

Kontraktion und Kompensation iNOS überexprimierender Mausekardiomyozyten

Sebastian Bernhard Frederik Vittur

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Kontraktion und Kompensation iNOS- überexprimierender Mausekardiomyozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs
Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

Sebastian Bernhard Frederik Vittur

Zahnarzt aus Korbach

Gießen 2013

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT
GIEßEN

Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

Gutachterin: Prof. Dr. G. Euler
Gutachterin: Prof. Dr. D. Nolte

Tag der Disputation:

02.07.2013

Meinen Eltern Eckard und Helene

Meinem Bruder Matthias

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 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 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 1HZ	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 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 LEBENSLAUF	171

Abkürzungsverzeichnis:

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
AngII	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumpersulfat
a.b. (Aqua bidest.)	zweifach destilliertes Wasser
Bax	<i>Bcl-2</i> -associated X-Protein
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
BNP	Brain natriuretic Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary Desoxyribonukleinacid
cm ²	Quadratzenimeter
Ct-Wert	Cycle Threshold (Schwellenwert Zyklus)

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESC	European Society of Cardiology
EtOH	Ethanol
fw-Primer	forward Primer
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyl-transferase
HW/BW	Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (heart weight / body weight)

ICD10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems; <u>10</u> Revision Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl_2	Magnesiumchlorid
Mg_2SO_4	Magnesiumsulfat
β -MHC	beta-myosin heavy chain
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

MW	Molekulargewicht (molecular weight)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl der Tiere/ Bei Kontraktilitätsmessungen Anzahl der Kardiomyozyten
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
ODC	Ornithin-Decarboxylase
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR®	Polymerase Kettenreaktion
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionenkonzentration
PLB	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
%	Prozent

rev Primer	reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rcf	Relative Centrifugal Force, Relative Zentrifugalbeschleunigung
RT	reverse Transkriptase
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Serca 2A	Sarkoplasmatische- & endoplasmatische-Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SMAD	small mothers against decapentaglegic
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TG	Transgen
TGF-β	Transforming growth factor-β
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
VI	

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
V	Volt
vol/vol	Volume/Volume
wt/vol	Weight/Volume
wt	Weight
WT	Wildtyp
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Epidemiologie und Begriffsklärung

Herz-Kreislaufkrankungen nehmen in Industrieländern einen herausragenden Stellenwert im Bereich der medizinischen Therapie ein. Circa 56% der zehn häufigsten Todesursachen nach ICD10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems; 10 Revision) sind eine direkte Folge von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Hierzu zählen: hypertensive Herzkrankheit (2,3%), akuter Myokardinfarkt (6,6%), chronisch ischämische Herzkrankheit (8,6%) und die Herzinsuffizienz (5,7%) (Statistisches Bundesamt, 2008). Im Jahr 2006 war die Herzinsuffizienz der häufigste Grund für eine stationäre Behandlung in deutschen Krankenhäusern (Statistisches Bundesamt, 2008). Die Verteilung der Herzinsuffizienz Männer zu Frauen liegt bei 60:40 (Böhm, 2000). Das Durchschnittsalter für diese Erkrankung liegt in Deutschland bei 75 Jahren.

Bei einer Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu versorgen (Bundesärztekammer (BÄK), 2010). Eine erweiterte Definition bezieht u. a. die Stimulation des sympathischen Nervensystems mit ein, mit der der Organismus die Dysfunktionen der Herz- und Skelettmuskulatur, sowie der Nierenfunktion zu kompensieren versucht (Jackson et al., 2000).

1.1.2 Entstehung der Herzinsuffizienz

Ursächlich für eine Insuffizienz ist entweder eine verringerte Füllung der Ventrikel, eine verringerte Entleerung der Ventrikel oder eine Kombination daraus.

Die Ursachen hierfür können sich multifaktoriell aus unterschiedlichen Bestandteilen des Ablaufs der physiologischen Herztätigkeit und der hormonellen und neuronalen Regulation des Herzkreislauf-Systems zusammensetzen. Zu nennen sind hier Myokardschäden durch Infarkt oder Minderdurchblutung des Myokards (Koronarinsuffizienz, koronare Herzkrankheit [KHK]),

Herzklappendefekte (Stenosen /Insuffizienzen), sowie Reizleitungs- oder Reizbildungsstörungen. In circa 90% der Fälle liegt die Ursache in einer Arteriosklerose der Koronargefäße (koronare Herzkrankheit [KHK]) oder einer arteriellen Hypertonie. Gleichsam können die Regulationsmechanismen des Herz-Kreislauf-Systems eine gegenseitige Kompensation hervorrufen. Kliniker unterscheiden danach eine kompensierte von einer dekompensierten Herzinsuffizienz (Remme et al., 2001). Je nach dem zeitlichen Auftreten und der Dauer der Symptome werden Herzinsuffizienzen unterteilt in „new onset“ (neu aufgetretene Herzinsuffizienz), „transient“ (nur kurz andauernde Herzinsuffizienz) und eine „chronic“ (andauernde Herzinsuffizienz) (ESC Clinical Practice Guidelines, 2008). Die zentrale Bedeutung des Herzens für den Gesamtorganismus zeigt sich im Fall einer Dysfunktion in einer Beeinträchtigung anderer Organsysteme.

1.1.3 Chronische Herzinsuffizienz - eine progrediente Erkrankung

Der Organismus reagiert auf Veränderungen des homöostatischen Gleichgewichts mit einer Gegenregulation. Bei einer chronischen Herzinsuffizienz kommt es allerdings zu einem circulus vitiosus (Abbildung 1.1). Die Symptome erhalten sich nicht nur selbst, sondern es folgt sogar eine Progression der Erkrankung.

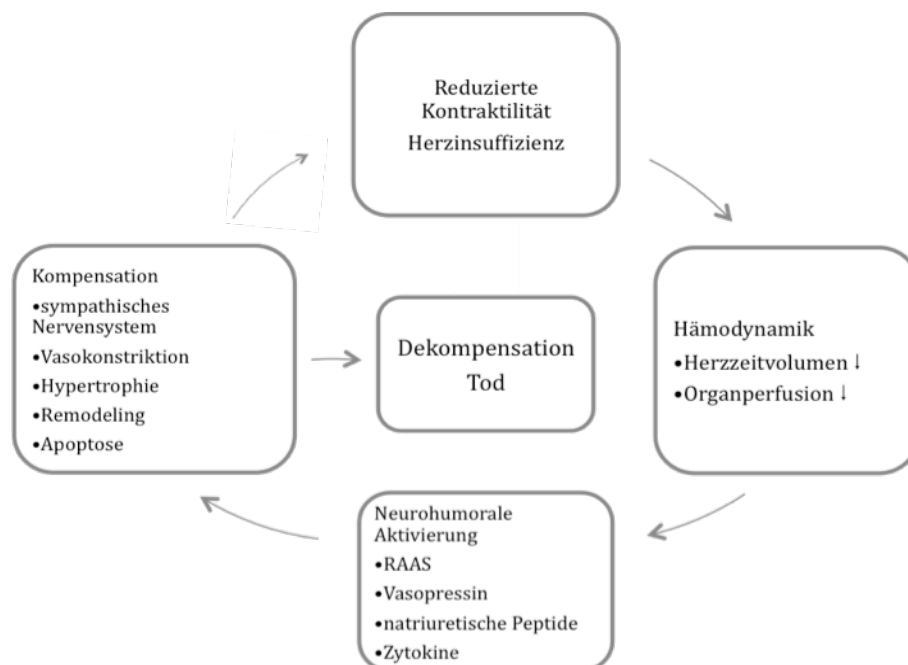


Abb. 1.1 Der circulus vitiosus der Herzinsuffizienz
Abbildung verändert nach Dickstein et al. (2008).

Ein erniedrigtes Herz-Zeit-Volumen (HZV) führt zu einer verminderten Organperfusion. Eine kurzfristige Gegenregulation findet über eine Erhöhung des Sympathikotonus statt. Als Folge erhöht sich die Herzfrequenz. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird aktiviert und führt über verringerte Wasserausscheidung und Erhöhung des Durstgefühls zu einer Volumenzunahme des Blutes. Die physiologische Funktion des RAAS liegt u.a. im Ausgleich von Volumenmangel-Situationen. Der durch ein verringertes Blutvolumen resultierende Blutdruckabfall wird so adäquat ausgeglichen. Im Falle der Herzinsuffizienz ist der Blutdruckabfall allerdings in der verringerten Leistungsfähigkeit des Herzens und nicht in einem Volumenmangel begründet. Die zusätzliche Erhöhung des Blutvolumens bei einem insuffizienten Herzen ist somit eine denkbar ungünstige Konstellation. In Folge des erhöhten Blutvolumens nimmt das enddiastolische Füllungsvolumen der Ventrikel zu. Man spricht von einer gesteigerten Vorlast.

