

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Herzerkrankungen in Industrieländern	1
1.2 Herzschädigungsmodelle	2
1.2.1 Herzschädigung mittels Doxorubicin	2
1.2.2 Tierversuchsmodell mittels Propranolol	3
1.2.3 Herzschädigung mittels Monocrotalin	3
1.2.4 Herzschädigung durch Erzeugung eines ischämischen Infarktes	4
1.2.5 Herzschädigung durch genetische Modifikation	4
1.3 Cre/LoxP und induzierbares ERT2 –Expressionssystem	5
1.4 Reportergene und induzierte Überexpression von Genen	9
1.5 Diphtherie-Toxin (DT)	11
1.6 Die Magnetresonanztomographie als bildgebendes Verfahren	12
1.7 Ziel der Arbeit	16
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Geräte	18
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4 Chemikalien	19
2.1.5 Verwendete Enzyme	22
2.1.6 Lösungen und Puffer	22
2.1.7 Oligonukleotide (Primer)	23
2.1.8 Narkosemittel / Schmerzmittel / Salben	24
2.1.9 Erstantikörper	25
2.1.10 Zweitantikörper / Kernfärbung / Strukturanfärbung	25
2.1.11 Fluorophore	26
2.2. Methoden	26
2.2.1 Genotypisierung	26

Inhaltsverzeichnis

II

2.2.2 Gewinnung von DNA aus Schwanzbiopsien	27
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen	27
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction)	27
2.2.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	28
2.2.6 Agarose-Gelektrophorese	29
2.2.7 Applikation von Tamoxifen	30
2.3 Aufteilung der Tiergruppen	31
2.3.1 Vorversuch zur Überprüfung der Cre- vermittelten Rekombinationsaktivität	31
2.3.2 Vorversuch zur semiquantitativen Abschätzung des Grades der Schädigung bei verschieden langer Tamoxifenapplikation.	31
2.3.3 Modellcharakterisierung	32
2.4 Nicht-invasive Messung am Magnetresonanztomographen (MRT)	32
2.4.1 Versuchsplanung für die MRT	32
2.4.2 Vorbereitung der Mäuse für die Magnetresonanztomographie	33
2.4.3 MRT-Untersuchung	34
2.5 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	35
2.5.1 Perfusion, Gewebeentnahme und Einbettung des Gewebes	35
2.5.2 Schneiden des Gewebes	36
2.5.3 Gewebefixierung	36
2.5.4 Hämatoxilin-Eosin Färbung (H.E. Färbung)	37
2.5.5 lacZ-Färbung und Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) an Gewebeschritten	38
2.5.6 Immunhistochemische Nachweismethoden	40
2.5.7 Antigennachweis	40
2.6 Quantifizierung histologischer Färbungen	42
2.7 Statistische Auswertung	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Vorversuche	44
3.1.1 RT-PCR zum Nachweis der Cre-Rekombinase im Herz	44
3.1.2 Test der ZAP- Reportermaus	45
3.1.3 Überprüfung der herzspezifischen Rekombination mit dem CreERT2- Expressionssystem.	47

3.1.4 Vorversuch zur Kardiomyozytenablation mit doppelt-heterozygoten MerCreMer/DTA Tieren	49
3.1.5 Semiquantifizierung der Gewebeschädigung aus dem Vorversuch	51
3.2 Charakterisierung des Kardiomyozytenablationsmodells	52
3.2.1 Einteilung der Versuchstiergruppen	53
3.2.2 HE-Färbung zur Quantifizierung der durch ablatierte Kardiomyozyten entstandenen Fläche	53
3.2.3 Immunhistochemischer Kollagen VI Nachweis zur Darstellung der Fibrose	57
3.2.4 Immunhistochemischer Nachweis fibronektinhaltiger Strukturen im Herz nach Tamoxifen-Applikation zur Darstellung reparativer Prozesse der Herzmuskulatur	62
3.2.5 Immunhistochemischer Nachweis kardialer Gewebsmakrophagen durch Detektion der CD 68 – Expression	66
3.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von smooth muscle α -actin (SM α -Aktin) in kardialen Myozyten während des Remodeling nach Tamoxifen (TMX)- Induktion	69
3.2.7 Immunhistochemische Markierung des Transkriptionsfaktors Islet-1 nach Tamoxifen (TMX)- Induktion	73
3.3 Funktionelle Analyse des Mäuseherzens mittels Magnetresonanztomographie (MRT)	75
3.3.1 Untersuchungsgruppen für die MRT	75
3.3.2 Schnittebenen im Herzen	76
3.3.3 Filmsequenzen (CD im Anhang)	77
3.3.4 Bestimmung des Endstolisch Volumen (ESV)	77
3.3.5 Bestimmung des Enddiastolisch Volumens (EDV)	79
3.3.6 Bestimmung der Auswurffraktion (Ejektionsfraktion, EF)	81
4 Diskussion	84
4.1 Remodeling	84
4.1.1 Erhöhte Expression von Kollagen	85
4.1.2 Erhöhte Expression von Fibronectin	87
4.2 Entzündungsreaktion als Folge der Kardiomyozytenablation	87
4.3 Monitoring der Herzfunktion mittels MRT	88

Inhaltsverzeichnis	IV
4.3.1 Die Auswirkungen der Kardiomyozytenablation und Fibrose auf die Herzfunktion	90
4.4 Beurteilung des CreERT2-Expressionssystems im Rahmen des entwickelten Modells	91
4.5 Expression fetaler Proteine als Stressantwort	94
4.6 Identifizierung von Vorläuferzellen im adulten Mäuseherzen über Islet 1	95
4.7 Beurteilung des Ablationsmodells im Hinblick auf andere klassische Herzschädigungsmodelle	97
5. Zusammenfassung	100
6. Summary	102
7 Literaturverzeichnis	104