

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 HERZINSUFFIZIENZ | 1 |
| 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND BEGRIFFSKLÄRUNG | 1 |
| 1.1.2 ENTSTEHUNG DER HERZINSUFFIZIENZ | 1 |
| 1.1.3 CHRONISCHE HERZINSUFFIZIENZ - EINE PROGREDIENTE ERKRANKUNG | 2 |
| 1.1.4 VERLAUF DER HERZINSUFFIZIENZ | 3 |
| 1.2 APOTOSE | 6 |
| 1.2.1 DER ABLAUF DER APOTOSE | 7 |
| 1.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR - BETA (TGF-β) | 9 |
| 1.3.1 TGF-β SIGNALWEG | 10 |
| 1.3.2 TGF-β UND APOTOSE | 15 |
| 1.4 STICKSTOFFMONOXID (NO) | 16 |
| 1.4.1 STICKSTOFFMONOXIDSYNTHASE (NOS) | 17 |
| 1.4.2 L-ARGININ UND ARGINASE | 18 |
| 1.4.3 STICKSTOFFMONOXID (NO) UND KONTRAKTILITÄT | 19 |
| 1.4.4 STICKSTOFFMONOXID (NO) UND APOTOSE | 21 |
| 1.4.5 STICKSTOFFMONOXID (NO) UND HERZINSUFFIZIENZ | 21 |
| 1.5 DIE FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT | 23 |
| 2. MATERIAL | 25 |
| 2.1 VERSUCHSTIERE | 25 |
| 2.2 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND ENZYME | 25 |
| 2.3 PRIMER FÜR RT-PCR UND REAL-TIME QUANTITATIVE PCR | 28 |
| 2.4 ANTIKÖRPER | 30 |
| 2.5 GERÄTE UND LABORBEDARF | 31 |
| 2.5.1 SPEZIELLE GERÄTE UND GEBRAUCHSGEGENSTÄNDE | 31 |
| 2.5.2 RT-PCR UND REAL-TIME-RT QUANTITATIVE PCR | 31 |
| 2.5.3 WESTERN BLOT | 31 |
| 2.5.4 KARDIOMYOZYTEN-PRÄPARATION | 32 |
| 2.5.5 SONSTIGE GERÄTE | 32 |
| 2.5.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 33 |
| 2.5.7 SOFTWARE | 33 |
| 3. METHODEN | 34 |
| 3.1 GENOTYPISIERUNG MITTELS SCHWANZBIOPSIE BEI DER MAUS | 34 |
| 3.1.1 EINFÜHRUNG IN DIE METHODE DER PCR | 35 |
| 3.1.2 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION | 35 |
| 3.2 ISOLIERUNG VON GESAMTHERZEN | 38 |
| 3.2.1 PRÄPARATION ZUR GEWINNUNG VON GESAMTHERZEN | 38 |
| 3.3 RT-POLYMERASE KETTEN REAKTION (RT-PCR) UND REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR | 38 |
| 3.3.1 RNA-ISOLIERUNG AUS GESAMTHERZEN FÜR REAL-TIME QUANTITATIVE RT PCR UND RT-PCR | 38 |
| 3.3.2 DNASE-BEHANDLUNG | 39 |
| 3.3.3 BESTIMMUNG DER RNA-Konzentration | 40 |
| 3.3.4 cDNA-SYNTHESE (REVERSE TRANSKRIPTION) | 40 |
| 3.3.5 REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR | 42 |
| 3.3.6 AUSWERTUNG DER PCR | 47 |
| 3.4 SDS GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN ZUR AUFTRENNUNG VON PROTEINEN | 48 |
| 3.4.1 AUFBEREITUNG DER HERZEN IN RIPA-PUFFER | 48 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.2 | SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE | 48 |
| 3.4.3 | DURCHFÜHRUNG DER GELELEKTROPHORESE | 49 |
| 3.4.4 | WESTERN BLOT | 55 |
| 3.4.5 | IMMUNFÄRBUng | 57 |
| 3.5 | EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY) | 62 |
| 3.5.1 | EINFÜHRUNG IN DIE METHODE | 62 |
| 3.5.2 | KERNEXTRAKTION BEI MÄUSEHERZEN | 62 |
| 3.5.3 | FLUORESENZMARKIERUNG DER OLIGONUKLEOTIDE | 64 |
| 3.5.4 | DURCHFÜHRUNG DES EMSAs IM NATIVEN GEL | 65 |