Durch erhöhte Freisetzung von Angiotensin II (AngII) erfolgt u.a. eine Vasokonstriktion, wodurch der arterielle Widerstand steigt. Der Gesamtwiderstand, gegen den das Herz das Blut während der Systole auswirft, die sogenannte Nachlast, steigt an. Der im Zuge der RAAS-Aktivierung freigesetzte Vasokonstriktor Endothelin, wie auch das fibrinogen wirkende Zytokin CTGF (connective tissue growth factor) (Gupta et al., 2000), unterstützen die aufgeführten Pathomechanismen weiter. Des Weiteren führt AngII zur Expression, sowie zur Aktivierung von TGF- β . Als Folge kommt es zu Hypertrophie des Myokards, myokardialen Umbauprozessen mit verstärkter Fibrosierung, einem Anstieg des programmierten Zelltods, der Apoptose (Narula et. al., 1996), Dilatation der Ventrikel und letztendlich zur terminalen Herzinsuffizienz.

1.1.4 Verlauf der Herzinsuffizienz

1.1.4.1 Hypertrophie, Apoptose und kardiales Remodeling

Trotz einer anfänglichen Funktionsverbesserung des Herzens, gilt die Hypertrophie von Herzmuskelzellen seit langem als Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Levy et al., 2002). Am Anfang einer sich entwickelnden Herzhypertrophie sind meist eine Aktivierung des RAAS mit erhöhtem oxidativen

Stress, eine erhöhte Stimulation des Sympathikus, sowie eine gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren feststellbar. Die Aktivierung dieser Faktoren führt zu strukturellen Umbauprozessen im Herzen, dem sogenannten Remodeling. Mit dem Begriff des kardialen Remodeling werden die komplexen zellulären und molekularen Vorgänge, welche zu progredienter myokardialer Dysfunktion führen, zusammengefasst (Rickenbacher, 2001). Für das kardiale Remodeling sind insbesondere AngII und TGF- β_1 wichtig. In seinem Review führt Rosenkranz (2004) aus, dass beide Moleküle nicht getrennt voneinander, sondern vielmehr als Teile eines gemeinsamen Signalnetzwerks zu betrachten sind. Das wird durch die im Folgenden aufgeführten Arbeiten gezeigt.

Schnee & Hsueh (2000) und Yamazaki et al. (1999) zeigten in ihren Untersuchungen an kardialen Fibroblasten der Ratte, dass das RAAS als Folge einer hämodynamischen Überladung aktiviert wird und zu myokardialer Hypertrophie, Fibrose und Insuffizienz führt. Im Einklang dazu stehen die Ergebnisse der Versuche von Kim et al. (2001), sowie Nakamura et al. (2003), die positive Effekte durch die kombinierte Gabe von ACE-Hemmern und AngII-Rezeptor-Blockern auf das Remodeling, die Herzfunktion und die Mortalität in Versuchen an Ratten mit Herzinsuffizienz (Kim et al., 2001) bzw. an Ratten im Post-Infarkt-Versuch (Nakamura et al., 2003) zeigten. Zou et al. (1998) vermuteten, dass das Effektor-Molekül des RAAS, AngII, zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege in Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten führe, was mit einer unterschiedlichen Genregulation in den beiden Zelltypen einhergehen würde. Bolyut et al. (1994) zeigten anhand von invitro-Versuchen eine gesteigerte TGF- β_1 -Expression im hypertrophierten Myokard, beim Übergang der stabilen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz. Wenzel et al. (2001a) zeigten die funktionelle Verbindung zwischen AngII und TGF- β_1 über eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase und erhöhter AP-1-Bindungsaktivität in ventrikulären Kardiomyozyten. Dabei wiesen sie sowohl eine Hochregulation der TGF- β_1 -mRNA, sowie des Proteins durch erhöhte AngII-Spiegel nach. Zudem zeigten sie, dass ein chronisch erhöhter AngII-Spiegel die TGF- β_1 -Expression ohne blutdruckveränderte Wirkung steigert. Schultz et al. (2002) zeigten an TGF- β_1 -knock-out-Mäusen erstmals, dass AngII ohne die gleichzeitige Anwesenheit von

TGF- β_1 nicht zu Hypertrophie und Fibrose Hypertrophie führt. Massague (1998), beschreibt einen Signalweg von AngII zu TGF- β_1 über die TGF- β -Rezeptoren 1 und 2 (T β R1, T β R2), der in den meisten Geweben von Säugetieren vorkommt. TGF- β , sowie T β R1, T β R2 sind in Kardiomyozyten und in Kardiofibroblasten nachweisbar (Brand et al., 1995). Moustakas (2001) beschrieb die Signalweitergabe des TGF- β_1 -Weges über die SMAD-Kaskade. Dabei kommt es zur Phosphorylierung von SMADs durch die TGF- β -Rezeptoren (T β R1 und T β R2) und zu ihrer Translokation in den Zellkern, in welchem die SMADs als Transkriptionsfaktoren wirken. Hao et al. (2000) zeigten, in Ratten, dass es nach Infarkt zu einer AngII-abhängigen TGF- β -Erhöhung in Herzen kommt, die SMADs aktiviert und im Zusammenhang mit einer Fibrosierung steht. In vitro konnten sie gleiche Mechanismen in Fibroblasten nachweisen. Schlüter et al. (1995) zeigten in Versuchen an Kardiomyozyten der adulten Ratte eine TGF- β -abhängige Induktion der hypertrophen Ansprechbarkeit auf Isoproterenol. In späteren Versuchen stellten sie die zentrale Rolle der Ornithin-Dekarboxylase (ODC) für die β -Adrenozeptor-vermittelte Hypertrophie heraus (Schlüter et al., 2000). Dabei führt AngII über Aktivierung des Angiotensin Type II Receptor Subtyp 1 (AT1) in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zu einer gesteigerten TGF- β Expression (siehe Abb. 1.2). Schröder et al. zeigten (2006), dass AngII über p38 MAP-Kinase, GATA und AP-1 TGF- β_1 in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte stimuliert. Das aus Kardiomyozyten freigesetzte TGF- β_1 vermittelt dann autokrin Apoptose über SMADs. Interessanterweise wird unter TGF- β die NO-Synthese im Herz gesteigert. Heger et al. (2011) zeigten in adulten Kardiomyozyten der Ratte eine NO-Freisetzung unter TGF- β_1 , sowie eine Hemmung der NO-Freisetzung durch Gabe des NOS-Inhibitors ETU. Diese NO-Freisetzung ist in den pro-apoptotischen TGF- β -Signalweg im Herz integriert. Es gibt also verschiedenste Beweise für eine Induktion von TGF- β durch AngII im Herzen. TGF- β selbst kann dort apoptotisch, hypertroph und auch fibrotisch wirken und somit zum kardialen Remodeling und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen (Abb. 1.2).

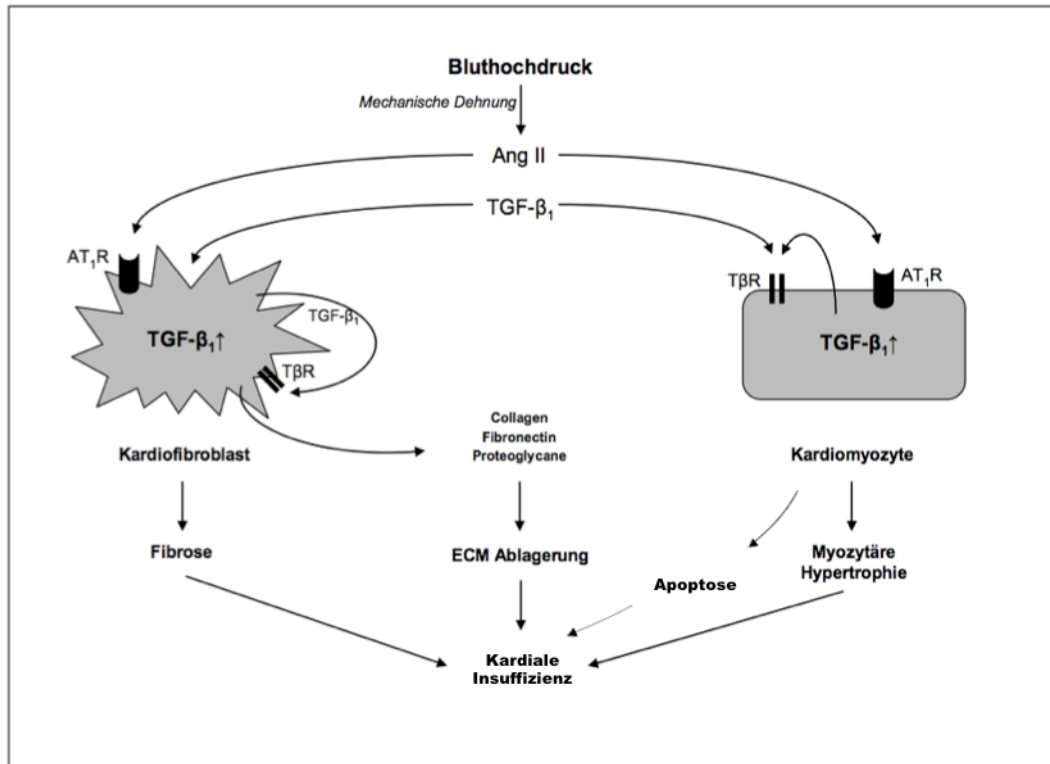


Abb. 1.2 Darstellung der Wechselwirkung von Angiotensin II und TGF-β auf Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten (Forst, 2009; verändert).

