

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	KARDIALE HYPERTROPHIE	3
2.1.1	Phänotypische Charakteristika der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie	3
2.1.2	Molekulare Charakteristika der kardialen Hypertrophie	4
2.1.3	Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie	5
2.1.4	Charakteristika des kardialen Remodeling	5
2.2	TIERMODELL DAHL SALZ-SENSITIVE RATTE	6
2.3	UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM.....	7
2.3.1	Protein-Markierung durch Ubiquitin	7
2.3.2	Das Proteasom und der Abbau ubiquitinierter Proteine	8
2.3.3	Aufgaben des Proteasoms	10
2.4	PROTEASOMINHIBITION	12
2.4.1	Selektive Proteasominhibitoren	12
2.4.2	Effekte der Proteasominhibition	13
2.4.3	Proteasominhibitor Bortezomib	16
2.5	FRAGESTELLUNG.....	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN	20
3.1.1	Zellkultur und –präparation	20
3.1.2	Zellstimulation (Hypertrophie-Induktion und Proteasominhibition)	22
3.1.3	Messung der proteasomalen Aktivität mit Hilfe fluorogener Substrate	22
3.1.3.1	Zell-Lyse	22
3.1.3.2	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) - Assay	23
3.1.3.3	Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität	24
3.1.4	Morphometrie	25
3.1.5	Relative mRNA-Expressionen von kardialen Hypertrophie-Markergen (ANP und α -MHC)	26
3.1.5.1	RNA-Isolation	26
3.1.5.2	cDNA-Synthese	28
3.1.5.3	Quantitative Real-Time-PCR	28
3.1.6	Zellviabilität	30
3.2	IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN	30
3.2.1	Versuchstiere	30
3.2.2	Tierhaltung	31
3.2.3	Tierfütterung	31
3.2.4	Bortezomib	31
3.2.5	Versuchsaufbau	32
3.2.6	Blutdruckmessung	33
3.2.7	Euthanasie der Versuchstiere und Blutentnahme	33
3.2.8	Entnahme von Herz und Aorta	34
3.2.9	Entnahme weiterer Organe und Gewebe	35

Inhaltsverzeichnis

3.2.10	Messung der proteasomalen Aktivität in PBMC, Leber, Niere und Herz mit Hilfe fluorogener Substrate	35
3.2.10.1	Lymphozytenisolierung	35
3.2.10.2	Zell-Lyse	36
3.2.10.3	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) - Assay	36
3.2.10.4	Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität	36
3.2.11	Bestimmung des relativen Herzgewichts	36
3.2.12	Histopathologische Untersuchung des Herzens	36
3.2.13	Morphometrische Untersuchung der Kardiomyozyten	37
3.2.14	Quantitative Analyse der kardialen Fibrose	37
3.2.15	Relative mRNA-Expression von kardialen Hypertrophie- und Fibrose-Markergen (β -MHC und Col IIIa1)	38
3.2.15.1	RNA-Isolation	38
3.2.15.2	cDNA-Synthese	38
3.2.15.3	Quantitative Real-Time-PCR	39
3.2.16	Untersuchung der Vasoreaktivität der isolierten Aorta descendens	39
3.2.17	Relative mRNA-Expressionen von eNOS, ET-1 und VCAM-1 in der Aorta	41
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITOR BORTEZOMIB AUF HYPERTROPHIERTE NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN	43
4.1.1	Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC	43
4.1.2	Der Proteasominhibitor reduzierte die Isoproterenol-induzierte Flächenzunahme von nRC	44
4.1.3	Die Supprimierung des hypertrophen Zellwachstums durch Bortezomib war mit einer verminderten Expression von kardialen Hypertrophie-Markergen assoziiert	46
4.1.4	Die partielle Inhibition des Proteasoms hatte keinen Einfluss auf die Viabilität von nRC	47
4.2	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITOR BORTEZOMIB AUF DIE HYPERTONIE-INDUZIERTE KARDIALE HYPERTROPHIE IN DER DAHL SALZ-SENSITIVEN RATTEN	48
4.2.1	Bortezomib reduzierte die Morbidität und Mortalität hypertensiver DSSR	49
4.2.2	Der Proteasominhibitor verhinderte die Körpergewichtsabnahme hypertensiver DSSR	51
4.2.3	Bortezomib verhinderte tendenziell die Erhöhung der relativen Organgewichte salzgefütterter DSSR	53
4.2.4	Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in PBMC und Organen tendenziell	54
4.2.5	Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Herz Dahl Salz- sensitiver Ratten	57
4.2.5.1	Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR	57
4.2.5.2	Die Herzen Bortezomib-behandelter DSSR waren histopathologisch unauffälliger	62
4.2.5.3	Das reduzierte Herzgewicht war mit einer tendenziell verringerten Kardiomyozyten- Querschnittsfläche assoziiert	62
4.2.5.4	Die Expression des kardialen Hypertrophie-Markergens β -MHC wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	64
4.2.5.5	Das reduzierte Herzgewicht war mit einem tendenziell reduzierten Kollagenanteil assoziiert	65

