

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	II
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 APOPTOSE	6
1.2.1 DER ABLAUF DER APOPTOSE	7
1.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR - BETA (TGF- β)	9
1.3.1 TGF- β SIGNALWEG	10
1.3.2 TGF- β UND APOPTOSE	15
1.4 STICKSTOFFMONOXID (NO)	16
1.4.1 STICKSTOFFMONOXIDSYNTHESE (NOS)	17
1.4.2 L-ARGININ UND ARGINASE	18
1.4.3 STICKSTOFFMONOXID (NO) UND KONTRAKTILITÄT	19
1.4.4 STICKSTOFFMONOXID (NO) UND APOPTOSE	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	FLUORESCENZMARKIERUNG 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 1 Hz	86
4.2.3	KONTRAKTIONSPARAMETER UNTER L-ARGININ-GABE BEI STIMULATION MIT 2 Hz	88
4.3	VERRINGERTE β -ADRENERGE STIMULIERBARKEIT	90
4.3.1	KONTRAKTIONSPARAMETER NACH β -ADRENERGER STIMULATION 1 Hz	91
4.3.2	KONTRAKTIONSPARAMETER NACH β -ADRENERGER STIMULATION 2 Hz	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 TRANSKRIPTIONSFAKTORS 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	KONTRAKTIONSVERSUCHE	119
4.10.2	KONTRAKTIONSPARAMETER NACH TGF- β -INKUBATION 1 Hz	121
4.10.3	KONTRAKTIONSPARAMETER NACH TGF- β -INKUBATION 2 Hz	122

5. DISKUSSION	123
5.1 NOS-EXPRESSION	123
5.2 KONTRAKTILITÄT ISOLIERTER ADULTER TGINOS-KARDIOMYOZYTEN	124
5.3 ISOLIERTE, ADULTE TGINOS KARDIOMYOZYTEN UND ISOPRENALIN	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 APOPTOSE	134
6. CONCLUSIO UND AUSBLICK	135
7. ZUSAMMENFASSUNG	139
8. SUMMARY	141
9. LITERATURVERZEICHNIS	143
10. DANKSAGUNG	169
11. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	171