1.2 Apoptose

Der Begriff "Apoptose" stammt aus dem Griechischen („απο“gr. - von, aus, ab; „ρτοσις“gr.- Senkung). Er bezeichnete in der Biologie das Abfallen welcher Blätter von Laubbäumen. 1980 wurde er durch Wyllie et al. als feststehender Begriff für den programmierten Zelltod etabliert. Im Gegensatz zur Nekrose muss die Apoptose als kontrollierte, aktive Leistung der Zelle betrachtet werden. Die Induktion der Apoptose kann durch verschiedene intra- und extrazelluläre Stimuli erfolgen. Neben den extrazellulären Faktoren wie Strahlung, Toxine und virale Infektion, kann die Apoptose durch einen erhöhten Sympathikotonus, das RAAS, Ischämie und verschiedene Zytokine ausgelöst werden. Schneiders et al. konnten (2005) zeigen, dass das Zytokin TGF-β₁ in ventrikulären Kardiomyozyten Apoptose auslöst. Taimor et al. (2000) zeigten zudem, dass NO cGMP-abhängig direkt zur Apoptose in Kardiomyozyten führen kann.

1.2.1 Der Ablauf der Apoptose

Nach dem auslösenden Stimulus der Apoptoseinduktion unterscheidet man einen extrinsischen von einem intrinsischen Signalweg (siehe Abb. 1.3). Beide Signalwege besitzen dieselbe Endstrecke – die sog. Caspasen-Kaskade (Srivastava et al., 1998). Caspasen bilden eine Gruppe von Proteinen, die wesentlich an dem Ablauf apoptotischer Prozesse beteiligt sind. Es sind Enzyme, die zur Gruppe der Cystein-Proteasen gehören. Sie befinden sich zum überwiegenden Teil in Mitochondrien und stellen inaktivierte Pro-Formen von Zymogenen dar. Zymogene (auch Proenzyme genannt) werden selbst durch Proteolyse aktiviert. Somit kann die Aktivierung einer ersten Caspase eine Reaktionskaskade sich nachfolgend aktivierender Caspasen auslösen (Böcker et al., 2008).

Der extrinsische Apoptose-Weg wird durch Liganden vermittelt, die an der Außenseite von in der Zellmembran gelegenen Rezeptoren binden. In Kardiomyozyten ist ein solcher Ligand beispielsweise Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), der an den TNFR1 (Tumor Nekrose Faktor- α Rezeptor 1) bindet. Dieser aktiviert über ein Adapterprotein (TRADD - Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) die Caspase 8. Ebenfalls in Kardiomyozyten nachgewiesen ist FasL (Fas-Ligand). Dieser bindet an den Fas-Rezeptor und aktiviert über das Adapterprotein (FADD - Fas-Associated protein with Death Domain) Caspase 8 (Swanton et al., 1999) (Abb. 1.3). Diese Initiator-Caspase aktiviert dann wiederum weitere Effektor-Caspasen, die den programmierten Zelltod ausführen.

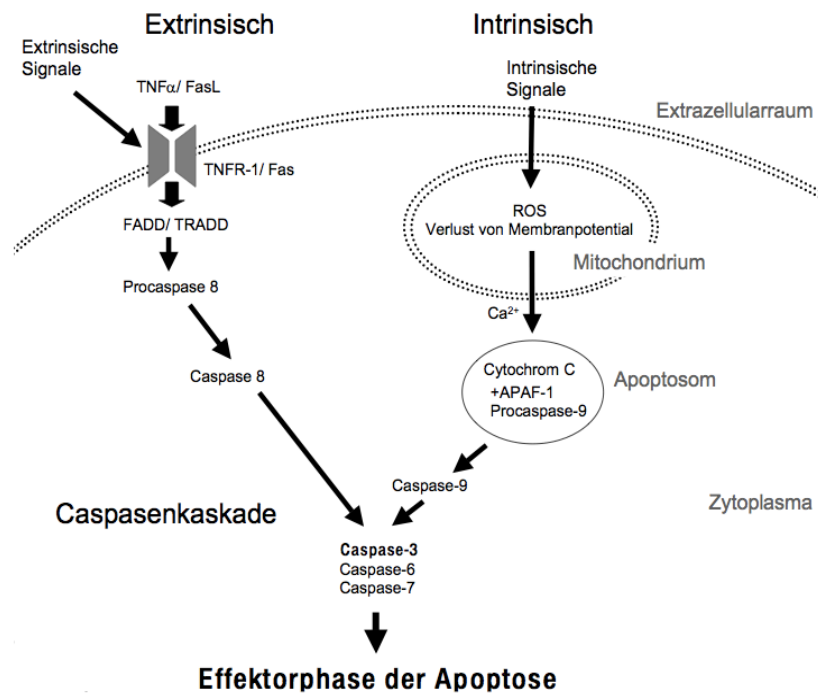


Abb. 1.3 Darstellung des Ablaufs der Signalkaskade der Apoptose (Partsch, 2009)

Der intrinsische Weg ist wesentlich durch Substanzen innerhalb der Mitochondrien bestimmt und wird daher auch mitochondrialer Weg genannt. Die Freisetzung dieser Substanzen ins Zytosol erfolgt bei Schädigung der Mitochondrienmembran. Z.B. unter Hypoxie oder durch Strahlung kann die Mitochondrienmembran geschädigt werden. Das Protein Cytochrom C wird aus den Mitochondrien freigesetzt und komplexiert mit Procaspase 9 und dem Cofaktor APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1). Durch die Anwesenheit von ATP kommt es dann zur Aktivierung von Caspase 9 und zur Bildung des sog. Apoptosoms (Bishopric et al., 2001). Auch hier kommt es dann zur Aktivierung sog. Effektor-Caspasen. Somit ist die gemeinsame Endstrecke beider Aktivierungswege die sog. Caspasekaskade.

Während der Effektorphase behält die apoptotische Zelle weiterhin ihre Integrität. Gleichwohl verändert sie aktiv ihre Zellmembran derart, dass sie durch das Immunsystem als nicht körpereigen erkannt wird. Dies erreicht die Zelle im Wesentlichen durch Translokation des Zellmembranbestandteils Phosphatidylserin (PS) von der Membraninnenseite zur Membranaußenseite.

Somit schafft die Zelle die Voraussetzung durch Makrophagen phagozytiert zu werden.

Mikroskopisch sichtbare, morphologische Veränderungen der apoptotischen Zelle sind die Schrumpfung der Zelle und eine Chromatinkondensation. Die DNA wird durch Endonukleasen fragmentiert (Kerr et al., 1972), wobei Fragmente relativ einheitlicher Größe entstehen, da Endonukleasen die internukleosomale DNA in Abschnitte von entsprechend 180-200bp Länge zerschneiden. Zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen eignet sich dieser spezifische Vorgang der DNA-Fragmentierung als effiziente Nachweismethode. Die ca. 200bp großen DNA-Fragmente lassen sich in einem DNA-Gel als DNA-Leitern nachweisen.

Im weiteren Verlauf der Apoptose entstehen sog. apoptotic bodies (Ellis et al., 1991). Diese sind Abschnürungen degradierter Zellkomponenten. Durch Freisetzung von K^+ in den Intrazellularraum kommt es zur Kontraktion des Zytoskeletts, was die Phagozytose durch die Makrophagen erleichtert.

Diese Vorgänge führen insgesamt zum Untergang der Zelle, bei einer geringeren Belastung der Nachbarzellen und des Gesamtorganismus, als dies bei nekrotischem Zelluntergang der Fall wäre. Die Apoptose läuft ohne Anzeichen einer Entzündungsreaktion ab (Kerr et al., 1972). Damit unterscheidet sich die Apoptose wesentlich vom nekrotischen Zelluntergang.

1.3 Transforming growth factor - beta (TGF- β)

Der Transforming growth factor ist ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, sowie der Zelldifferenzierung spielt. Zur TGF- β -Superfamilie gehören die verschiedenen Isoformen des TGF- β , Activin/Inhibin, sowie die BMPs (Bone morphogenic proteins). Annähernd alle Zellen des Körpers, einschließlich Epithel-, Endothel- und Bindegewebszellen, sowie hämatopoetische und neuronale Zellen, produzieren TGF- β und besitzen TGF- β -sensitive Rezeptoren (Lim, 2006). TGF- β nimmt eine Schlüsselrolle in wichtigen biologischen Prozessen, wie Zellwachstum, Differenzierung und Entwicklung, sowie Reparatur und Apoptose ein (Wells, 2000; Grande, 1997; Cheng und Grande, 2002; Massague, 1998 ; Herpin et al., 2004; Elliott und Blobel, 2005).

1.3.1 TGF- β Signalweg

1.3.1.1 SMAD-Proteine - Signalmoleküle des TGF- β

TGF- β kann seine Wirkung über den TGF- β -Rezeptor, einem Dimer aus TGF- β -Rezeptor II und TGF- β -Rezeptor I, an Kardiomyozyten, aber auch an Endothelzellen und Fibroblasten vermitteln. In der Folge wird der sog. SMAD-Signalweg angestoßen.

Der Name dieser Proteine, sowie der sie kodierenden Gene ist die Zusammensetzung der Namen zweier weiterer Gene. Dem *SMA* und dem *MAD*. *SMA* (Small body size) ist der Name eines in *C. elegans* identifizierten Gens; *MAD* (mothers against decapentaplegia) ist der Name eines Gens, das in *Drosophila* entdeckt wurde.