Inhaltsverzeichnis

4.2.5.6	Die Expression des kardialen Fibrose-Markergens Col IIIa1 wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	67
4.2.6	Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten	67
4.2.6.1	Bortezomib verringerte den arteriellen Blutdruck in hypertensiven DSSR	68
4.2.6.2	Der Proteasominhibitor verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell	69
4.2.6.3	Die Expression der eNOS in der Aorta wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	72
4.2.6.4	Der reduzierte arterielle Blutdruck Bortezomib-behandelter DSSR war mit einer tendenziell verringerten Expression von ET-1 in der Aorta assoziiert	73
4.2.6.5	Bortezomib reduzierte die Expression des inflammatorischen Markers VCAM-1 in der Aorta hypertensiver Ratten	74
4.2.7	Die Behandlung hypertensiver DSSR mit Bortezomib induzierte keine hämatologischen oder hämatopoetischen Nebenwirkungen	75
5	DISKUSSION	77
5.1	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF HYPERTROPHIERTE NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN	78
5.1.1	Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC ohne zytotoxische Nebeneffekte	78
5.1.2	Der Proteasominhibitor Bortezomib wirkte in nRC anti-hypertroph	79
5.2	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF DIE HYPERTONIE-INDUZIERTE KARDIALE HYPERTROPHIE IN DER DAHL SALZ-SENSITIVEN RATTE	80
5.2.1	Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in DSSR organspezifisch	80
5.2.2	Bortezomib wirkte in DSSR anti-hypertroph	82
5.2.2.1	Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR	82
5.2.2.2	Das Herzgewicht wurde trotz nicht signifikanter anti-fibrotischer und anti-hypertropher Effekte signifikant reduziert	85
5.2.2.3	Die Expressionen von Hypertrophie- und Fibrose-Markergen wurden durch Bortezomib nicht beeinflusst	87
5.2.2.4	Mögliche Mechanismen der anti-hypertrophen Wirkung einer Proteasominhibition	88
5.2.3	Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten	90
5.2.3.1	Der Proteasominhibitor wirkte in DSSR anti-hypertensiv	90
5.2.3.2	Bortezomib verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell	91
5.2.3.3	Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression der eNOS in den Aorten hypertensiver DSSR	94
5.2.3.4	Bortezomib reduzierte die Expression von ET-1 in der Aorta tendenziell	95
5.2.3.5	Anti-inflammatorische Effekte von Bortezomib in dem Gefäßsystem hypertensiver DSSR	96
5.2.4	Die kardiovaskuläre Protektion des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib in DSSR war mit einer reduzierten Morbidität und Mortalität assoziiert	97
5.3	EIGNUNG DES TIERMODELLS	98
5.4	EIGNUNG DES VERSUCHSREGIMES	99

Inhaltsverzeichnis

5.5	FAZIT DER IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN UND PERSPEKTIVE DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB FÜR DIE THERAPIE DER KARDIALEN HYPERTROPHIE.....	100
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7	SUMMARY.....	104
8	ANHANG	106
A	Abkürzungsverzeichnis	106
B	Literaturverzeichnis.....	108
C	Publikationsverzeichnis.....	125
D	Danksagung	126
E	Selbständigkeitserklärung.....	127