| 3.5.5 | AUSWERTUNG DES EMSAS | 67 |
| 3.6 | PRÄPARATION ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN | 68 |
| 3.6.1 | PROBENVORBEREITUNG | 73 |
| 3.7 | MESSUNG VON MYOKARDZELLKONTRAKTIONEN IM ELEKTRISCHEN FELD | 75 |
| 3.7.1 | ELEKTRISCHE STIMULATION UND STEUERUNG DER MYOKARDZELLKONTRAKTION | 75 |
| 3.7.2 | MESSUNG DER KONTRAKTIONSPARAMETER | 76 |
| 3.7.3 | MESSPROTOKOLL | 78 |
| 3.8 | APOPTOSENACHWEIS | 78 |
| 3.8.1 | CASPASE-3/7 ASSAY | 78 |
| 3.8.2 | DURCHFÜHRUNG DER METHODE | 78 |
| 3.8.3 | BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS | 79 |
| 3.8.4 | DURCHFÜHRUNG DER PROTEINGEHALTSBESTIMMUNG NACH BRADFORD | 80 |
| 3.9 | STATISTIK | 80 |
| 4. | ERGEBNISSE | 81 |
| 4.1 | GENOTYPISIERUNG DER VERSUCHSTIERE | 81 |
| 4.1.1 | EXPRESSIONSANALYSE DER TGINOS-HERZEN | 82 |
| 4.2 | FUNKTIONSANALYSEN ISOLIERTER ADULTER KARDIOMYOZYTEN | 85 |
| 4.2.1 | MYOKARDZELLKONTRAKTIONEN IM ELEKTRISCHEN FELD | 85 |
| 4.2.2 | KONTRAKTIONSPARAMETER UNTER L-ARGININ-GABE BEI STIMULATION MIT 1Hz | 86 |
| 4.2.3 | KONTRAKTIONSPARAMETER UNTER L-ARGININ-GABE BEI STIMULATION MIT 2Hz | 88 |
| 4.3 | VERRINGERTE β -ADRENERGE STIMULIERBARKEIT | 90 |
| 4.3.1 | KONTRAKTIONSPARAMETER NACH β -ADRENERGER STIMULATION 1Hz | 91 |
| 4.3.2 | KONTRAKTIONSPARAMETER NACH β -ADRENERGER STIMULATION 2Hz | 93 |
| 4.4 | KONTRAKTILITÄT UND Ca^{2+} -HANDLING-PROTEINE | 94 |
| 4.4.1 | KEINE VERÄNDERUNGEN DER β -REZEPTOREN | 96 |
| 4.5 | STICKSTOFFMONOXID UND SMADS | 97 |
| 4.5.1 | SMAD-BINDUNGSAKTIVITÄT | 97 |
| 4.5.2 | KEINE AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AP-1 | 98 |
| 4.5.3 | VERÄNDERUNGEN DER SMAD-SIGNALKASKADE | 99 |
| 4.6 | SMADS UND TGF- β 1 IN TGINOS-HERZEN | 109 |
| 4.6.1 | TGF- β LEVEL SIGNIFIKANT VERRINGERT | 109 |
| 4.7 | FIBROSE IN TGINOS-HERZEN | 111 |
| 4.8 | HYPERTROPHIE IN TGINOS-HERZEN | 112 |
| 4.9 | NO UND APOPTOSE | 115 |
| 4.9.1 | KEINE ANZEICHEN FÜR APOPTOSE AUF BCL2/BAX-EBENE | 115 |
| 4.9.2 | KEINE TOLERANZ GEGEN ZUSÄTZLICHE GABE VON TGF- β | 118 |
| 4.10 | NO UND TGF- β | 119 |
| 4.10.1 | KONTRAKTIONSPARAMETER NACH TGF- β -INKUBATION 1Hz | 119 |
| 4.10.2 | KONTRAKTIONSPARAMETER NACH TGF- β -INKUBATION 2Hz | 121 |
| 4.10.3 | KONTRAKTIONSPARAMETER NACH TGF- β -INKUBATION 2Hz | 122 |

| | |
|---|------------|
| 5. DISKUSSION | 123 |
| 5.1 NOS-EXPRESSION | 123 |
| 5.2 KONTRAKTILITÄT ISOLIERTER ADULTER TGINOS-KARDIOMYOZYTEN | 124 |
| 5.3 ISOLIERTE, ADULTE TGINOS KARDIOMYOZYTEN UND ISOPRENAVIN | 127 |
| 5.4 KONTRAKTILITÄT UND Ca^{2+} -STOFFWECHSEL | 128 |
| 5.5 NO UND TGF- β | 129 |
| 5.6 NO, TGF- β UND SMADs | 130 |
| 5.7 NO, TGF- β UND KONTRAKTILITÄT | 132 |
| 5.8 NO, TGF- β UND APOTOSE | 134 |
| 6. CONCLUSIO UND AUSBLICK | 135 |
| 7. ZUSAMMENFASSUNG | 139 |
| 8. SUMMARY | 141 |
| 9. LITERATURVERZEICHNIS | 143 |
| 10. DANKSAGUNG | 169 |
| 11. TABELLARISCHER LEBENSLAUF | 171 |