Es sind acht verschiedene SMAD Proteine beschrieben, die sich nach ihrer Funktion in drei Gruppen gliedern lassen: Die R-SMADs sind rezeptorgesteuerte SMADs. Ihnen ist gemeinsam, dass sie durch Phosphorylierung aktiviert werden. Zu ihnen zählen SMAD 1,5,8 und SMAD 2 und 3 (Heldin et al., 1997). TGF- β -Rezeptoren sind transmembranäre Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Die Bindung von TGF- β an den TGF- β -Rezeptor II führt zur Phosphorylierung des TGF- β -Rezeptor I (Shi et Massague, 2003) und damit zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3.

Als Co-SMAD oder Common-SMAD wird das SMAD4 bezeichnet. Es bildet einen Komplex mit zwei R-SMADs, also mit pSMAD 2,3 oder pSMAD 1,5,8. Dieser Gesamtkomplex transloziert in den Zellkern, wo er die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren kann. SMAD 4 wird nicht phosphoryliert.

Die I-SMADs (SMAD6 und 7) sind inhibitorisch wirkende SMADs. Ihre Expressionshöhe steigt mit dem Aufkommen an Wachstumshormonen, wie beispielsweise TGF- β . Als Teil der TGF- β /SMAD-Signalkaskade (siehe Abb. 1.5) dienen sie einer negativen Rückkopplung. I-SMADs interagieren mit dem aktivierten TGF- β -Rezeptor I und verhindern damit die Phosphorylierung der R-SMADs. Während SMAD7 mit SMAD4 kompetitiv um die Bindung an den pSMAD2/pSMAD3-Komplex konkurriert und sowohl die TGF- β , Aktivin oder BMP

ausgelösten Signale negativ reguliert, hemmt SMAD6 vorwiegend die Signale der BMPs, die über die SMADs 1/5/8 vermittelt werden (Hayashi et al. 2005, Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997).

SMAD-Proteine bestehen aus zirka 500 Aminosäuren. Sie besitzen zwei evolutionär konservierte Regionen, MH1 und MH2 (MAD-Homology 1 und 2), die über eine Linker-Region miteinander verbunden sind (Jessa et al., 2000). An ihrem N-terminalen Ende befindet sich die MH1-Domäne, an ihrem C-terminalen Ende die MH2-Domäne (Abbildung 1.4). Die MH1-Domäne der I-SMADs variiert sehr stark. Die MH2-Domänen aller SMADs weist hingegen starke Ähnlichkeiten auf (Heldin et al., 1997). Im Zellkern kann die MH1-Domäne des SMAD4 die Genexpression von Zielgenen durch Promotorbindung vermitteln. Andererseits können die R-SMADs mit ihren MH2-Domänen andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκB, AP1, GATA binden und damit die Bindungsspezifität der SMADs und somit auch die Expression bestimmter Zielgene beeinflussen.

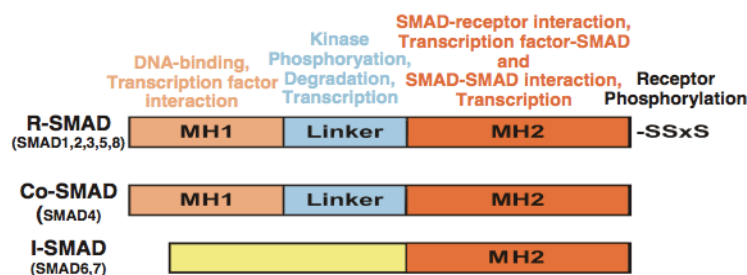


Abb.1.4 Die drei Unterfamilien der SMAD-Proteine (Taimor-Euler & Heger, 2006).

Die nachstehende Abbildung (Abb. 1.5) zeigt die Signalvermittlung des TGF-β-Signals über SMAD-Proteine bis zu den Zielgenen in der Zelle.

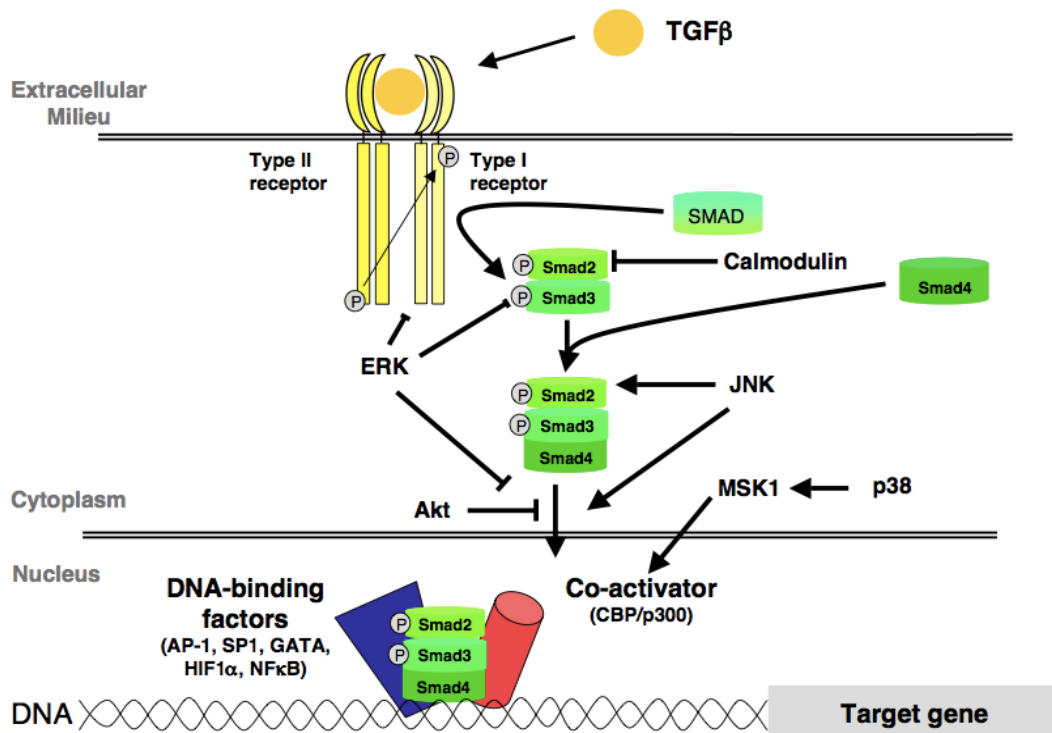


Abb.1.5 Der TGF- β Signalweg: TGF- β bindet an Typ I und Typ II Rezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung von SMAD 2 und 3 und initiiert die Bindung des Co-SMADs 4. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Transkription von Zielgenen. Calmodulin, Akt oder ERK können die SMAD-Aktivität inhibieren, während p38 und JNK diese aktivieren können. Im Zellkern wird die SMAD-Bindungsaktivität zu verschiedenen Promotorelementen durch Interaktion des SMAD-Komplexes mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren oder dem Co-Aktivator CBP/p300 moduliert. (Taimor-Euler & Heger, 2006)

1.3.1.2 TGF- β und Hypertrophie

TGF- β wird beim Übergang einer kompensierten in eine dekomensierte Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert. Wenzel et al. zeigten (2001b), dass die myokardiale Expression des TGF- β dabei durch Angiotensin II induziert wird. Schlüter et al. (1995), sowie Goldberg et al. (2002) und Dimmeler et al. (1997) zeigten, dass TGF- β die hypertrophe Ansprechbarkeit für β -adrenerge Stimulation am Übergang einer kompensierten in eine dekomensierte Herzinsuffizienz erhöht. Dabei bewirkt TGF- β Veränderungen in der postrezeptoriellen Signaltransduktion β -adrenerger Rezeptoren in ventrikulären Kardiomyozyten (Schlüter et al., 2000). Schlüter et al. (2000) zeigten erstmals, die zentrale Bedeutung der ODC- (Ornithin Decarboxylase-) Induktion für die β -adrenerge Hypertrophiestimulation in Kardiomyozyten. Sie konnten nachweisen, dass TGF- β die hypertrophe Ansprechbarkeit der β -Adrenozeptoren über die Induktion der

ODC stimuliert. Die an Kardiomyozyten eingesetzte TGF- β -Konzentration war dabei mit der in vivo auftretenden Zunahme der kardialen TGF- β -Expression, wie sie beim Übergang einer kompensierten in eine dekompenzierte Herzinsuffizienz stattfindet, vergleichbar (Abb. 1.6). Diese erhöhte hypertrophe Ansprechbarkeit konnten sie auch an kultivierten Kardiomyozyten TGF- β -überexprimierender Mäuse nachweisen.

