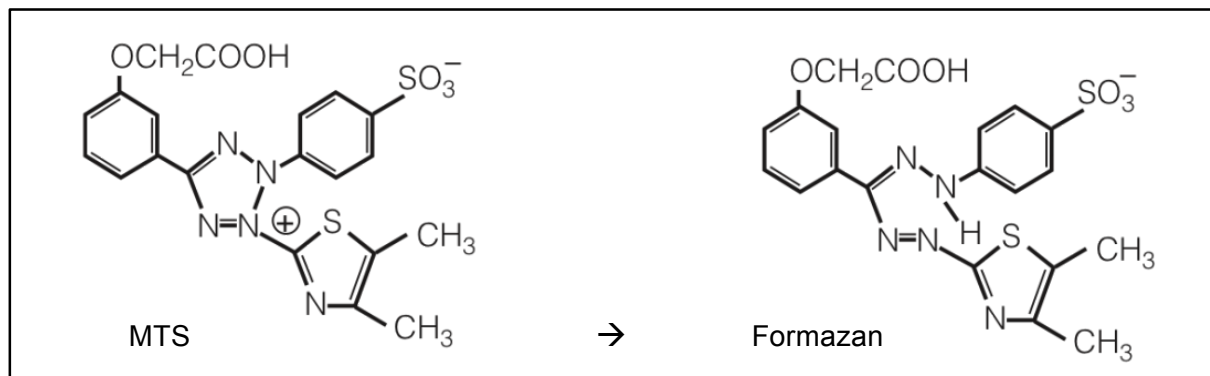


Abbildung 8: Strukturformeln von MTS und Formazan

Durch die Dehydrogenase vitaler Zellen wird die zugegebene Tetrazoliumkomponente zu einem farbigen Formazanprodukt reduziert.

Modifiziert nach CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Protocol, 6/09

Durchführung:

Die Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden mit Konzentrationen von 0 ng/ml bis 100 ng/ml IL-1 β inkubiert und anschließend mit dem MTS-Assay analysiert: In jede Zellkulturplatte wurde zu dem Medium der kultivierten und mit IL-1 β stimulierten Zellen pro Well 20 μ l MTS-Reaktionsgemisch gegeben. Nach vierstündiger Inkubation mit dem Reagenz bei 37°C im Brutschrank wurde in einem ELISA-Reader

(Sunrise, Tecan, Schweiz) die Absorption bei 490 nm gemessen, welche direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Zymographie

Hintergrund:

Die Zymographie dient dem Nachweis von MMPs⁴⁸. MMPs sind sezernierte oder transmembranäre Enzyme, die in verschiedensten Prozessen, wie Umbau der Extrazellulärmatrix, Inflammation und Remodelling (s. 1.4.2), eine essentielle Rolle spielen. Darüber hinaus weisen neue Studien auf eine Regulation verschiedener Signaltransduktionswege durch die MMPs hin⁴⁹. Für den Nachweis mittels Zymographie wird das Gesamtproteingemisch durch ein gelatinehaltiges Acrylamidgel, wie oben beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Durch vorherige Zugabe von SDS werden Ladungsunterschiede der Proteine abgeschwächt und die Raumstrukturen aufgehoben. Nach dem Lauf wird das Gel in tritonhaltigen Renaturierungspuffer gelegt, um das SDS zu entfernen und den Proteinen ihre ursprüngliche, für die enzymatische Aktivität essentielle Struktur wieder zu geben. Nach einigen Stunden Inkubation haben die MMPs die Gelatine in dem Acrylamidgel gespalten. Die Proteine im Gel inklusive der Gelatine werden mit Coomassie-Blau gefärbt und anschließend für kurze Zeit entfärbt. Weiße Bereiche im Gel entsprechen der abgebauten Gelatine und beweisen die Anwesenheit und enzymatische Aktivität der entsprechenden MMPs.

Durchführung:

Es wurde nach dem Standardprotokoll⁵⁰ ein 7%iges Polyacrylamidgel (s. Tabelle 3) mit 1 mg/ml Gelatine hergestellt, in dessen Taschen das Gemisch aus 50-100 µg Protein, 1:1 verdünnt mit **(P4)** und 2 µl Bromphenol Blau (0,5%) pipettiert wurde. Bei einer Spannung von 120 V lief das Gel in **(P5)** 80 Minuten in der Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad, D). Anschließend erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur eine Inkubation mit **(P6)**. Über Nacht wurde das Gel bei 37°C in

Entwicklungspuffer (**P7**) inkubiert, um es anschließend für 3 Stunden in (**P8**) zu färben. Nach einer halben Stunde Entfärbung durch (**P9**) konnten die Banden mit Proteaseaktivität als helle Streifen auf einem dunkelblauen Hintergrund sichtbar gemacht, die Gele fotografiert und analysiert werden. Mit Hilfe der Software ImageJ (v.1.41) wurde die Intensität der MMP-Banden analysiert. Die spezifische Bande wurde zu der Bande der entsprechenden Mediumkontrolle ins Verhältnis gesetzt und anschließend mit den Banden der unstimulierten Zellen verglichen, um Aussagen zur enzymatischen Aktivität der MMPs treffen zu können.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Hintergrund:

Der Western Blot dient als Proteinnachweisverfahren, in dem Zielproteine in einem Proteingemisch durch Antikörper spezifisch nachgewiesen werden können^{45, 51}.

Die denaturierten Proteine werden durch eine SDS-PAGE im elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Zugabe von SDS werden Ladungsunterschiede der Proteine abgeschwächt und die Raumstruktur aufgehoben. Anschließend werden die Proteine auf eine Trägermatrix mit hoher Proteinaffinität übertragen. Durch Verwendung einer Blocking-Lösung werden überschüssige Bindungsstellen gesättigt und somit unspezifische Bindungen des nachfolgend aufgetragenen, primären Antikörpers an die Matrix abgeschwächt. An den Fc-Teil des primären Antikörpers lagert sich ein sekundärer, an eine Peroxidase gekoppelter Antikörper. Die Peroxidase führt nach Zugabe eines spezifischen Detektionsreagenzes durch photochemische Reaktionen zur Freisetzung von Photonen, welche den Film auf Höhe der Proteinbanden schwärzen.

Durchführung:

Für den Western Blot wurden 30 µg des Gesamtproteins 1:1 mit **P10** gemischt, drei Minuten in einem Heizblock auf 95°C erhitzt, in die Taschen eines 12,5%igen Polyacrylamidgels (s. Tabelle 3) pipettiert und für 80 Minuten bei 100 V in **P5** elektrophoretisch aufgetrennt.

Zum Blotten wurde das Gel im Western Transblot System (Mini Protean 3, Bio-Rad, D) auf die für einige Sekunden durch 100% Methanol aktivierte PVDF-Membran

(Polyvinylidendifluoridmembran) gelegt und durch Filterpapier zusammengehalten. Bei einer angelegten Spannung von 100 V wurden die Proteine bei 4°C in **P11** anodenwärts auf die Matrix transferiert. Nachfolgend wurde die Membran zum Blocken eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit Starting Block T 20 inkubiert und der mit Starting Block T 20 verdünnte primäre Antikörper (s. Tabelle 2) aufgetragen. Die Inkubation fand unter Schütteln bei 4°C über Nacht statt.

Am nächsten Tag diente dreimaliges Waschen der Membran in **P12** zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers. Danach wurde der passende, mit Starting Block T 20 verdünnte Sekundärantikörper (s. Tabelle 2) hinzugefügt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf der Membran belassen. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer wurde 1 ml des Detektionsreagenzes ECL-Plus (Enhanced chemilumineszenz) auf die Membran getropft. Die Entwicklung des Filmes benötigte abhängig von der Signalstärke 5, 10 oder 35 Minuten Belichtungszeit.

Um die Signale verschiedener Proteinmengen zu relativieren und sie vergleichen zu können, wurde mit derselben Membran ein Aktinnachweis durchgeführt. Die Expression von Aktin als Protein des Zytoskeletts ist nahezu konstant. Die Inkubation der Membran mit dem Aktin-Antikörper (s. Tabelle 2) fand für 45 Minuten bei Raumtemperatur statt. Nach dem Waschen in TBST-Puffer wurde der sekundäre Antikörper (s. Tabelle 2) für 45 Minuten auf der Membran belassen, die Membran gewaschen und die ECL-Lösung zugegeben. Die Filme wurden 1 und 5 Minuten lang belichtet und entwickelt.

Am Computer wurden die Intensitäten der entsprechenden Protein- und Aktinbanden mit Hilfe der Software ImageJ (v.1.41) evaluiert und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.2.3.3 Statistische Methoden

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander 2 oder 3 mal durchgeführt und in zweifacher bis fünffacher Wiederholung gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm GraphPad Prism Version 6.0 für Windows. In diesem Programm wurden die Daten durch column statistics, one-sample-t-Test und ANOVA (analysis of variances) analysiert. Bei statistisch signifikanten Unterschieden fand eine Bereinigung durch die Bonferroni-Methode für multiple Paarvergleiche statt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der primären Schweineherzzellen

Die Zellen wurden, wie in 2.2.1 beschrieben, in Zusammenarbeit mit Dr. A. Wünsch am Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Ludwig Maximilians Universität, München) durch mechanische und enzymatische Verfahren aus dem Myokard drei Monate alter Schweine isoliert und kryokonserviert.

Die nach Kiel transferierten Zellen wurden in 6 oder 96 Well Zellkulturplatten kultiviert. Sie hafteten innerhalb weniger Stunden fest an dem Boden und wuchsen innerhalb einer Woche bis zur Konfluenz (Abbildung 9A,B). Die Zellen ließen sich ohne Änderung der Morphologie über mehrere Passagen kultivieren und in flüssigem Stickstoff kryokonservieren.

