

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Transforming growth factor $\beta$ (TGF $\beta$ ).....	2
1.2.1 Aktivierung von latenter TGF $\beta$ in seine bioaktive Form.....	2
1.2.2 TGF $\beta$ /SMAD-Signalkaskade .....	4
1.3 Endothelzellen .....	5
1.3.1 Endothelzellen: Aufbau und Funktion.....	6
1.3.2 Endothelzellen im Zusammenhang mit Myokard-Infarkt.....	7
1.4 Apoptose .....	7
1.4.1 TGF $\beta$ und Apoptose .....	9
1.5 GATA-Transkriptionsfaktoren.....	9
1.5.1 GATA-Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit TGF $\beta$ im Herzen .....	10
1.6 MikroRNA .....	11
1.6.1 MikroRNA Biogenese .....	11
1.6.2 Regulation von mikroRNAs durch SMAD .....	12
1.6.3 MikroRNA im Herzen.....	13
1.7 Fragestellung dieser Arbeit.....	15
2 Material.....	16
2.1 Chemikalien .....	16
2.2 Antikörper für Immunoblots .....	18
2.3 Primer für RT-PCR und real time PCR.....	19
2.4 Puffer und Lösungen .....	19
2.5 Geräte und Laborbedarf.....	22
2.5.1 Allgemein verwendete Geräte .....	22
2.5.2 Zellkultur .....	22
2.5.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.5.4 Western Blot .....	23
2.5.5 PCR .....	23
2.5.6 Software .....	24
3 Methoden .....	25
3.1 Isolierung von koronaren Endothelzellen der Ratte .....	25
3.1.1 Versuchstiere .....	25
3.1.2 Präparation und Zellkultur von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Rattenherz .....	25
3.1.3 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen .....	26
3.2 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten .....	27
3.2.1 Versuchstiere .....	27

3.2.2	Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus der Ratte .....	27
3.2.3	Vorinkubation der Kulturschalen für ventrikuläre Kardiomyozyten.....	27
3.2.4	Ausplattieren der ventrikulären Kardiomyozyten.....	27
<b>3.3</b>	<b>Hypoxie/Normoxie und Reoxygenierung der Endothelzellen.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Proteinnachweis .....</b>	<b>29</b>
3.4.1	Zellerite zur Isolierung von Gesamtprotein .....	29
3.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	29
3.4.3	Probenaufbereitung mittels Lämmli-Puffer.....	30
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese .....	30
3.4.5	Western Blot .....	32
3.4.6	Immundetektion der transferierten Proteine .....	33
<b>3.5</b>	<b>Nachweis von RNA.....</b>	<b>34</b>
3.5.1	Zellerite von Endothelzellen zur Isolierung von Gesamt RNA .....	34
3.5.2	Isolation von Gesamt-RNA .....	34
3.5.3	DNase-Verdau .....	35
3.5.4	Messung der RNA-Konzentration .....	35
3.5.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	36
3.5.6	Alternativmethode zur DNase-Behandlung und cDNA-Synthese .....	36
3.5.7	Realtime RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (Realtime RT-PCR) .....	36
3.5.8	Auswertung der PCR .....	39
3.5.9	DNA-Gelektrophorese .....	40
<b>3.6</b>	<b>Nachweis von mikroRNA .....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Polyadenylierung mittels Poly-A Schwanz .....	41
3.6.2	cDNA Synthese .....	42
3.6.3	Quantitative Realtime-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) von mikroRNA .....	42
<b>3.7</b>	<b>Nachweis von Apoptose .....</b>	<b>43</b>
3.7.1	Apoptose Nachweis mittels HOE-Assay .....	43
<b>3.8</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Expression von TGF<math>\beta</math> .....</b>	<b>44</b>
	in mikrovaskulären Endothelzellen .....	44
4.1.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA-Expression von TGF $\beta_1$ in Endothelzellen ....	44
4.1.2	Hypoxie/Reoxygenierung erniedrigt zu einem frühen Zeitpunkt der Reoxygenierung .....	45
4.1.3	die mRNA-Expression von TGF $\beta_2$ .....	45
4.1.4	Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von TGF $\beta_3$ .....	46
	Hypoxie und Reoxygenierung steigert die Proteinexpression des TGF $\beta$ -Vorläuferproteins ..	47
	in mikrovaskulären Endothelzellen .....	47
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle .....</b>	<b>48</b>
	in mikrovaskulären Endothelzellen .....	48
4.2.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD2 in Endothelzellen ..	48
4.2.2	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die mRNA Expression von SMAD3 in Endothelzellen ..	49
4.2.3	Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die SMAD4-mRNA-Expression ..	49
	in Endothelzellen .....	50
4.2.4	Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die SMAD7-mRNA-Expression in Endothelzellen ..	51
4.2.5	Es findet eine Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen .....	52
4.2.6	unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt.....	52
	TGF $\beta$ -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Endothelzellen ..	53
	wieder auf .....	53

---

4.2.7	Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Endothelzellen unter hypoxen/reoxygenierten Bedingungen statt.....	54
4.3	<b>Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf GATA-Transkriptionsfaktoren in mikrovaskulären Endothelzellen .....</b>	55
4.3.1	Hypoxie/Reoxygenierung steigert die GATA2-Proteinexpression in Endothelzellen .....	55
4.3.2	Es findet keine Expression von GATA4 und 6 in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte statt .....	56
4.4	<b>Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf mikroRNAs in Endothelzellen .....</b>	56
4.4.1	MikroRNA1 wird nicht in mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert .....	57
4.4.2	Hypoxie und Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA21 .....	57
4.4.3	Hypoxie/Reoxygenierung erhöht die Expression von mikroRNA24 .....	58
4.5	<b>Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf SMAD Signalmoleküle in Kardiomyozyten .....</b>	59
4.5.1	Durch Hypoxie und Reoxygenierung freigesetztes TGF $\beta$ phosphoryliert SMAD2 parakrin in Kardiomyozyten .....	59
4.5.2	TGF $\beta$ -Rezeptor-Inhibitor hebt die Phosphorylierung von SMAD2 in Kardiomyozyten wieder auf .....	60
4.5.3	Es findet keine Phosphorylierung von SMAD3 in Kardiomyozyten statt .....	61
4.6	<b>Einfluss von freigesetztem TGF<math>\beta</math> auf Apoptose von Kardiomyozyten.....</b>	62
4.6.1	Durch Hypoxie/Reoxygenierung freigesetztes TGF $\beta$ induziert parakrin Apoptose in Kardiomyozyten .....	62
5	<b>Diskussion .....</b>	64
5.1	<b>Endothelzellen als Quelle der TGF<math>\beta</math>-Expression .....</b>	64
5.2	<b>Autokrine Aktivierung der SMADs.....</b>	64
5.3	<b>Induktion von GATA2 im Zusammenhang mit TGF<math>\beta</math>.....</b>	65
5.4	<b>Induktion von mikroRNA21 und 24.....</b>	66
5.5	<b>Parakrine Wirkung in Kardiomyozyten .....</b>	68
5.6	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	70
6	<b>Zusammenfassung .....</b>	72
7	<b>Summary .....</b>	74
8	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	75
9	<b>Danksagung .....</b>	89