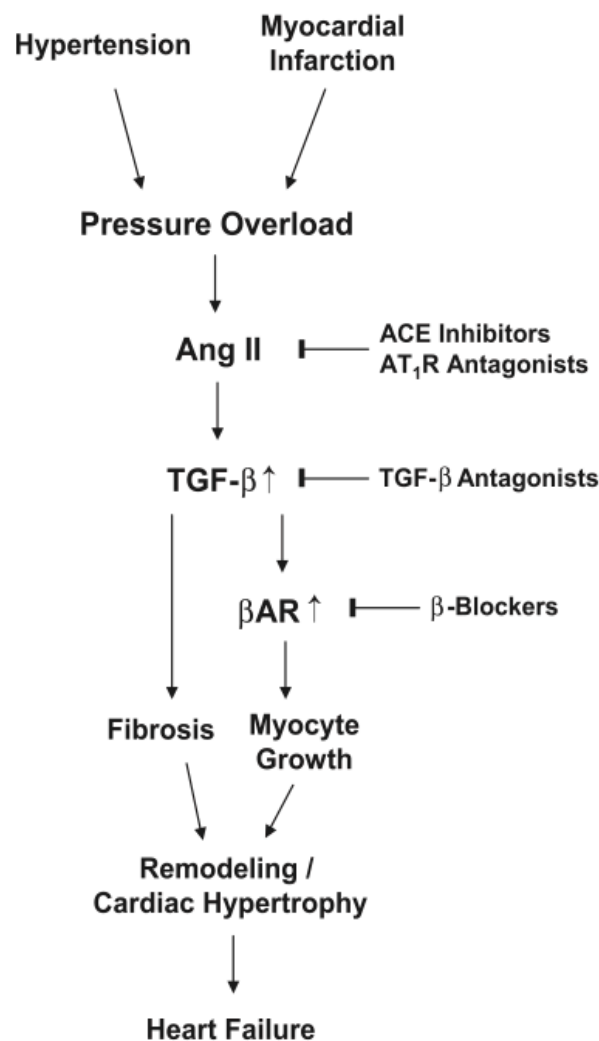


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Verbindungen des RAAS (RAS), TGF- β_1 und des β -adrenergen Systems beim kardialen Remodeling und Ziele medikamentöser Intervention. (**AT₁R** = Angiotensin type 1 receptor; **β -AR** = β -adrenergic receptor, **ACE Inhibitors** = Angiotensin converting enzyme inhibitors). Neben dem RAAS und TGF- β sind weitere Systeme und Mechanismen ebenfalls in das Geschehen der Pathogenese von myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz involviert. (Rosenkranz, 2004).

1.3.1.3 TGF- β und Kontraktilität

Neben dem Frank-Starling-Mechanismus und dem Bowditch-Effekt kann die Kontraktilität des Herzens durch eine Sympathikus-Aktivierung gesteigert werden, die über β -Adrenozeptoren vermittelt wird. Vermehrte Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin führt über eine Stimulierung kardialer β AR-1-Adrenozeptoren zu einer Kontraktilitätssteigerung (Gerbershagen, 2005).

β -Adrenozeptoren, kurz β -Rezeptoren genannt, sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Es werden drei Subtypen unterschieden, von denen vor allem Typ 1 und 2 Relevanz für die Herzfunktion besitzen, da diese Subtypen in hoher Dichte im Herzen nachweisbar sind. Typ 3 kommt in braunem Fettgewebe vor. Typ1 besitzt einen Anteil von 70% - 80% aller β -Adrenozeptoren im Herzen (Jahns et al., 2006). β -Adrenozeptoren im Herzen führen in den Ventrikeln zu einer positiv inotropen Wirkung. Im Sinusknoten führt ihre Erregung zu einer positiv chronotropen Wirkung. β_2 -Rezeptoren werden vornehmlich durch das Hormon Adrenalin, aktiviert. β_1 -Rezeptoren vornehmlich durch Noradrenalin. Experimentell wird meist der β -Adrenozeptoragonist Isoprenalin eingesetzt. Isoprenalin ist ein erstmal 1949 von Konzett synthetisch hergestelltes Analogon des Katecholamins Adrenalin. Aufgrund ihrer hohen Bedeutung für die Regulation der Herzfunktion, stellen die β -Adrenozeptoren den Angriffspunkt einer großen Medikamentengruppe, den β -Adrenozeptorantagonisten, oft auch β -Blocker genannt, dar. Gerade Patienten, die an einer Herzinsuffizienz leiden, profitieren u.a. von einer Dauermedikation mit Präparaten aus dieser Gruppe (siehe Abbildung 1.6). Die Abbildung 1.6 zeigt zudem zwei weitere Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie, und zwar auf der Ebene des Angiotensins, sowie auf der Ebene des TGF- β .

Huntgeburth et al. (2011) untersuchten an TGF- β_1 -überexprimierenden Mäusen, die sie u.a. mit TGF- β -Antagonisten behandelten, die Rolle von TGF- β_1 im funktionellen Netzwerk des RAAS und des β -adrenergen Systems. Die TGF- β_1 -Überexpression führte in den Tieren u.a. zu einer stark verringerten inotropen Wirkung β -adrenerger Stimulation, bei unveränderten basaler Kontraktilität. Die Gabe des TGF- β -Antagonisten sTGF- β R-Fc verhinderte die TGF- β -bedingten

Wirkungen vollständig. Die verringerte inotrope Ansprechbarkeit ging mit erhöhten Spiegeln von mitochondrialen UCP (mitochondrial uncoupling proteins) einher. Sie beschreiben erstmals, dass TGF- β_1 die inotrope Reserve der Kardiomyozyten durch negative Beeinflussung des Energiestoffwechsels verringern kann.

1.3.2 TGF- β und Apoptose

In Kardiomyozyten und Endothelzellen, aber auch weiteren Geweben außerhalb des ZNS wie z.B. Hepatozyten zeigt TGF- β eine pro-apoptotische, sowie fibrosierende Wirkung. TGF- β_1 induziert seinen apoptotischen Effekt durch Rezeptorbindung an den TGF- β -Rezeptor-II und den ALK5 Rezeptor (Heger et al., 2011). Untersuchungen an ventrikulären Kardiomyozyten zeigten, dass TGF- β_1 die Transkriptionsfaktoren AP-1 und SMAD, induziert. (Schneiders et al., 2005). In ihren Versuchen konnten Schneiders et al. nachweisen, dass die simultane Aktivierung von SMAD und des AP-1 notwendig für die TGF- β_1 -vermittelte Apoptose ist. Heger et al. (2009) konnten nachweisen, dass die TGF- β_1 induzierte Apoptose SMAD4 abhängig ist. Heger et al. (2011) zeigten, dass die TGF- β -induzierte Apoptose via TGF- β -Rezeptor-Aktivierung mit nachfolgender Aktivierung der SMAD-Transkriptionsfaktoren und des eNOS-NO-sGC-Signalwegs einhergeht. In ihren Versuchen konnten Heger et al. zeigen, dass die Apoptose ausbleibt, sobald auch nur einer dieser Wege blockiert wird. Die Signalwege konnten einzeln inhibiert werden. Sie laufen unabhängig voneinander ab. Gemeinsam ist ihnen ihre Induktion durch TGF- β . Aus ihren Ergebnissen schlossen Heger et al., dass die kardiale NO-Freisetzung entscheidend für die TGF- β -vermittelte Progression der Herzinsuffizienz sein könnte (Heger et al., 2011).

1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid ist die molekulare Verbindung aus den Elementen Stickstoff (N) und Sauerstoff (O). Es liegt bei Atmosphärendruck und oberhalb von -151°C als Gas vor. NO wirkt im menschlichen Organismus als Signalmolekül, Hormon und Neurotransmitter (Saran & Bors, 1994). Durch sein ungepaartes Elektron besitzt $\cdot\bar{\text{N}}=\bar{\text{O}}$ eine hohe chemische Reaktionsbereitschaft. NO ist ein freies Radikal mit einer Halbwertszeit von 2-3s (Hakim & Sugimori, 1996) und kann in biologischen Systemen eine Diffusionsstrecke von etwa $200\mu\text{m}$ überwinden (Wood & Garthwaite, 1994). NO besitzt eine vasodilatative Wirkung. Dies erkannte der Pharmakologe Ferid Murad 1977 bei Untersuchungen mit organischen Nitraten, wie sie zur Therapie im akuten Angina pectoris Anfall eingesetzt werden. Er beobachtete nach der Gabe von organischen Nitraten das Vorhandensein von Stickstoffmonoxid (NO), sowie eine Dilatation der Blutgefäße. Der Pharmakologe Robert F. Furchgott entdeckte, dass das Gefäßendothel eine Substanz produziert und freisetzt, die zur Relaxation der darunterliegenden Muskulatur führt. Er nannte diese Substanz EDRF (Endothelium-derived-relaxing-factor - vom Endothel stammender, gefäßmuskeler-schlaffender Faktor), da er diesen chemisch nicht entschlüsseln konnte (Flemming & Busse, 1999). 1984 gelang es unabhängig voneinander Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott EDRF als NO zu identifizieren (Bian & Murad, 2003). Der Nobelpreis für Physiologie und Medizin wurde 1998 an R. Furchgott, F. Murad und L. Ignarro für Ihren Nachweis um die große Bedeutung von NO für die Organdurchblutung, sowie seiner Rolle als Messenger verliehen (Raju, 2000).