Morphologische Beobachtungen deuteten darauf hin, dass es sich bei der Kultur kardialer Zellen vorwiegend um polygonale, flache Zellen handelte. Sie bildeten viele intrazelluläre Vesikel und Fibrillen (Abbildung 9A-C). Einige Zellen waren durch einen nahezu spindelförmigen Zellkörper mit wenigen Aufzweigungen charakterisiert, wohingegen sich andere dreiecks- oder sternförmig verzweigten. Diese Beobachtung ließ auf eine Mischpopulation von Zellen schließen. In den Zellkulturen der drei verwendeten Versuchstiere konnte mittels RT-PCR Troponin-C nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen von Myozyten in der Zellkultur hindeutet (Abbildung 9D).

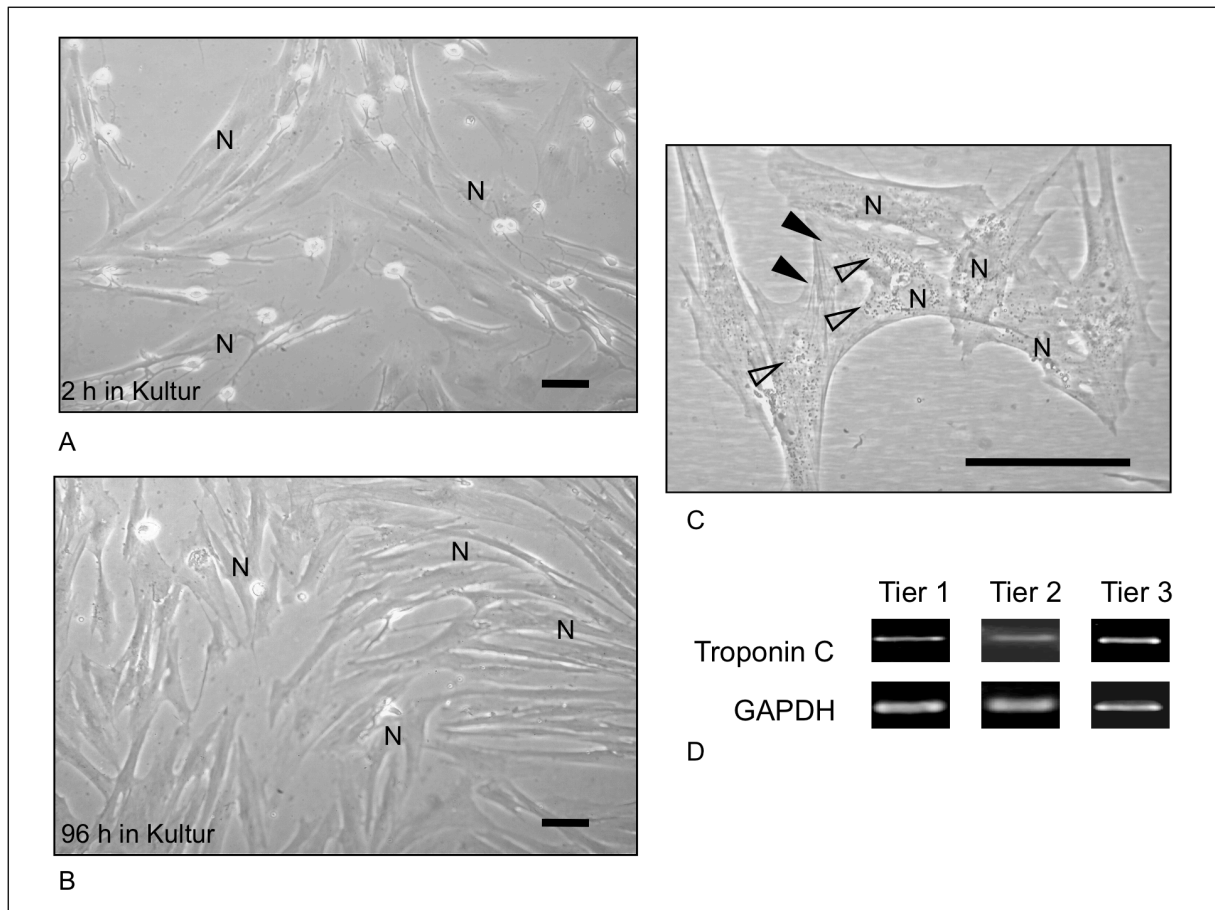


Abbildung 9: Morphologie der Schweineherzzellen und Expression von Troponin C

Die Kulturen bestehen vor allem aus polygonalen, flachen und spindelförmigen Zellen, die nach zweistündiger Kultivierung an der Unterlage haften (A). Nach 96 Stunden liegt eine höhere Zelldichte vor (B). Unter stärkerer Vergrößerung lassen sich viele intrazelluläre Vesikel (offene Pfeilköpfe) und Fibrillen (schwarze Pfeilköpfe) erkennen (C). Balken = 60 μm ; N = Zellkerne; RT-PCR Experimente weisen die Genexpression für Troponin C in den Zellen aller drei Versuchstiere nach. Das Housekeeping-Gen GAPDH dient zur Relativierung der Bandenintensitäten. Abgebildet ist ein repräsentatives PCR-Gel pro Versuchstier (D).

3.2 Expression des IL-1RI

Als Voraussetzung für die Stimulation mit IL-1 β sollte in einem ersten Schritt bewiesen werden, dass die kardialen Zellen den Signal vermittelnden IL-1RI exprimierten. Als Methoden hierzu dienten die RT-PCR und der Western Blot.

Die RNA wurde wie in 2.2.1 beschrieben isoliert, mittels Reverser Transkription in cDNA umgewandelt und anschließend durch PCR Experimente analysiert. Die PCR zeigte eine konstitutive Expression des IL-1RI nach einstündiger Stimulation (**IL-1RI**; 1 h; Kontrolle: $0,70 \pm 0,20$; **1 ng/ml IL-1 β** : $0,66 \pm 0,17$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle; **10 ng/ml IL-1 β** : $0,75 \pm 0,18$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle; **100 ng/ml IL-1 β** : $0,67 \pm 0,20$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle; Abbildung 10A). 30-minütige und dreistündige Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β bewirkten ebenfalls eine konstitutive Genexpression des IL-1RI (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe des Western Blots wurde nachgewiesen, dass die mRNA des IL-1RI zu einem Protein translatiert wurde. Die Proteine wurden aus für 24 Stunden mit 1, 10 und 100 ng/ml IL-1 β stimulierten Zellen gewonnen, durch SDS-Page aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper gegen den IL-1RI im Western Blot analysiert. Die Ergebnisse des Western Blots belegten die Expression von IL-1RI unabhängig von der Stimulation mit rekombinantem IL-1 β in den Kulturen (Abbildung 10B).

Die molekularbiologischen und biochemischen Versuche bestätigten somit die konstitutive Expression des IL-1RI in den kardialen Zellen.

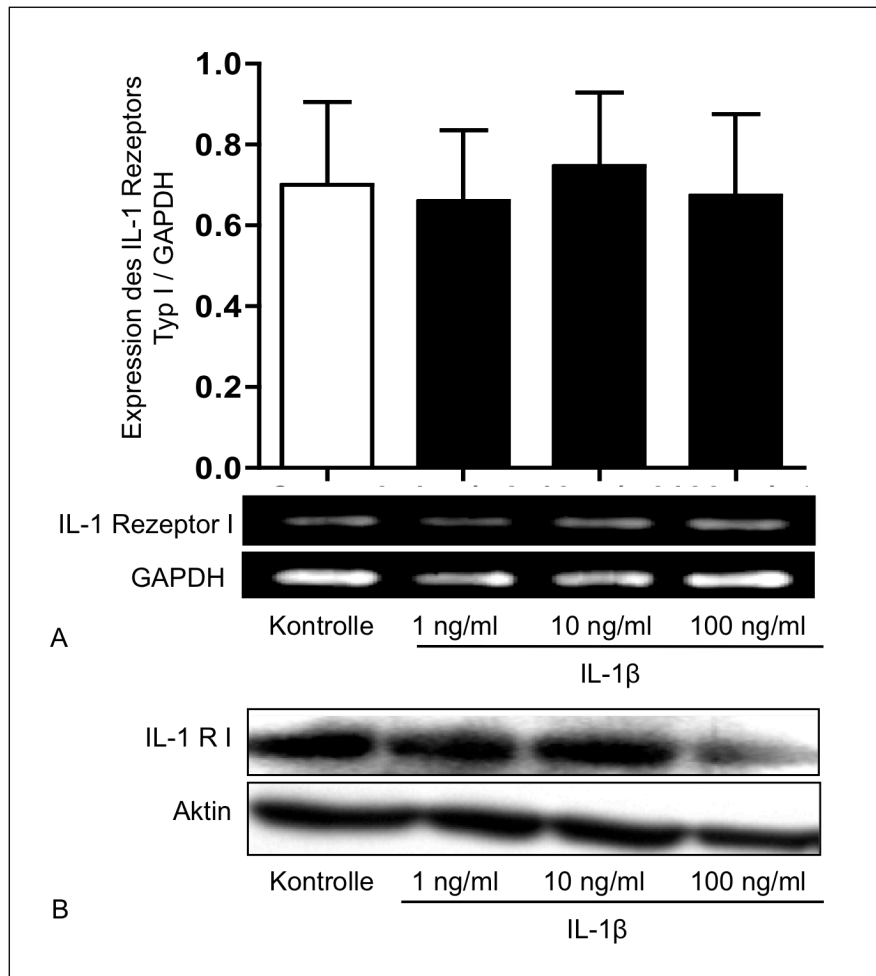


Abbildung 10: Expression des IL-1RI

RT-PCR Experimente demonstrieren eine konstitutive Genexpression des IL-1RI. Die Expression wird durch die Stimulation mit 1, 10 und 100 ng/ml IL-1 β für 1 Stunde nicht signifikant verändert. Das Housekeeping-Gen GAPDH belegt den Einsatz vergleichbarer Mengen an cDNA. Abgebildet ist ein repräsentatives PCR-Gel. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM (A). Der Western Blot deutet darauf hin, dass das Protein des IL-1RI unabhängig von der IL-1 β Stimulation konstitutiv exprimiert wird. Der Aktinnachweis wurde durchgeführt um die Signalaktivitäten zu relativieren. Ein repräsentativer Blot ist abgebildet (B). Aus: Zitta, Brandt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010.

