

**1 Einleitung.....1**

1.1 Mechanismen der kardialen Hypertrophie auf zellulärer Ebene .....3

1.2 Regulatoren kardialer Hypertrophie .....4

1.3 Der Transkriptionsfaktor Smad .....6

1.4 Smad4 .....8

1.5 Zielsetzung .....9

**2 Material .....11**

2.1 Chemikalien .....11

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien .....11

2.1.2 Inhibitoren.....13

2.1.3 Antisenseoligonukleotide .....13

2.1.4 Antikörper .....13

2.2 Geräte und Laborbedarf.....14

2.2.1 Zellpräparation und Zellkultur.....14

2.2.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion.....14

2.2.3 Allgemein verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....14

2.2.4 SDS-PAGE .....15

2.2.5 Auswertungs-Software .....16

**3 Methoden .....17**

3.1 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen.....17

3.1.1 Versuchstiere .....17

3.1.2 Präparation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten aus den Rattenherzen.....17

3.2 Verwendete Lösungen .....18

3.2.1 Kalzium-Stammlösung .....18

3.3 Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte .....19

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
3.3.1 Vorplattieren der Kulturschalen .....	19
3.3.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten .....	20
3.3.3 Kultivierung der isolierten Kardiomyozyten .....	20
3.4 Behandlung der Zellen .....	21
3.4.1 Stimulation der Kardiomyozyten .....	21
3.4.2 Transformation adulter Kardiomyozyten der Ratte mittels Smad4-Antisenseoligonukleotiden .....	21
3.5 Proteinnachweis .....	22
3.5.1 Isolierung von Gesamtprotein .....	22
3.5.2 Proteinmengenbestimmung .....	23
3.5.3 Lämmli-Färbung .....	24
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	24
3.5.5 Western-Blot .....	26
3.6 Methoden zur Hypertrophieerfassung in Kardiomyozyten der Ratte .....	28
3.6.1 Quantifizierung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten mittels Inkorporation von <sup>14</sup> C-Phenylalanin .....	28
3.6.2 Erfassung der Hypertrophie durch Bestimmung der Zellgrößen .....	29
3.7 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld .....	30
3.7.1 Probenvorbereitung .....	30
3.7.2 Elektrische Stimulation zur Steuerung der Myokardzell-Kontraktion .....	30
3.7.3 Messung der Kontraktionsparameter .....	32
3.7.4 Messprotokoll .....	36
3.7.5 Statistik und Auswertung der Kontraktionsparameter .....	37
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1 Rolle des Smad4-Proteins bei der Hypertrophieentstehung .....	38
4.1.1 Transformation von adulten Kardiomyozyten der Ratte mit Smad4-Antisense- Oligonukleotiden führt zur Reduktion der Smad4 Expression .....	38
4.1.2 Hemmung der Smad4-Expression führt zur Erhöhung der Proteinsyntheserate .....	39

4.1.3	Hemmung der Smad4-Expression führt zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten.....	40
4.1.4	Smad4 ist nicht an der $\alpha$ -adrenerg induzierten Hypertrophie beteiligt.....	41
4.2	Einfluss von Smad4 auf die Entstehung der Hypertrophie und daran beteiligte Signalwege.....	43
4.2.1	Rolle der PI3-Kinase, Protein-Kinase C und ERK bei der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophieentstehung .....	43
4.2.1.1	Hemmung der PI3-Kinase führt zur Reduktion der Proteinsyntheserate .....	43
4.2.1.2	Einfluss der Protein-Kinase C auf die Entstehung der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophie.....	44
4.2.1.3	Einfluss von ERK auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophieentstehung.....	45
4.2.2	Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Reduktion der Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten Hypertrophie .....	46
4.2.3	Einfluss der NADPH-Oxidase auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate.....	47
4.2.4	Einfluss von ROS auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate .....	48
4.3	Kontraktionsverhalten Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten .....	50
4.3.1	Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Verbesserung der Kontraktilität Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten .....	50
5	<b>Diskussion</b> .....	52
5.1	Modell für einen funktionellen Knock-Out von Smad4 .....	52
5.2	Smad4 als Wachstumsrepressor in Kardiomyozyten und anderen Zelltypen .....	53
5.3	Signalwege der Hypertrophie.....	55
5.4	Einfluss von Smad4 auf die Kontraktilität.....	57
5.5	Smad4 als endogener Hypertrophierepressor.....	58
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	59

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>78</b>
9.1	Publikationsverzeichnis .....	78