Endogenes Stickstoffmonoxid (NO) besitzt zwei wesentliche Effekte im Gewebe. Einerseits aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase (sGC) (Arstall et al., 1999). Diese ist das Schlüsselenzym einer Signalkaskade, die eine zentrale Bedeutung bei der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse besitzt. In ihrer aktiven Form katalysiert die sGC die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser Botenstoff agiert als sog. Second Messenger und führt u.a. zu Gefäßerweiterung durch Relaxation glatter Muskulatur und vermittelt Gewebe schützende Effekte (Núñez, 2006). Andererseits nitrosyliert NO Tyrosine und Thiol-Gruppen von Cystein in Proteinen. Durch diese Nitrosylierung können

Proteine ihre Eigenschaften ändern (Mannick et al. 2002). Pacher et al. (2005), sowie Takimoto et al. (2005) wiesen nach, dass eine Dysregulationen des NO und erhöhter oxidativer und nitrosativer Stress mit der Pathogenese der Herzinsuffizienz verbunden sind. Dieser Zellstress wird u.a. durch Peroxynitrit ausgelöst. Peroxynitrit ist ein reaktives Oxidanz, das durch die Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen entsteht. Peroxynitrit wurde in verschiedenen Formen der akuten und chronischen Herzinsuffizienz, sowohl bei Tieren, als auch beim Menschen nachgewiesen (Ferdinandy et al., 2000). In kultivierten Kardiomyozyten der Ratte besitzt Peroxynitrit eine nachweislich schädigende Wirkung (Keira et al., 2002).

1.4.1 Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)

Die Stickstoffmonoxidsynthase NOS ist ein Enzym, das die Bildung von NO (Stickstoffmonoxid) aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Die Reaktion läuft unter der Beteiligung von Kofaktoren ab. Die NO-Synthese verbraucht NADPH sowie Sauerstoff und es entstehen neben NO auch Citrullin sowie Wasser.



Die zusätzlich benötigten Redoxfaktoren können enzymgebundenes Häm, reduzierte Thiole, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin (BH₄) sein (Michel und Feron, 1997).

Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden muss NO ständig synthetisiert werden.

Bei Menschen werden drei Klassen der NO-Synthase beschrieben. Es sind drei Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, die alle in humanen Kardiomyozyten nachgewiesen worden sind:

Die endotheliale eNOS (*NOS3*) wird konstitutiv exprimiert. Die eNOS wird in vaskulären Endothelzellen und im Herzen nachweisbar in den Kardiomyozyten exprimiert. Sie erhielt ihren Namen, da sie erstmalig in vaskulären Endothelzellen nachgewiesen wurde.

Die neuronale nNOS (*NOS1*) wird konstitutiv exprimiert und ist z.T. auch induzierbar. Die nNOS erhielt ihren Namen, da sie erstmalig in neuronalen Zellen

nachgewiesen wurde. Nachweislich wird die nNOS außerdem in Skelettmuskelzellen und im Herzen in den Kardiomyozyten und auch der Nebenniere exprimiert.

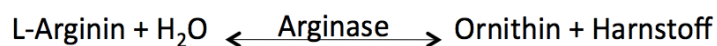
Die induzierbare iNOS (*NOS2*) kommt beispielsweise in Kardiomyozyten, in glatten Muskelzellen, in Endothelzellen, in Fibroblasten, sowie in Makrophagen vor. Im gesunden Herzen wird die iNOS nur sehr gering bis gar nicht exprimiert. Die kardiale Expression der iNOS wird durch pro-inflammatorisch wirkende Zytokine induziert. Dabei vermitteln durch Zytokine induzierbare Transkriptionsfaktoren, wie IRF1 (interferon regulatory factor-1) und NF-κB (nuclear factor-κB) die Transkription durch Bindung an Teile des iNOS Promotors (Xie and Nathan, 1994).

Die iNOS wurde erstmals 1991 von Stuehr und Kollegen aus Makrophagen nach Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid isoliert. Nachdem iNOS exprimiert wird, kommt es zu einer vergleichsweise langen NO-Synthese. In der Folge kann die iNOS eine bis zu 1000-fach höhere NO-Konzentration gegenüber der eNOS hervorbringen (Nathan et al., 1992).

Eine vierte in Mitochondrien vorkommende Variante (mtNOS) wurde 1997 von Ghafourifar und Richter und 1998 von Giulivi et al. beschrieben. Sie dient der Regulation wesentlicher Stoffwechselwege wie Synthesestoffwechsel einerseits und Apoptose andererseits. Die mtNOS entsteht wahrscheinlich durch alternatives Splicing aus *NOS1* (Elfering et al.; 2002).

1.4.2 L-Arginin und Arginase

L-Arginin wird neben den NOS auch durch das Enzym Arginase als Substrat umgesetzt.



Ein Produkt dieser Reaktion ist das Substrat der Ornithin-Decarboxylase (ODC); das Ornithin. Die ODC ist u.a. bekannt als sog. Hypertrophiemarker. Damit könnte in dieser Arbeit die ODC aber auch als Indikator für eine dauerhaft veränderte Arginase-Aktivität in TGiNOS-Kardiomyozyten von Interesse sein.

1.4.2.1 Expression und Regulation der NOS-Isoformen im Vergleich

Die Transkription der *iNOS* wird im Gegensatz zu *eNOS* und *nNOS* durch eine Stimulation durch Transkriptionsfaktoren induziert (Gebicke-Haerter et al., 1996). *eNOS* und *nNOS* werden konstitutiv exprimiert und sind somit ständig im Körper aktivierbar (Schmidt et al., 1992). Transkriptionsfaktoren der *iNOS* können proinflammatorische Zytokine sein. Zu ihnen gehören z.B. IFN- γ , Interleukin 1 β und Tumornekrosefaktor- α (Hoyle, 1996; Kleinert et al., 2003).

Erhöhte Zytokin-Level, wie sie am Übergang von Hypertrophie zu Apoptose zu finden sind, induzieren im insuffizienten Herzen die Expression der *iNOS* (Xie and Nathan, 1994). Das ständige Vorhandensein von *eNOS* und *nNOS* macht eine Regulation der Aktivität erforderlich. Dazu wird bei der *eNOS* eine Aktivierung durch Komplexierung mit Ca^{2+} -Molekülen beschrieben (Fleming et al., 2001). Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen kann eine Phosphorylierung der *eNOS* ebenfalls eine Aktivierung hervorrufen (Mount et al., 2007). Die *iNOS* wird auf zwei Ebenen reguliert. Die Regulation erfolgt sowohl über transkriptionelle als auch über posttranskriptionelle Mechanismen (Rao, 2000). Dabei spielt die Modulation der *iNOS*-mRNA-Stabilität durch RNA-bindende Proteine eine wesentliche Rolle. Die Expression bzw. Inhibition mancher RNA-bindenden Proteine kann die *iNOS*-mRNA-Expression erhöhen. Die Expression anderer RNA-bindender Proteine kann einen destabilisierenden Effekt auf die *iNOS*-mRNA ausüben; ein Abbau der *iNOS*-mRNA wäre die Folge (Luss et al., 1997). Veränderungen der *iNOS* Expression, sowie ihrer Aktivität, subzellulär unterschiedlicher *iNOS*-Aktivität und der Umstand des NO Uncouplings könnten für verschiedene NO induzierte Effekte verantwortlich sein (siehe Review von Umar & van der Laarse, 2010).

1.4.3 Stickstoffmonoxid (NO) und Kontraktilität

NOS-Isoformen modulieren im gesunden, wie auch im erkrankten Herzen die systolische und diastolische Herzfunktion, sowie die Chronotropie (Champion, 2004).

Brady et al. (1993), Joe et al. (1998) und Tatsumi et al. (2000) zeigten, dass NO die Kontraktilität von Kardiomyozyten verringert. Der verantwortliche Mechanismus dafür scheint dabei eine NO induzierte Inhibition des kardialen Ca^{2+} -Stroms zu sein

(Wahler et al., 1995). Die iNOS-Aktivität selbst ist Ca^{2+} -unabhängig. Diese Untersuchungen zeigen deutlich, dass NO einen direkten Effekt auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten haben kann. Dabei konnten Ballingand et al. 2003 in einer klinischen Studie an gesunden Probanden nachweisen, dass endogenes NO dosisabhängig positive und negative chronotrope Wirkung haben kann.

Für die Wirkung der iNOS im Postinfarkt-Geschehen konnten Feng et al. (2001) zeigen, dass iNOS defiziente Mäuse mit Herzinfarkt eine bessere kardiale Kontraktilität und geringere Sterblichkeit als Wildtyp Mäuse mit akutem Myokardinfarkt aufweisen (Feng et al., 2001).

Drexler et al. (1998) wiesen in myokardialen Biopsien des humanen Herzen mit Herzinsuffizienz im Endstadium, sowohl die iNOS-mRNA, als auch erhöhte iNOS-Aktivität nach. Die myokardiale iNOS-Aktivität ist dabei umgekehrt mit der inotropen Ansprechbarkeit auf Isoproterenol korreliert. Diese Verminderung des inotropen Effekts von Isoproterenol ist mit einer gesteigerten Relaxation im insuffizienten Herzen assoziiert. Die Verwendung des allgemeinen NOS-Inhibitors, L-Nitro-Monomethyl-Arginin (L-NMMA), erhöht den inotropen Effekt des insuffizienten Herzen auf β -adrenerge Stimulation.