3.3 Regulation der Proliferation durch IL-1 β

In den kardialen Zellkulturen wurde die Proliferation der stimulierten Zellen durch einen kolorimetrischen MTS-Assay quantifiziert. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich in den mit IL-1 β stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Absorption, der proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist (Abbildung 11A). Der Unterschied zur Kontrollkultur erreichte für die 24-stündige Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β statistische Signifikanz (24 h; **1 ng/ml IL-1 β** : $1,09 \pm 0,08$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $1,18 \pm 0,09$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,36 \pm 0,09$; $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1). Nach 48 und 72 Stunden Stimulation wurde das Signifikanzniveau nicht mehr erreicht (Daten nicht gezeigt). Morphologisch überwiegen auch nach 96 Stunden polygonale, flache Zellen mit vielen intrazellulären Vesikeln und Fibrillen (Abbildung 11B).

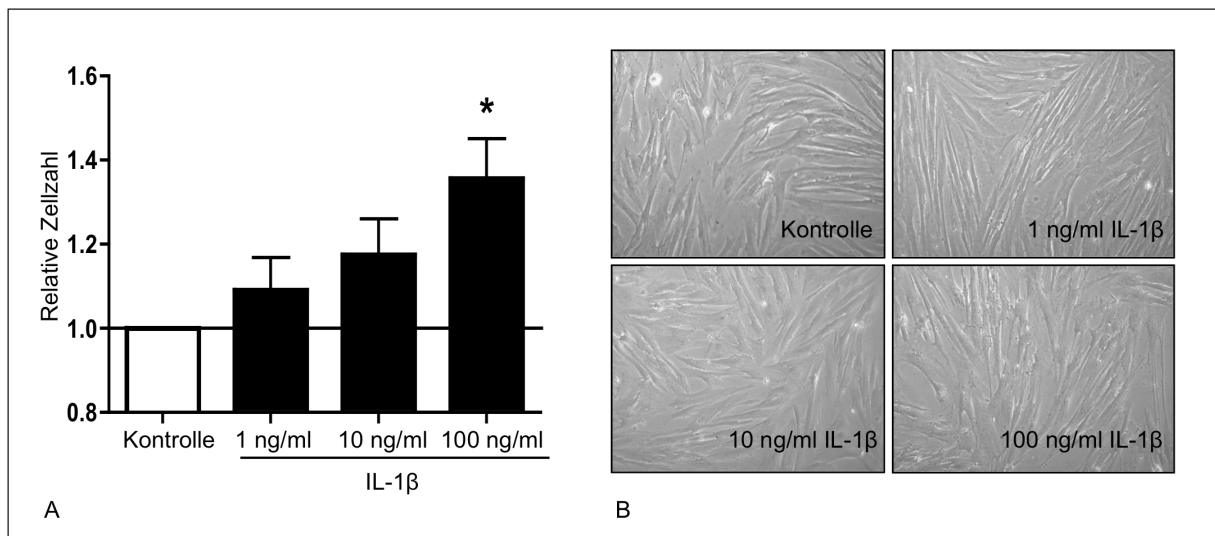


Abbildung 11: Effekte von IL-1 β auf die Zellproliferation

Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β führt zu einer vermehrten Zahl vitaler Zellen in den Kulturen. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1 (A). Nach 96-stündiger Stimulation mit 1, 10 und 100 ng/ml IL-1 β enthält die Zellkultur vor allem polygonale, flache Zellen mit vielen intrazellulären Vesikeln und Fibrillen (B).

3.4 Regulation der Expression und Aktivität der Pro-Caspase-3 durch IL-1 β

Um die Wirkung von IL-1 β auf apoptotische Prozesse zu evaluieren, wurde die Gen- und Proteinexpression der Caspase-3 als Effektorenzym der Apoptose untersucht. RT-PCR Studien dienten zum Nachweis von Pro-Caspase-3 auf mRNA-Ebene. Darüber hinaus sollte ein Western Blot die Menge des Proteins der Pro-Caspase-3 und der aktiven Caspase-3 quantifizieren.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten nach dreistündiger Stimulation einen dosisabhängigen Anstieg der Genexpression von Pro-Caspase-3 in den kardialen Zellen. Statistisch signifikante Resultate ergaben sich nach der Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β (**Pro-Caspase-3**; 3 h; **1 ng/ml IL-1 β** : $0,97 \pm 0,06$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $1,26 \pm 0,03$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,45 \pm 0,23$; $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1; Abbildung 12A). Nach einstündiger Stimulation waren diese Ergebnisse noch nicht statistisch signifikant (Daten nicht gezeigt).

Die Western Blot Experimente wurden mit einem Antikörper, der sowohl inaktive Pro-Caspase-3 (32 kDa) als auch aktive Caspase-3 (20 kDa) detektiert, durchgeführt. Der Western Blot zeigte nach Stimulation der Zellen mit 1, 10 und 100 ng/ml IL-1 β für 24 Stunden, dass trotz der Bildung inaktiver Pro-Caspase-3 keine enzymatische Aktivierung der Caspase-3 in den kardialen Zellen stattfand. Als Positivkontrolle dienten IMR-32 Zellen, die für 2 Stunden einer Hypoxie ausgesetzt waren (Abbildung 12B).

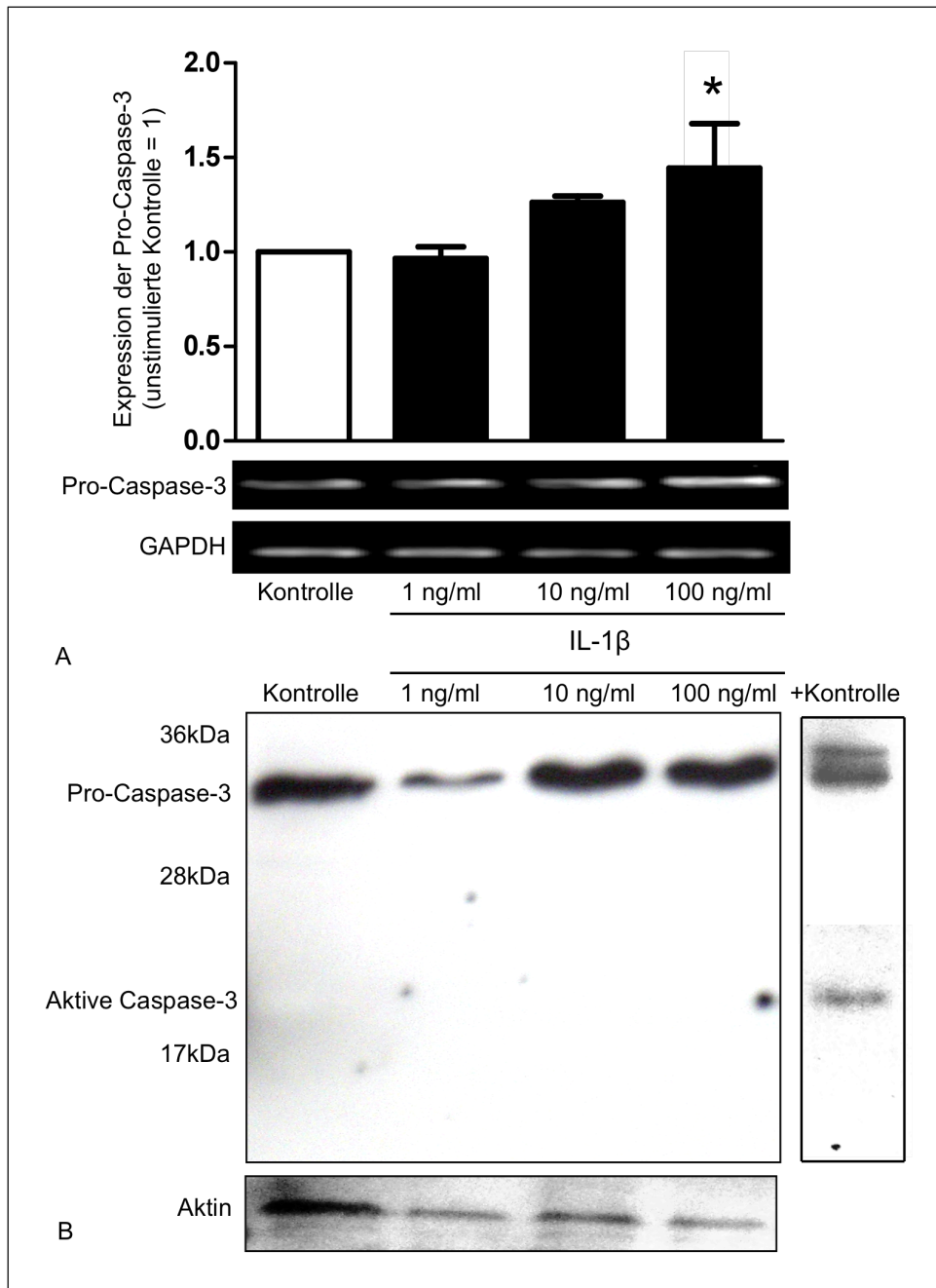


Abbildung 12: Effekte von IL-1 β auf die Expression und Aktivierung der Pro-Caspase-3

Die RT-PCR zeigt eine konzentrationsabhängige Genexpression der Pro-Caspase-3 in den primären Schweineherzzellen. Nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β für 3 Stunden ist die Genexpression signifikant erhöht. Die Amplifikation des Housekeeping-Gens GAPDH belegt den Einsatz vergleichbarer Mengen an cDNA. Ein repräsentatives Gel ist abgebildet. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM der relativen Genexpression; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1 (A). Der Western Blot zeigt die Proteinexpression der Pro-Caspase-3 in der kardialen Mischkultur. Es sind keine Signale der aktiven Caspase-3 sichtbar. Als Positivkontrollen (+Kontrolle) dienen IMR-32 Zellen, die für 2 Stunden einer Hypoxie ausgesetzt waren. Der Western Blot für Aktin diente der Relativierung der Signalintensität. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt (B). Aus: Zitta, Brandt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010.