In endokardialen Biopsien des linken Ventrikels des humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie korreliert die iNOS-mRNA und die iNOS-mRNA-Konzentration linear mit dem linksventrikulären Auswurfvolumen und der linksventrikulären Volumenarbeit (Heymes et al., 1999). Eine intrakoronare Infusion von Substanz-P, die NO aus dem Koronar-Endothel freisetzt, erhöht das linksventrikuläre Auswurfvolumen, sowie die linksventrikuläre Volumenarbeit wieder (Heymes et al., 1999).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die bisherige Literatur ein nur unzureichendes und teils widersprüchlich erscheinendes Bild über den Zusammenhang zwischen erhöhter iNOS-Aktivität bzw. erhöhter NO-Level und Kontraktilität von Kardiomyozyten liefert.

1.4.4 Stickstoffmonoxid (NO) und Apoptose

Keira et al. (2002) konnten in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nachweisen, dass exogen zugeführtes Interleukin-1 β (IL-1 β), Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysaccharide (LPS) zu einer Induktion der iNOS führen, durch die es zur Bildung massiver Mengen an NO kommt, welche nachweislich toxisch wirken (Keira et al., 2002).

Die Heraufregulation der iNOS durch IL-1 β und IFN- γ induziert Apoptose in Kardiomyozyten neonataler Ratten und ist dabei unabhängig von der Aktivität des cGMP (Arstall et al., 1999). Zudem konnten die genannten Autoren zeigen, dass Zytokin induzierte und Peroxynitrit induzierte Apoptose von Kardiomyozyten durch Behandlung mit Peroxynitrit Scavenger verhindert werden kann.

Taimor et al. (2000) wiesen an isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten eine cGMP-abhängige Apoptoseinduktion durch NO nach. Schneiders et al. (2005) zeigten zudem erstmals, dass NO apoptotischen Zelluntergang über SMAD-Proteine und AP-1 vermitteln kann.

Die scheinbare Widersprüchlichkeit dieser gegensätzlichen Ergebnisse lässt sich zum einen durch die Konzentrationsabhängigkeit der NO-Wirkung erklären. Zum anderen wurden die Untersuchungen der verschiedenen Arbeitsgruppen an neonatalen bzw. adulten Rattenkardiomyozyten durchgeführt.

1.4.5 Stickstoffmonoxid (NO) und Herzinsuffizienz

Bei bestehender Herzinsuffizienz sind erhöhte NO-Level, sowie eine verstärkte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nachweisbar (Frantz et al., 2003). Diese sind auf erhöhte iNOS-Level zurückzuführen. Frantz et al. konnten (2003) eine Aktivierung der genannten Transkriptionsfaktoren bei der akuten Ischämie und der Herzinsuffizienz zeigen. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sind u.a. an der Regulation apoptotischen Zelluntergangs beteiligt. Darüber hinaus spielen sie auch eine Rolle im Rahmen der Zellhypertrophie. Erhöhte Zytokin-Level, induzieren im insuffizienten Herzen zudem die Expression der iNOS (Xie and Nathan, 1994). Überschüssiges iNOS-abhängiges NO, das als Quelle für myokardiale ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) dient, führt zur linksventrikulärer

Hypertrophie und Dilatation (Zhang et al., 2007; Arstall et al., 1999). Das durch Reaktion von NO mit Superoxidanionen entstehende Peroxynitrit besitzt eine toxische Wirkung, die in der Modifikation von DNA und Proteinen zum tragen kommt (Keira et al., 2002).

Die Erkenntnisse der aufgeführten Untersuchungen lassen erwarten, dass eine stark erhöhte iNOS-Aktivität mit massiven pathologischen Veränderungen im Herzen verbunden sind, die zu der Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen müssten.

1.4.5.1 Das transgene NOS-Mausmodell

Der Einfluss einer kardialen iNOS-Überexpression wurde von Heger et al. (2002) untersucht. Sie zeigten, dass transgene Mäuse, die iNOS durch den herzspezifischen α -myosin-heavy-chain Promotor überexprimieren und dadurch eine 260-400-fache höhere iNOS-Aktivität aufweisen als Wildtyp Mäuse, keine Unterschiede in Bezug auf ihr Verhalten, die LV-Funktion und den LV Sauerstoffverbrauch aufwiesen. Die Level der NO Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat, die ein Parameter der in vivo NOS-Aktivität sind, waren gegenüber der Wildtyp Mäuse 40-fach erhöht. Die Plasmalevel von NO_x haben sich in TGiNOS Tieren gegenüber den WT Mäusen verdoppelt, was allein auf die kardiale NO-Produktion zurückzuführen war. Selbst diese Erhöhung führte nicht zur Entstehung einer Herzinsuffizienz. Die hohe iNOS-Aktivität spiegelt sich durch das erniedrigte L-Arginin sowie erhöhtes Citrullin wider. Die Nitratbildung weist auf eine Reaktion von NO mit Häm hin. Das Molekül Myoglobin besitzt eine Häm-Gruppe

Darüber hinaus ergaben sich Hinweise darauf, dass die myokardiale iNOS-Aktivität massiv auf nur 30% verringert wurde, und zwar durch eine auf 85% verringerte Verfügbarkeit des Substrates der iNOS, dem L-Arginin, sowie eine Produktinhibition der iNOS aufgrund der Anreicherung von L-Citrullin. Daraus folgerten Heger et al., dass die vorherrschende Überzeugung, eine stark erhöhte iNOS-Aktivität sei für die Entwicklung der Herzinsuffizienz ausschlaggebend, neu überdacht werden müsse (Heger et al., 2002). Gödecke et al. (2003) zeigten, dass eine herzspezifische Überexpression der iNOS nicht zur Herzinsuffizienz führt, wenn das NO durch Myoglobin abgefangen wurde. Gödecke et al. nahmen ihre

Untersuchungen an doppelt transgenen Mäusen mit herzspezifischer iNOS-Überexpression, bei gleichzeitiger Myoglob indefizienz (tg-iNOS⁺/myo^{-/-}) vor; und stellen heraus, dass iNOS-Überexpression nur bei gleichzeitigem Mangel an Myoglobin zu Zeichen einer Herzinsuffizienz, wie kardialer Hypertrophie, ventrikulärem Remodeling, interstitieller Fibrosierung und sogar einer für die Herzinsuffizienz typischen Reaktivierung fetaler Genexpression (ANP, α -skelettales Myoaktin) führt. Sogar eine 50%-ige Reduktion der Myoglobin-Konzentration reicht immer noch aus, um die pathophysiologische Wirkung des NO-Signals aufzuheben. Heger et al. schlossen daraus, dass es einen effektiven Abbau des iNOS-abhängigen NOs durch Myoglobin gibt. Myoglobin ist ein effektiver Scavenger für NO im Herzen (Flögel et al., 2001). Der hohe Wirkungsgrad des NO-abbauenden Effekts wurde dabei auf das gemeinsame Vorhandensein von NO und Myoglobin im Zytoplasma zurückgeführt.

Das, für die im Folgenden dargelegten Untersuchungen verwendete Mausmodell, ist das von Heger (2002) untersuchte Modell einfach transgener Mäuse, die iNOS durch den herzspezifischen α -myosin-heavy-chain Promotor überexprimieren. An diesem Modell sollte im Rahmen dieser Forschungsarbeit auf die Erkenntnisse von Heger (2002) aufbauend, dass eine stark erhöhte iNOS-Aktivität für die Entwicklung der Herzinsuffizienz allein nicht ausschlaggebend zu sein scheint, umfassend analysiert werden, welche Veränderungen sich aufgrund der stark erhöhten iNOS-Aktivität in den Herzen der Tiere ergeben.

1.5 Die Fragestellung dieser Arbeit

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Hypertrophie und Apoptose, bei der zwei Moleküle eine wichtige Rolle spielen. TGF- β wird beim Übergang einer angepassten Hypertrophie zur Apoptose stark exprimiert und iNOS ist mit vielen Formen von Herzinsuffizienz assoziiert. Beide Moleküle führen in Kardiomyozyten zur Apoptose und aktivieren die Transkriptionsfaktoren SMAD und AP-1. Die apoptotische Wirkung von TGF- β ist zusätzlich auch von NO abhängig. Es konnte an transgenen Mäusen mit einer 40-fachen Steigerung der iNOS-Aktivität gezeigt werden, dass eine alleinige herzspezifische Überexpression von iNOS keinerlei basale Veränderungen, wie

Fibrosierung, Hypertrophie, oder eine Herzinsuffizienz zur Folge hat, was auf eine Kompensation der NO-Bildung hinweist.

In dieser Arbeit wurden deshalb diese transgenen iNOS-Mäuse weiter untersucht. Da die vorherigen Arbeiten ausschließlich am Gesamtherz vorgenommen wurden, sollten in dieser Arbeit zusätzlich Vorgänge auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Die transgenen Tiere weisen eine auf das 1600-fache erhöhte iNOS-Expression auf. Die Verfügbarkeit des Substrates der iNOS, der Aminosäure L-Arginin, ist für die NO-Bildung entscheidend. Deshalb soll geklärt werden, ob es einen Einfluss von L-Arginin-Gaben auf die Kontraktilität iNOS-überexprimierender Kardiomyozyten gibt.

NO besitzt auch einen Einfluss auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten. Darum gilt es diesen in dem verwendeten Mausmodell zu analysieren. Weiter soll geklärt werden, welchen Einfluss eine β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten besitzt, um wichtige Erkenntnisse über die funktionellen Folgen erhöhter iNOS-Aktivität im Herzen zu erhalten.