3.5 Regulation der Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 durch IL-1 β

Die lokal ins Gewebe sezernierten Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 übernehmen Schlüsselfunktionen im Matrixumbau, insbesondere im Rahmen von Remodellingprozessen nach Gewebeverletzungen und Myokardinfarkt¹¹. Um zu klären, ob IL-1 β ursächlich an der Regulation der Genexpression und der enzymatischen Aktivität von MMPs und somit am Matrixremodelling beteiligt ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt.

Die RT-PCR belegte die Genexpression beider MMPs in den Schweineherzzellen (Abbildung 13). Nach dreistündiger Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von IL-1 β stieg die Genexpression für beide MMPs an, erreichte jedoch nur für MMP-2 nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β statistisch signifikante Werte (**MMP-2**; 3 h; **1 ng/ml IL-1 β** : $1,15 \pm 0,11$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $1,32 \pm 0,21$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,89 \pm 0,49$; $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **MMP-9**; 3 h; **1 ng/ml IL-1 β** : $0,99 \pm 0,41$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $1,06 \pm 0,27$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,29 \pm 0,38$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1). Nach einstündiger Stimulation ließ sich ein Anstieg der Genexpression beider MMPs detektieren, der aber nicht signifikant war (Daten nicht gezeigt).

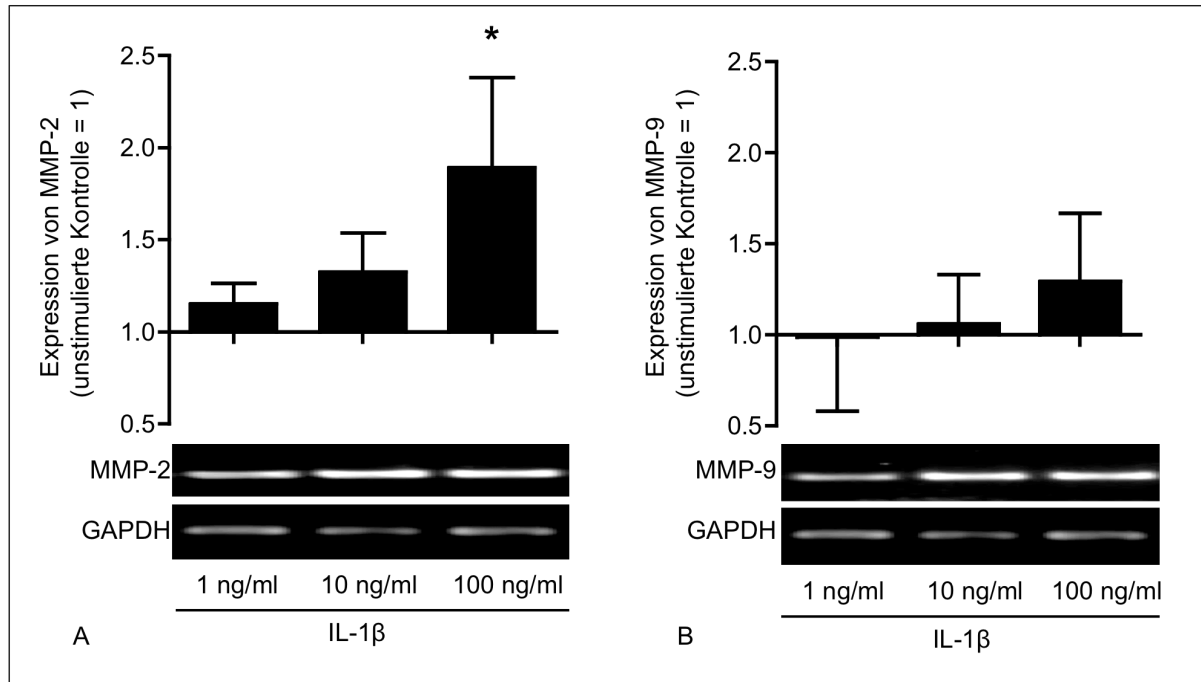


Abbildung 13: Effekte von IL-1 β auf die Genexpression von MMP-2 und MMP-9

RT-PCR Studien zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der MMP-2 (A) und MMP-9 (B) Genexpression drei Stunden nach Applikation von IL-1 β . Statistisch signifikante Unterschiede finden sich für MMP-2 nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β . Das Housekeeping-Gen GAPDH zeigt den Einsatz vergleichbarer Mengen an cDNA in den Versuchsansätzen. Ein repräsentatives Gel ist abgebildet. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM der relativen Genexpression; * P < 0,05 vs. Kontrolle = 1. Aus: Zitta, Brandt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010.

Die Aktivität beider MMPs wurde mittels Zymographie quantifiziert. Hierbei führte die Applikation von IL-1 β zu einem dosisabhängigen Anstieg der enzymatischen Aktivität beider MMPs. Statistisch signifikante Werte wurden durch die Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β für MMP-2 nach 48 Stunden und für MMP-9 nach 72 Stunden erreicht (**MMP-2**; 100 ng/ml IL-1 β ; 24 h: $1,29 \pm 0,22$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1; 48 h: $1,2 \pm 0,03$; P < 0,05 vs. Kontrolle = 1; 72 h: $1,26 \pm 1,22$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1; 96 h: $1,05 \pm 0,09$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1; **MMP-9**; 100 ng/ml IL-1 β ; 24 h: $1,09 \pm 0,12$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1; 48 h: $1,38 \pm 0,20$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1; 72 h: $1,58 \pm 0,21$; P < 0,05 vs. Kontrolle = 1; 96 h: $1,40 \pm 0,17$; P > 0,05 vs. Kontrolle = 1). Nach 96-stündiger Stimulation ließ sich ein Abfall der enzymatischen Aktivität beider Enzyme beobachten (Abbildung 14).

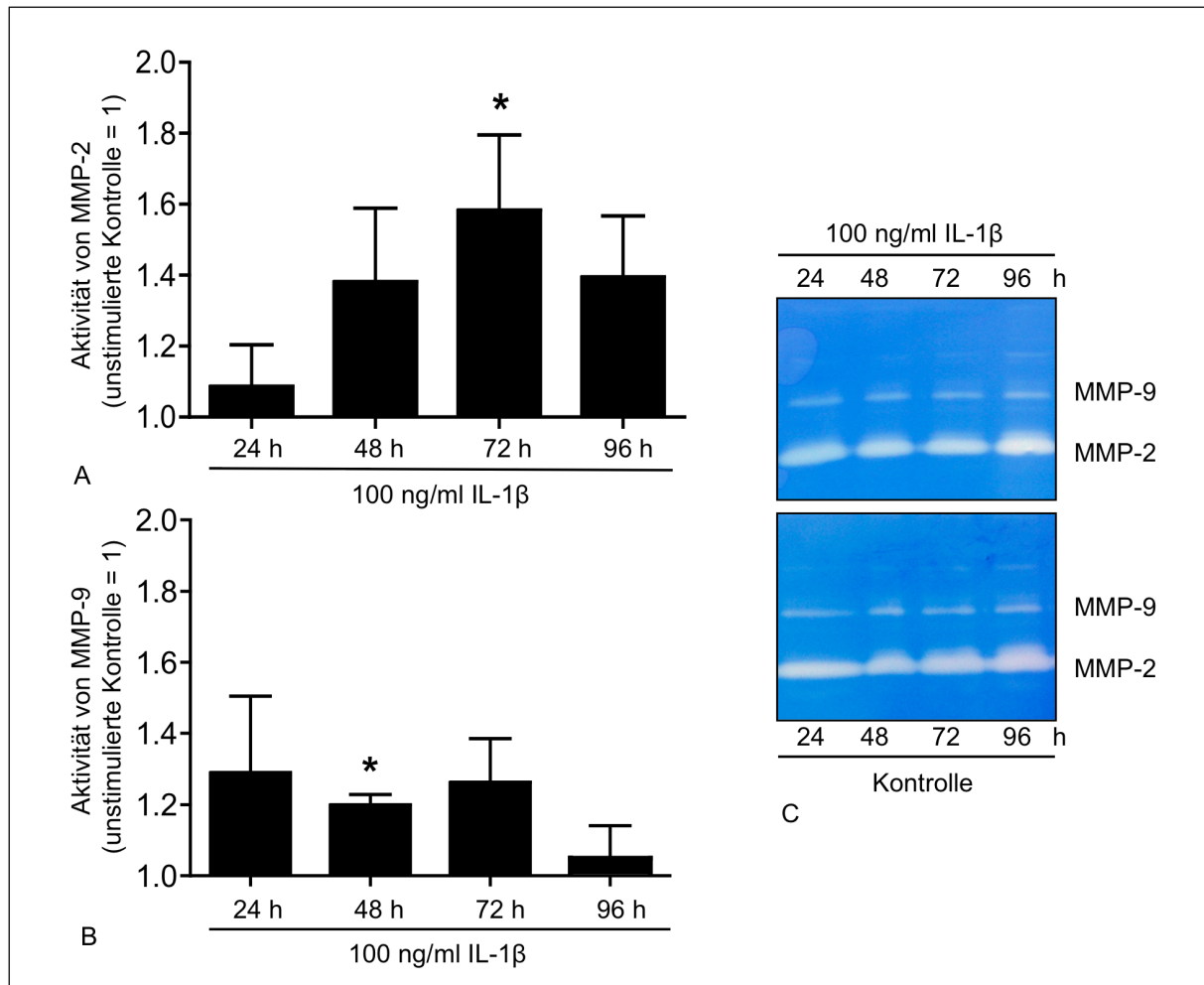


Abbildung 14: Effekte von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität von MMP-2 und MMP-9

Die Zymographie zeigt eine erhöhte enzymatische Aktivität der MMP-2 (A) und MMP-9 (B) nach 48 h bzw. 72 h Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Ein repräsentatives Zymographiegel ist in (C) abgebildet. Die Aktivitäten der MMPs nach IL-1 β Stimulation sind als relative Werte bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrolle dargestellt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM der relativen Aktivität; * P < 0,05 vs. Kontrolle.

3.6 Regulation der Genexpression von TIMP-2 durch IL-1 β

Die enzymatische Aktivität der MMPs kann über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden, eine zentrale Rolle bei diesen Vorgängen spielen die Inhibitoren der Gruppe der TIMPs³⁵. Um den Einfluss von IL-1 β auf die Inhibition der MMPs zu ermitteln, wurde die Genexpression des Inhibitors der MMP-2 und -9, TIMP-2, durch RT-PCR evaluiert.

Die Genexpression für TIMP-2 stieg durch die Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β für drei Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle an. Kurze Stimulationszeiträume von 30 Minuten bewirkten keine Regulation der Genexpression (**TIMP-2**; 30 min;

Kontrolle: $0,95 \pm 0,31$; **1 ng/ml IL-1 β** : $1,01 \pm 0,35$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $0,97 \pm 0,33$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,06 \pm 0,35$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1). Nach dreistündiger Stimulation zeigten sich statistisch signifikante Werte (**TIMP-2**; 3 h; Kontrolle: $1,26 \pm 0,16$; **1 ng/ml IL-1 β** : $1,50 \pm 0,40$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **10 ng/ml IL-1 β** : $1,74 \pm 0,49$; $P > 0,05$ vs. Kontrolle = 1; **100 ng/ml IL-1 β** : $1,88 \pm 0,53$; $P < 0,05$ vs. Kontrolle = 1; Abbildung 15).

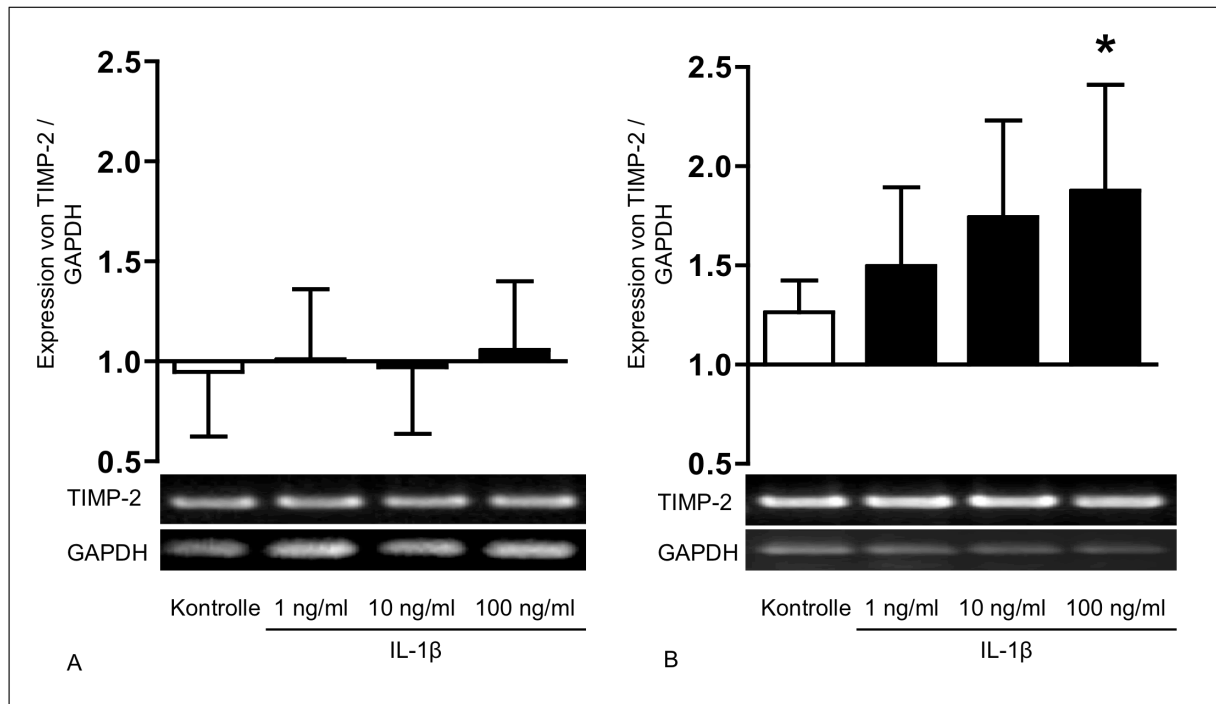


Abbildung 15: Effekte von IL-1 β auf die Genexpression von TIMP-2

Die RT-PCR zeigt 30 Minuten nach Stimulation mit IL-1 β keine geänderte Genexpression für TIMP-2 (A). Die Stimulation mit IL-1 β für 3 Stunden resultiert in einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Genexpression (B). Das Housekeeping-Gen GAPDH zeigt den Einsatz vergleichbarer Mengen an cDNA in den Versuchsansätzen. Ein repräsentatives PCR-Gel ist abgebildet. Die Balken entsprechen dem Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Kultivierung primärer Schweineherzzellen und Nachweis des IL-1RI

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein primäres Zellkulturmodell etabliert, welches die Zusammensetzung des myokardialen Gewebes in vivo bestmöglich repräsentieren und somit die Gesamtheit der kardialen Zellen und ihrer Zellinteraktionen widerspiegeln sollte⁵². Nicht nur kardiale Myozyten bilden untereinander Adhärens-Kontakte (Haftkontakte), Desmosomen und zur elektrophysiologischen Vereinigung Gap junctions aus¹, auch kardiale Fibroblasten und Myozyten sind über Gap junctions verbunden². Neben den direkten Zellinteraktionen spielen parakrin ausgeschüttete Mediatoren eine große Rolle in der Kommunikation zwischen den Zellen, Fibroblasten beispielsweise sind in der Lage IL-1, IL-6 und TNF α zu synthetisieren². Kardiale Fibroblasten besitzen auch die Fähigkeit das Myozytenwachstum und die Myozytendifferenzierung direkt durch Zellkontakte oder indirekt durch die Produktion von parakrinen Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren und Interleukinen, zu regulieren³. Diese Interaktionen gewinnen im Myokard nach einem Infarkt an zusätzlicher Bedeutung, da Fibroblasten Myozyten zur Apoptose oder Hypertrophie stimulieren und den Umbau der Extrazellulärmatrix koordinieren können².

Aus diesen Gründen haben wir uns abweichend von anderen Arbeiten, die Monokulturen von Herzmuskelzellen untersuchten^{53,54}, entschieden eine Mischkultur kardialer Zellen zu etablieren. Es wurde bewusst darauf verzichtet den Einfluss von IL-1 β auf einzelne Zelltypen des Myokards zu beurteilen, um Einblicke in die Wirkung von IL-1 β auf das Myokard als Einheit zu gewinnen.

Die kardialen Schweinezellen wurden durch eine Kombination aus mechanischen und enzymatischen Methoden isoliert und kultiviert. Die Zellen hafteten wenige Stunden nach der Aussaat fest am Boden der Kulturflasche und wuchsen in wenigen Tagen zu einem konfluenten Monolayer. Nach aktuellem Wissensstand gehen wir davon aus, dass die primäre Zellkultur die verschiedenen Zelltypen der ursprünglichen myokardialen Gewebeprobe repräsentiert, da keine spezifische Zellart durch weitere Methoden^{3, 54-56} isoliert bzw. selektioniert worden war. Die durch

RT-PCR ermittelte Genexpression des typischen kardialen Markers Troponin-C belegte die Anwesenheit von Kardiomyozyten in der Kultur (s. 3.2)⁵⁷. Die Ergebnisse zeigten auch, dass in den Kulturen der drei Versuchstiere nach Kryokonservierung weiterhin Myozyten enthalten sind.

In einer vorherigen Studie unseres Institutes wurde am Großtiermodell des Schweines gezeigt, dass nach Herzinfarkt und kardiopulmonaler Reanimation die Spiegel von IL-1 β im Myokard ansteigen. Da IL-1 β in Remodellingprozessen des gesamten Organismus eine große Rolle spielt, wurde die beschriebene Zellkultur etabliert, um die molekularen und zellulären Effekte von IL-1 β auf kardiales Gewebe zu evaluieren.

Wir konnten im Weiteren durch molekularbiologische und biochemische Versuche zeigen, dass die primären kardialen Zellkulturen den signalvermittelnden IL-1RI konstitutiv exprimierten (s. 3.3). Eine Studie von Wesphal et al. ergab ein ähnliches Resultat: Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Herzgewebe nach ischämischer Kardiomyopathie und gesundem Herzgewebe in der Expression des IL-1RI³³.

4.2 Effekte von IL-1 β auf die Proliferation und Apoptose

Die kardiale Zellkultur wurde in dieser Arbeit mit drei verschiedenen Konzentrationen 1, 10 und 100 ng/ml rekombinantem IL-1 β stimuliert. Diese Werte orientierten sich an den Ergebnissen vorangegangener Studien, welche Konzentrationen zwischen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β einschlossen: In der Monokultur aus Myozyten war die Proliferation nach Stimulation mit 0,1 ng/ml am stärksten gesteigert und bei Werten bis zu 10 ng/ml IL-1 β weiterhin signifikant erhöht⁵³. Die Monokultur aus Myofibroblasten zeigte eine signifikant erhöhte Proliferation für die Konzentrationen 1 und 10 ng/ml IL-1 β . Geringere Konzentrationen von 1 pg/ml bis 100 pg/ml IL-1 β bewirkten keine signifikanten Effekte¹².

Im Blut wird IL-1 β an α 2-Makroglobulin, Komplementfaktoren oder den löslichen IL-1 Rezeptor Typ II gebunden transportiert²³. Im Gewebe hingegen wird IL-1 β lokal durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Immunzellen ausgeschüttet²². Daher können die gemessenen Konzentrationen des ungebundenen IL-1 β dort nach Ereignissen wie einem Myokardinfarkt deutlich ansteigen¹⁵. Es ist schwierig die systemischen Werte, gemessen in ng/ml, mit den lokalen Konzentrationen, bezogen auf ng/mg Gewebe, zu vergleichen^{15, 23}. Es erscheint durchaus wahrscheinlich, dass

die lokalen Konzentrationen deutlich über den systemisch gemessenen IL-1 β Spiegeln liegen. Dies war der Grund, weshalb die Stimulation in dieser Arbeit auch mit 100 ng/ml IL-1 β durchgeführt wurde.

Die Wirkung von IL-1 β auf die inflammatorische Antwort nach einem Herzinfarkt ist zeitabhängig. Bujak et al. zeigten, dass die Inhibition von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Effekte bewirkte: Eine Aufhebung der Wirkung wenige Minuten nach Eintreten des Infarktes verhinderte die gesamte inflammatorische Reaktion, wohingegen eine spätere Inhibition vor allem die Fibroblasten beeinflusste²³.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die kardialen Zellkulturen in dieser Arbeit für Zeiträume zwischen 30 Minuten und 96 Stunden mit IL-1 β stimuliert: Alle molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen sowie die Zellproliferationsassays wurden zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt.

Zur Beurteilung der Wirkung von IL-1 β auf die Zellproliferation in der primären kardialen Zellkultur wurde ein MTS-Zellproliferationsassay durchgeführt. Die Versuche zeigten, dass die Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β nach 24 Stunden zu einer erhöhten Zellproliferation führte (s. 3.4). Nach längerer Stimulation konnte dieser proliferative Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Folglich bewirkte IL-1 β vor allem in kürzeren Stimulationszeiträumen proliferative Einflüsse auf die kardiale Zellkultur.

Kaden et al. zeigten in einem Bromodeoxyuridin-Assay, dass humane Myofibroblasten der Aortenklappe nach einstündiger Stimulation mit IL-1 β zur Proliferation angeregt wurden. Alle untersuchten Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 ng/ml IL-1 β bewirkten eine signifikant gesteigerte Proliferation, mit einem Peak nach Applikation von 0,1 ng/ml IL-1 β ⁵³. Im Gegensatz dazu wurde in einer früher publizierten in vitro Studie durch Koudssi et al. angenommen, dass der Zellzyklus kardialer Fibroblasten durch IL-1 β Stimulation an dem G1/S Kontrollpunkt stoppte und keine DNA-Replikation stattfinden konnte⁴. IL-1 β schien die Expression der Zellzyklus regulierenden Faktoren zu beeinflussen: Die Zykline, Zyklin abhängigen Kinasen und deren Inhibitoren wurden von IL-1 β reguliert⁴. Eine weitere Studie von Palmer et al. stellte an einem in vitro Modell isolierter Myozyten und Fibroblasten von neonatalen Ratten fest, dass IL-1 β kardiale Myozyten zur Hypertrophie anregte und

die DNA Synthese reiniziierte. Im Gegensatz dazu wurde ein starker antiproliferativer Effekt von IL-1 β auf kardiale Fibroblasten gezeigt¹².

Zur Quantifizierung des Zellwachstums wurde in unseren Versuchen ein kolorimetrischer MTS-Zellproliferationsassay durchgeführt. Der Assay basiert auf der Umsetzung einer Tetrazoliumkomponente, welche abhängig von der enzymatischen Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen ist. Folglich können wir nicht ausschließen, dass neben der Proliferation auch die Hypertrophie mitquantifiziert wird, da der Assay abhängig von der Aktivität der Zellen ist.

Der von Kaden et al. (s.o.) verwendete Anti-Bromodeoxyuridin-Fluoreszenz-Assay⁵³ enthält ein Thymidinanalogon, welches sich während der DNA-Replikation in die DNA-Stränge einlagert. Die Zellzahl wird an Hand der DNA-Menge quantifiziert, während die Stoffwechselleistung der Zellen weniger berücksichtigt wird. Im Vergleich ergaben beide Assays für IL-1 β einen proliferativen Effekt.

Die beschriebenen Experimente wurden an einem gemischten Zellkultursystem durchgeführt: Obwohl die Stimulation mit IL-1 β innerhalb von 24 Stunden einen proliferativen und Aktivität steigernden Effekt bewirkte, konnten wir nicht ausschließen, dass dieses Interleukin verschiedene Wirkungen auf die kardialen Myozyten und Fibroblasten in der Kultur ausübte.

Die Caspase-3 fungiert als Schlüsselenzym des programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose. Verschiedene Stimuli der Zelle selbst oder des umliegenden Gewebes können die Apoptosekaskade initiieren, welche zur Aktivierung der Caspase-3 führt^{1, 16}.

In der vorliegenden Zellkultur exprimierten sowohl unstimulierte als auch mit IL-1 β stimulierte Schweineherzzellen die mRNA und das Protein der Pro-Caspase-3. Nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β für drei Stunden stieg die mRNA Konzentration der Pro-Caspase-3 signifikant an. Auf Proteinebene zeigte sich der gleiche Trend nach 24 Stunden. Es konnte jedoch keine aktive Form der Caspase-3, welche durch enzymatische Spaltung der Pro-Caspase-3 entsteht^{58, 59}, nachgewiesen werden (s. 3.5). Diese Ergebnisse sind ein wichtiges Indiz gegen eine apoptotische Wirkung von IL-1 β auf Schweineherzzellen, da die aktive Caspase-3 die Endstrecke sowohl für die intrinsische als auch für die extrinsische Apoptosekaskade darstellt⁵⁸. Dennoch finden sich auch Studien, die proapoptotische Wirkungen des IL-1 β zeigten:

Ing et al. stimulierten isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten mit IL-1 β (5 ng/ml), IFN (100 U/ml) und TNF- α (25 ng/ml) einzeln sowie in Kombination. Die Applikation von IL-1 β steigerte die Anzahl fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesener apoptotischer Vesikel nach 96 Stunden signifikant, eine kombinierte Stimulation mit IL-1 β , IFN und TNF- α zeigte dies bereits nach 48 Stunden⁶⁰. Die Abweichungen zu unseren Ergebnissen in der gemischten kardialen Zellkultur könnten zum einen durch die Verwendung isolierter Kardiomyozyten einer anderen Spezies und damit einhergehend dem Fehlen von Interaktion zwischen den unterschiedlichen Zelltypen, zum anderen durch und den längeren Stimulationszeitraum von 96 Stunden in der Studie von Ing et al. bedingt sein.

Abbate et al. induzierten im Tiermodell bei Mäusen einen Herzinfarkt. Anschließende sechstägige Applikation des rekombinanten, humanen IL-1Ra Anakinra bewirkte ein verbessertes ventrikuläres Remodelling, abgeschwächte Apoptose und die Inhibition von Caspase-1 und -9 gegenüber der Kontrolle⁶¹. Eine zu starke Inhibition des IL-1 störte jedoch die Integrität der Narbe und es kam, wie von Bujak et al. geschildert, zur Ruptur der Herzwand²³. Diese in vivo Ergebnisse deuten im Gegensatz zu den in vitro Ergebnissen der vorliegenden Arbeit an einer Zellkultur proapoptotische Effekte von IL-1 β in vivo an.

Die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β auf apoptotische Vorgänge wird durch die Synthese weiterer Inflammationsmediatoren und die Neutrophileninfiltration beeinflusst²³. In vivo wird das Gewebe nach einem Myokardinfarkt hypoxisch, Hypoglykämie, Azidose und niedrigere ATP Konzentrationen induzieren den mitochondrialen, Caspase-9 vermittelten Apoptoseweg¹⁰. Des Weiteren stimuliert das entzündliche Infiltrat die lokale Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1, welche die Caspase-8 vermittelte Apoptosekaskade in Kardiomyozyten beeinflussen¹⁰.

Die Situation in unserem IL-1 β stimulierten Zellkulturmodell lässt sich nur bedingt mit einer systemischen Antwort auf eine Gewebehypoxie in vivo, wie in der oben beschriebenen Literatur nach einem Myokardinfarkt, vergleichen. Interaktionen zwischen den kardialen Zellen sind in unserem System zwar möglich, doch eine systemische Wirkung, wie Immunzellinfiltration oder Einflüsse durch zirkulierende Mediatoren, sind in vitro ausgeschlossen. Diese Umstände ermöglichen es, in unserem Modell die Wirkung von IL-1 β zu beobachten. Dies bietet den Vorteil, dass isolierte Effekte von IL-1 β untersucht werden können, und nimmt den Nachteil, dass

der Einfluss anderer Faktoren auf die Wirkungen des IL-1 β nicht berücksichtigt werden kann, in Kauf.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-1 β vor allem proliferative, aber keine apoptotischen Effekte auf Schweineherzzellen in vitro ausübt. Es bleibt zu beachten, dass diese Ergebnisse die Gesamtheit der kardialen Zellen betreffen und differenzierte Effekte auf einzelne Zelltypen nicht ausgeschlossen werden können.

4.3 Effekte von IL-1 β auf das Remodelling

Nach einem Myokardinfarkt steigt die Aktivität der MMP-2 und MMP-9 an^{15, 62}. Die Funktionen der MMPs sind für verschiedene Umbauprozesse im Gewebe, wie das Remodelling nach einem Myokardinfarkt, unerlässlich: Sie spalten Proteine der EZM und aktivieren weitere Botenstoffe und Enzyme^{37, 49}. Die Aktivität dieser MMPs wird durch die Wirkungen von Mediatoren wie IL-1 β auf den Ebenen der Transkription und Translation beeinflusst. Verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden führen dabei zur verstärkten Expression: MMP-2 wird durch die Proteinkinase C und den nukleären Faktor NF κ B induziert, MMP-9 durch die Kinasen JNK und ERK⁶². Anschließend folgt die Aktivierung der Pro-MMPs erfolgt durch proteolytische Spaltung durch verschiedene Serinproteasen oder andere MMPs. Die in dieser Studie untersuchte Gelatinase MMP-2 wird durch MMP-1, -2, -14, -16 und -17 aktiviert, MMP-9 durch MMP-3 und -13⁴².

Unsere Experimente zeigten eine signifikant erhöhte Genexpression und enzymatische Aktivität von MMP-2 und MMP-9 nach IL-1 β Stimulation. Nach dreistündiger Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β wurde die höchste mRNA-Expression gemessen. Die enzymatische Aktivität des Proteins stieg für MMP-2 früher an, als für MMP-9, signifikante Werte ergaben sich nach 48 bzw. 72 Stunden (s. 3.6). Nach 96 Stunden nahm die Aktivität beider MMPs wieder ab. Die erhöhten mRNA Werte deuten darauf hin, dass die gesteigerte Genexpression eine der Ursachen für die erhöhte Aktivität der MMPs darstellen könnte. Mehrere Tierstudien³⁵ und einige Studien am Menschen^{35, 63} zeigten, dass die Aktivität der MMP-2 und MMP-9 durch erhöhte Konzentrationen von IL-1 β nach einem Myokardinfarkt, abhängig von der Ischämiedauer³⁷, zunimmt³⁰. Die zentrale Rolle von IL-1 β in der Regulation der MMPs im Herzgewebe wurde außerdem in vitro an Studien mit Kulturen kardialer Fibroblasten demonstriert^{64, 65}.

Brown et al. bestätigten die durch IL-1 β induzierte Expression von MMP-2 und -9 in Western Blot Experimenten nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β ⁶⁴. Siwik et al. zeigten durch Stimulation kardialer Fibroblasten der Ratte mit 4 ng/ml IL-1 β eine erhöhte Gen- und Proteinexpression der MMP-2 und -9. Des Weiteren wurde ein Einfluss von IL-1 β auf die Kollagensynthese nachgewiesen: Die Genexpression der kardialen Kollagene I und III wurde durch IL-1 β um 43% herunterreguliert, wohingegen das Kollagen IV und das Fibronektin induziert wurden⁶⁵.

Mukherjee et al. erforschten darüber hinaus die zeitliche und räumliche Lokalisation beider MMPs in einem transgenen Mausmodell des Herzinfarktes. Nach dem Myokardinfarkt wurde die Expression von MMP-2 ab dem ersten und von MMP-9 ab dem dritten Tag induziert, wobei die Expression von MMP-2 die von MMP-9 überragte⁶⁶.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in unserem Zellkultursystem primärer Schweineherzzellen ermittelt werden: In der Zymographie war die Aktivität der MMP-2 bereits nach 48 h, die der MMP-9 erst nach 72 h signifikant erhöht.

Neben der zentralen Rolle der MMPs bei dem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix sind weitere Funktionen der MMPs im kardialen Remodelling von großer Bedeutung: Sie können Signalmoleküle wie TGF- β aktivieren, die Abgabe von zellgebundenem TNF- α induzieren oder die Chemokinaktivität durch Spaltung vermindern³⁶. MMP-2 und -9 besitzen weiterhin die Funktion Pro-IL-1 β zu spalten und somit zu aktivieren⁴². Damit bewirken MMPs neben den direkten Einflüssen auf Komponenten der extrazellulären Matrix in dem betroffenen Gewebe zahlreiche indirekte Effekte zur Regulation von komplexen zellulären Prozessen und der Gewebehomöostase.

MMPs werden, abgesehen von den oben beschriebenen Ebenen der Gentranskription und Gentranslation, auch durch posttranslationale Modifikation (proteolytische Spaltung durch andere MMPs) und durch die Interaktion mit endogenen Inhibitoren reguliert:

Inhibierende Wirkungen auf die MMPs können dem α -Makroglobulin, dem zellgebundene Protein RECK und den TIMPs zugeschrieben werden⁴². Alle vier Mitglieder der Familie der TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) konnten im kardialen Gewebe nachgewiesen werden⁴¹. Generell wirken sie unspezifisch auf die MMPs, wobei TIMP-2 eine Präferenz für MMP-2 und -9 zeigt. TIMP-3 inhibiert hauptsächlich MMP-

1, -3, -7 und -13, TIMP-4 inhibiert vor allem MMP-1, -2, -3, -7 und -9⁴². In gesundem kardialen Gewebe werden MMPs und TIMPs koexprimiert und strikt reguliert, um die Integrität des Gewebes zu erhalten². Im Rahmen des Remodelling nach einem Herzinfarkt wird die MMP/TIMP Relation verändert. Es existieren zurzeit noch wenige Studien zu der Rolle des IL-1 β in diesem Gefüge:

Deten et al. führten Experimente in vivo an der Ratte durch. Während des myokardialen Remodelling vier Wochen nach einem Myokardinfarkt war sowohl die mRNA-Expression von MMP-2 als auch die von TIMP-2 proportional zur Konzentration von IL-1 β im Gewebe erhöht⁶⁷. Mehrere Stimuli, wie beispielsweise mechanischer Stress nach einem Myokardinfarkt, erhöhten die TIMP-2 Expression². In unserem primären, kardialen Zellkultursystem führte die dreistündige Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β zu einer gesteigerten mRNA-Expression von TIMP-2, wohingegen frühere Zeitpunkte und geringere Konzentrationen keine Regulation bewirkten (s. 3.7). Diese spezifische Wirkung könnte als protektiver Mechanismus gegen exzessives Matrixremodelling durch die MMPs interpretiert werden, da die Genexpression der MMPs bereits zu früheren Zeitpunkten, als die des TIMP-2 induziert war.

Andere Studien, welche jedoch an kardialen Monokulturen der Ratte, nicht an Mischkulturen des Schweins durchgeführt wurden, konnten keine vermehrte Expression des TIMP-2 nachweisen: Brown et al. fanden in mit 10 ng/ml IL-1 β stimulierten, kardialen Fibroblasten der Ratte keine Regulation der TIMP-2 Genexpression, jedoch eine 6-fach erhöhte Konzentration von TIMP-1⁶⁴. Diese Effekte auf TIMP-1 und -2 belegte eine weitere Studie durch Li et al. an kardialen Monokulturen der Ratte. Zusätzlich zeigte sich in PCR und Westerblot eine vorübergehend gesteigerte Expression des Proteins TIMP-4 durch die Stimulation mit IL-1 β ⁴¹.

Die Durchführung einer reversen Zymographie könnte helfen, präzisere Aussagen zum Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität der TIMPs zu treffen und die auseinanderweichenden Ergebnisse der verschiedenen Studien zu erklären.

Zusammenfassend stellte sich IL-1 β in unseren Studien als pleiotropes Zytokin mit verschiedenen Wirkungen dar: Es reguliert die Zellproliferation und das myokardiale Remodelling. Diese Vorgänge sind mit einer Induktion der Gelatinasen und dem Einfluss von IL-1 β auf die Genexpression von TIMP-2 assoziiert. Aufbauend auf

unseren veröffentlichten in vivo Daten¹⁵ unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die These, dass IL-1 β als Schlüsselmolekül zur Regulation von Remodellingvorgängen nach Myokardinfarkten fungiert.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte durch die Etablierung eines primären kardialen Zellkulturmodells des Schweins gezeigt werden, dass IL-1 β in vitro die Zellproliferation induziert und keine Caspase-3 abhängige Apoptose veranlasst. IL-1 β führt zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität von MMP-2 und MMP-9 und reguliert die Genexpression des endogenen Inhibitors der MMPs, TIMP-2.

Basierend auf diesen Resultaten ergeben sich weitere interessante Fragestellungen, welche nicht Grundlage der vorliegenden Arbeit waren:

1. Beeinflusst IL-1 β die Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen in der Primärkultur?
2. Obwohl in den Western Blot Experimenten keine aktive Caspase-3 nachgewiesen werden konnte, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass IL-1 β Einflüsse auf apoptotische Vorgänge ausübt. Werden andere Caspasen durch IL-1 β reguliert?
3. Welchen Einfluss hat IL-1 β auf die Aktivität des Proteins TIMP-2? Werden weitere Mitglieder der TIMP Familie, z.B. TIMP-1 und TIMP-4, welche auch die MMPs -2 und -9 inhibieren, durch IL-1 β reguliert?

5 Zusammenfassung

Ein Herzinfarkt geht mit lokal erhöhten Spiegeln von Interleukinen einher, welche eine wichtige Rolle in Remodellingprozessen des gesamten Organismus spielen. Dieser Zusammenhang wurde in einer kürzlich publizierten Studie unserer Klinik an einem Tiermodell nach induziertem Myokardinfarkt und kardiopulmonaler Reanimation belegt: Im Myokardgewebe konnten hohe Konzentrationen des proinflammatorischen IL-1 β nachgewiesen werden (Meybohm et al., PLoS One, 2009). Um die zellulären und molekularen Wirkungen von IL-1 β im kardialen Gewebe näher zu analysieren, wurde ein Zellkulturmodell primärer Schweineherzzellen etabliert. An dieser Zellkultur wurden die Effekte von IL-1 β auf Zellproliferation, Apoptose und Expression sowie Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP-2 und -9) und von ihrem Inhibitor TIMP-2 untersucht.

Die primären, kardialen Zellkulturen wurden durch eine Kombination aus mechanischen und enzymatischen Methoden aus Schweineherzgewebe isoliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem IL-1 β stimuliert. Die Zellproliferation wurde durch einen kolorimetrischen MTS-Zellproliferationsassay gemessen, die RNA Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt, Proteinexpression und Caspaseaktivität wurden durch Western Blot Experimente quantifiziert und die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) wurde durch die Gelatinzymographie evaluiert.

Die Schweineherzzellen exprimierten den IL-1 Rezeptor Typ I konstitutiv und die Stimulation mit IL-1 β führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Zellproliferation nach 24 Stunden. Die Genexpression der Caspase-3, eines Schlüsselenzyms der Apoptose, war nach dreistündiger Stimulation mit IL-1 β induziert. In Western Blot Experimenten konnte Pro-Caspase-3 nachgewiesen werden, es fand sich jedoch keine aktive Caspase-3. Sowohl die Genexpression der MMP-2 als auch die enzymatischen Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 wurden durch IL-1 β signifikant erhöht. Die Genexpression des Inhibitors TIMP-2 wurde durch die Stimulation mit IL-1 β gesteigert.

Die in vitro Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren, dass IL-1 β im Herzen einen essentiellen Mediator des kardialen Remodelling darstellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme Verlag*. 2006.
2. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123(2):255-278.
3. Long CS, Henrich CJ, Simpson PC. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul*. 1991;2(12):1081-1095.
4. Koudssi F, Lopez JE, Villegas S, Long CS. Cardiac fibroblasts arrest at the G1/S restriction point in response to interleukin (IL)-1beta. Evidence for IL-1beta-induced hypophosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25796-25803.
5. Fox KA, Birkhead J, Wilcox R, Knight C, Barth JH. British Cardiac Society Working Group on the definition of myocardial infarction. *Ann Clin Biochem*. 2004;41(Pt 4):263-271.
6. Wang OJ, Wang Y, Lichtman JH, Bradley EH, Normand SL, Krumholz HM. "America's Best Hospitals" in the treatment of acute myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 2007;167(13):1345-1351.
7. Statistisches-Bundesamt-Deutschland. *Todesursachen - Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*. 2009.
8. Herold G. Innere Medizin. 2009.
9. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFFtRoMI. Universal definition of the myocardial infarction. *Kardiol Pol*. 2008;66(1):47-62.
10. Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Van Tassell BW, Baldi A. Cellular preservation therapy in acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(3):H563-565.
11. Dixon JA, Spinale FG. Pathophysiology of myocardial injury and remodeling: implications for molecular imaging. *J Nucl Med*. 2010;51 Suppl 1:102S-106S.
12. Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD, Long CS. Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2555-2564.
13. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The pre-clinical animal model in the translational research of interventional cardiology. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(5):373-383.
14. Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol*. 2003;94(5):1689-1701.
15. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Zacharowski KD, Lucius R, Zitta K, Koch A, Tran N, Scholz J, Bein B. Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PLoS One*. 2009;4(10):e7588.
16. Müller-Esterl W. Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Elsevier Verlag*. 2004.
17. Karpinski L, Plaksej R, Kosmala W, Witkowska M. Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in relation to left ventricular function in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Kardiol Pol*. 2008;66(12):1279-1285.

18. Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A, Werdan K. Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. *Shock*. 2001;16 Suppl 1:3-9.
19. Omerovic E, Bollano E, Soussi B, Waagstein F. Selective beta1-blockade attenuates post-infarct remodelling without improvement in myocardial energy metabolism and function in rats with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2003;5(6):725-732.
20. Stumpf C, Seybold K, Petzi S, Wasmeier G, Raaz D, Yilmaz A, Anger T, Daniel WG, Garlachs CD. Interleukin-10 improves left ventricular function in rats with heart failure subsequent to myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(8):733-739.
21. Zhang ML, Mei J, Archer LA, Obayashi M, Diao N, Stuyvers B, ter Keurs HE. Effects of therapy using the Celacade system on structural and functional cardiac remodelling in rats following myocardial infarction. *Can J Cardiol*. 2009;25(7):e241-247.
22. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw*. 1994;5(6):517-531.
23. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57(3):165-176.
24. Chung KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets*. 2006;7(6):675-681.
25. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-426.
26. Saklatvala J, Davis W, Guesdon F. Interleukin 1 (IL1) and tumour necrosis factor (TNF) signal transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;351(1336):151-157.
27. Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol*. 1995;269(2 Pt 2):R229-235.
28. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med*. 2000;343(10):732-734.
29. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today*. 1994;15(12):562-566.
30. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol*. 2008;173(1):57-67.
31. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*. 2002;55(2):329-340.
32. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res*. 2004;53(11):585-595.
33. Westphal E, Rohrbach S, Buerke M, Behr H, Darmer D, Silber RE, Werdan K, Loppnow H. Altered interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-18 mRNA expression in myocardial tissues of patients with dilated cardiomyopathy. *Mol Med*. 2008;14(1-2):55-63.
34. Ekhterae D, Hinmon R, Matsuzaki K, Noma M, Zhu W, Xiao RP, Gorman RC, Gorman JH, 3rd. Infarction Induced Myocardial Apoptosis and ARC Activation. *J Surg Res*. 2009.

35. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285-1342.
36. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-233.
37. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 2007;152(2):189-205.
38. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):117-127.
39. Guo XG, Uzui H, Mizuguchi T, Ueda T, Chen JZ, Lee JD. Imidaprilat inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in human cardiac fibroblasts induced by interleukin-1beta via NO-dependent pathway. *Int J Cardiol.* 2008;126(3):414-420.
40. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-423.
41. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res.* 1999;42(1):162-172.
42. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003;200(4):448-464.
43. Timonen P, Magga J, Risteli J, Punnonen K, Vanninen E, Turpeinen A, Tuomainen P, Kuusisto J, Vuolteenaho O, Peuhkurinen K. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2008;124(3):293-300.
44. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-273.
45. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Rodde C, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Hypoxia-induced cell damage is reduced by mild hypothermia and postconditioning with catalase in-vitro: application of an enzyme based oxygen deficiency system. *Eur J Pharmacol.* 2010;628(1-3):11-18.
46. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993;2(4):275-287.
47. Tan SC, Carr CA, Yeoh KK, Schofield CJ, Davies KE, Clarke K. Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors. *Mol Biol Rep.* 2011.
48. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994;218(2):325-329.
49. Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry.* 2009;48(46):10830-10845.
50. Zitta K, Brandt B, Wuensch A, Meybohm P, Bein B, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. Interleukin-1beta regulates cell proliferation and activity of

- extracellular matrix remodelling enzymes in cultured primary pig heart cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):542-547.
51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
 52. Feld Y, Melamed-Frank M, Kehat I, Tal D, Marom S, Gepstein L. Electrophysiological modulation of cardiomyocytic tissue by transfected fibroblasts expressing potassium channels: a novel strategy to manipulate excitability. *Circulation*. 2002;105(4):522-529.
 53. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggreffe M. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):205-211.
 54. Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ Res*. 1982;50(1):101-116.
 55. Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Ulrix W, Hoeben E, Verhoeven G, Aumuller G. Mesenchymal entactin-1 (nidogen-1) is required for adhesion of peritubular cells of the rat testis in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2000;79(2):112-120.
 56. Koebe HG, Schildberg FW. Isolation of porcine hepatocytes from slaughterhouse organs. *Int J Artif Organs*. 1996;19(1):53-60.
 57. Varguhese JF, Li Y. Molecular dynamics and docking studies on cardiac troponin C. *J Biomol Struct Dyn*. 2011;29(1):123-135.
 58. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):725-731.
 59. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-470.
 60. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res*. 1999;84(1):21-33.
 61. Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Biondi-Zoccai GG, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetrovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC, Dobrina A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117(20):2670-2683.
 62. Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 2004;279(38):39513-39519.
 63. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*. 1996;155(1):13-21.
 64. Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(1):200-205.
 65. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. 2000;86(12):1259-1265.
 66. Mukherjee R, Mingoia JT, Bruce JA, Austin JS, Stroud RE, Escobar GP, McClister DM, Jr., Allen CM, Alfonso-Jaume MA, Fini ME, Lovett DH, Spinale FG. Selective spatiotemporal induction of matrix metalloproteinase-2 and

- matrix metalloproteinase-9 transcription after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2216-2228.
- 67.** Deten A, Marx G, Briest W, Christian Volz H, Zimmer HG. Heart function and molecular biological parameters are comparable in young adult and aged rats after chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;66(2):364-373.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Ich danke Prof. Dr. med. Jens Scholz für die Aufnahme als Doktorandin in die Anästhesie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Albrecht für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in Statistik- und Literaturverwaltungsprogramme, unzählige gute Ratschläge und die engagierte, freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an Dr. Karina Zitta fürs Erklären der Zellkulturtechniken, molekularbiologischen und proteinbiochemischen Versuche, für viele wertvolle Anregungen, für die gemeinsame Teilnahme am europäischen Anästhesie Kongress in Helsinki und die argentinische Lebensfreude im Labor.

Dr. Anne Wunsch aus München danke ich für die Bereitstellung der kardialen Schweinezellen.

Für die freundliche Unterstützung und die vielen, guten Tipps möchte ich Margret Betz und Cornelia Rodde herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, die mit viel Liebe und Unterstützung mein Studium und noch vieles mehr ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Berenice Brandt
 Geburtsdatum und -ort: 04. Juli 1987 in Kiel
 Eltern: Dr. Michael Brandt, Dr. Gisela Brandt (Zahnärzte)
 Geschwister: Benedikt 21 Jahre, Dominik 15 Jahre

Schulbildung:

1993 – 1997 Hardenberg-Grundschule, Kiel
 1997 – 2006 Gymnasium Hebbelschule, Kiel
 Juni 2006 Abitur (Note 1.4) mit den LKs Biologie und Mathematik

Studium:

Oktober 2006 - heute Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel
 August 2008 Physikum (Note 1.5)
 Angestrebter Abschluss: Staatsexamen

März 2008 - Juli 2011 Nachtwache im diagnostischen Schlaflabor des ZIP Kiel
 April 2009 - heute Experimentelle Doktorarbeit in der Anästhesie des UKSH
 SS 2010 ERASMUS Auslandssemester in Murcia, Spanien

Geleistete Famulaturen Anästhesie (42 Tage), Pädiatrie (14 Tage), Kardiologie (28 Tage), Gynäkologie (21 Tage), Dermatologie (21 Tage), Ophthalmologie (14 Tage)

Praktisches Jahr Innere Medizin, Anästhesie, Chirurgie

Veröffentlichungen *Postervorstellung beim ESA 2010 in Helsinki:* Zitta, Brandt et al., IL-1 regulates cell proliferation and activity of extracellular matrix remodelling enzymes in cultured pig heart cells, *ESA 2010*
Veröffentlichung: Zitta, Brandt et al., Interleukin-1beta regulates cell proliferation and activity of extracellular matrix remodelling enzymes in cultured primary pig heart cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010