TGF- β besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz, darum sollte geprüft werden, welche Auswirkungen zusätzliche Gaben von TGF- β_1 besitzen.

Das NO-Signal wird in den Kardiomyozyten über die SMAD-Signalkaskade weitergegeben und führt AP-1-abhängig zu apoptotischem Zelltod. Es soll hier der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die SMAD-Proteine in iNOS-überexprimierenden Kardiomyozyten besitzen. Das Ausbleiben eines schädigenden Einflusses der erhöhten NO-Spiegel führt zu der Frage, ob eine Kompensation einzig auf Myoglobin als Scavenger zurückzuführen ist, oder ob Veränderungen innerhalb des TGF- β /SMAD-Signalweges vorliegen, die zur Kompensation des NO-Signals beitragen könnten.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ♂ & ♀ Mäuse des transgenen Mäusestammes TGiNOS, sowie deren nicht transgene Geschwistertiere verwendet (Heger et al., 2002). Die Versuchstiere zeigten eine Geschlechterverteilung männlicher zu weiblicher Tiere von 1:1.

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Name:	Bezugsquelle:
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
Albumin	Sigma, Taufkirchen
APS	Merck, Darmstadt
Basenpaarmarker (100bp) DNA-Marker	New England Biolabs, Frankfurt
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Peqlab, Erlangen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe

Ethanol	Roth, Karlsruhe
First Strand Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Fungizone	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kollagenase	Biochrom, Berlin
Medium 199 / Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
NBT	Sigma, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, Taufkirchen

Proteinmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
SYBR Green	Peqlab, Erlangen
SYBR Font qPCR Master Mix	Peqlab, Erlangen
Taq-Polymerase	Peqlab, Erlangen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
TGF- β_1 Porcine Platelets	Calbiochem, Schwalbach
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Trizol Reagenz	Sigma, Taufkirchen
10x PCR-Puffer (MgCl ₂)	Peqlab, Erlangen

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Schwalbach) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien sind nach Herstellerangaben aufbewahrt und gelöst worden.

2.3 Primer für RT-PCR und Real-Time quantitative PCR

Folgende Primer wurden in der Real-Time PCR verwendet:

HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	(fw-Primer)
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	(rev-Primer)
(Ross et al.,2005)		
TGF- β	AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA	(fw-Primer)
	GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT	(rev-Primer)
(Qian et al., 1990)		
Bax	CCT GAG CTG ACC TTG GAG CA	(fw-Primer)
	CAC TGT CTG CCA TGT GGG G	(rev-Primer)
Bcl 2	GAG GG CTA CGA GTG GGA TAC	(fw-Primer)
	GGC GTT CGG TTG CTC TCA G	(rev-Primer)
BNP	CTTTCATTGCTGCTGTCCAA	(fw-Primer)
	CTTCTTGCATCTGGCTTTCC	(rev-Primer)
Aktin	GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG	(fw-Primer)
	GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC	(rev-Primer)
α -MHC	TGA AAA CGG AAA GAC GGT GA	(fw-Primer)
	TCC TTG AGG TTG TAC AGC ACA	(rev-Primer)
ANF	CTGCTAATCAGCCATGCAAA	(fw-Primer)
	GATGGAGACCATCCTGGCTA	(rev-Primer)
B2M	GCT ATC CAG AAA ACC CCT CAA	(fw-Primer)
	CAT GTC TCG ATC CCA GTA GAC GGT	(rev-Primer)
β -MHC	TGA AAA CGG AAA GAC GGT GA	(fw-Primer)
	TCC TTG AGG TTG TAC AGC ACA	(rev-Primer)
DAPK1	TGACTACTTTGCTGCCAACG	(fw-Primer)
	TCTTCAGCTTGCCTCCAAAT	(rev-Primer)

iNOS	AAG GAT GGG CCT GGA GAC	(fw-Primer)
	TGA GGG CTC TGA TGA GGT CT	(rev-Primer)
eNOS	AAGAGCTACAAAATCCGATTCAACA	(fw-Primer)
	GCCGCCAAGAGGATACCA	(rev-Primer)
SMAD1	CAC CGA TCC TCC CAA CAA TAA G	(fw-Primer)
	CAC TCC GCA TAC ACC TCT C	(rev-Primer)
SMAD2	GGAACCTGCATTCTGGTGTT	(fw-Primer)
	ACGTTGGAGAGCAAGCCTAA	(rev-Primer)
SMAD3	TTCACTGACCCCTCCAACCTC	(fw-Primer)
	CTCCGATGTAGTAGAGCCGC	(rev-Primer)
SMAD4	TGC TGA AGA TGG CGG TTT TGG TG	(fw-Primer)
	GTT GCA GAT AGC TTC AGG GC	(rev-Primer)
SMAD5	GCCTTCTGGTTCAGTTCAGG	(fw-Primer)
	GGAGGATAGGGGCTGTTAGG	(rev-Primer)
SMAD6	GTGTTGCAACCCCTACCACT	(fw-Primer)
	GACATGCTGGCATCTGAGAA	(rev-Primer)
SMAD7	GCT GCT ACC CCA TCT TCA TC	(fw-Primer)
	CAG CCC TTC ACG AAG CTT AT	(rev-Primer)
SMAD8	AGTGCTGTGAGTTCCCGTTC	(fw-Primer)
	AGGCTGAGCTGAGGGTTGTA	(rev-Primer)

2.4 Antikörper

anti-mouse IgG	Sigma, Taufkirchen
anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Goat anti-rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen
TGF- β	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
Bcl-2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
iNOS	Sigma, Taufkirchen
pERK	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
ERK	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
pSMAD 1,5,8	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
pSMAD2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
SMAD2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
pSMAD3	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
SMAD4	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Bezug über New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.

SMAD5
 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers,
 Bezug über New England Biolabs GmbH,
 Frankfurt a. M.

2.5 Geräte und Laborbedarf

2.5.1 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.5.2 RT-PCR und Real-Time-RT quantitative PCR

iCycler	BioRad, München
Thermo- Cycler	Techne Cyclogen, Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire UK
NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektral- photometer	Peqlab, Erlangen
0,2 ml Thermo-strip (tubes& cups)	Abgene®, Hamburg
Homogenisator-Röhrchen	VWR International, Wien

2.5.3 Western Blot

Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nitrozellulose-Membran	Millipore, Eschborn
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
ChemiSMART (Chemiluminescence- Imaging System)	Peqlab, Erlangen

2.5.4 Kardiomyozyten-Präparation

Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
15ml Potter mit Teflonpistill	Sartorius AG, Göttingen
Homogenisator	VWR International, Wien
Kanüle (individualisiert: stumpfe Spitze, Werkstatt für Feinmechanik, Physiologie zirkuläre Einkerbung 2,5mm von der Spitze entfernt)	Gießen

2.5.5 Sonstige Geräte

Aqua bidest.-Anlage	Millipore, Eschborn
Homogenisator, Precellys® 24	VWR International, Wien
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Techne Dri-Block® DB.2D (Thermoblock)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Vortexer®	Heidolph, Kelheim

2.5.6 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2.5.7 Software

Microsoft Windows XT®	Microsoft Corp., USA
Microsoft Excel®	Microsoft Corp., USA
Version 2003	
Microsoft Word®	Microsoft Corp., USA
Version 2003	
Mac OS X® 10.6.6-10.7.3	Apple inc., USA
Microsoft Word for Mac 2008®	Microsoft Corp., USA
Version 12.2.8	
Microsoft Excel for Mac 2008®	Microsoft Corp., USA
Version 12.2.8	
SPSS®	SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA
Version 18	

3. Methoden

3.1 Genotypisierung mittels Schwanzbiopsie bei der Maus

Zur Ermittlung des Genotyps der verwendeten Versuchstiere wurde eine Biopsie des Schwanzes (ca. 2mm der Schwanzspitze) entnommen und über Nacht bei 55°C in 400µl Mastermix inkubiert.

Zusammensetzungen:

Mastermix:	375µl Cutting-buffer
	20µl 20% SDS
	5µl Proteinkinase K (20mg/ml)
Cutting buffer:	2,5 ml 1M Tris pH 7,5
	5,0ml 0,5M EDTA pH 8,0
	1,0ml 5M NaCl
	250µl 1M DTT
	127µl Spermidine (500mg/ml) → 63,5mg

Auf 50ml mit Aqua dest. auffüllen

Nach Abzentrifugieren nicht verdauter, fester Bestandteile (14.000rpm, 2min. bei Raumtemperatur) wurde der Überstand in 400µl Isopropanol gegeben und zum Ausfällen der DNA geschwenkt. Durch erneute Zentrifugation (wie oben) entstand ein sichtbares Pellet. Dieses wurde, nach Dekantieren des Isopropanols, mit 70% Ethanol überschichtet und zentrifugiert (12.000rpm., 10min bei 4°C). Anschließend wurde das Ethanol verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet aus genomischer DNA wurde über Nacht bei 4°C in TE-Puffer gelöst. Diese DNA wurde für die PCR verwendet und mittels iNOS spezifischer Primer im Thermo-Cycler vervielfältigt. Somit konnten transgene TGiNOS-Mäuse von Wildtyp-Mäusen unterschieden werden.

3.1.1 Einführung in die Methode der PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde von Kary Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelt. Diese Methode ermöglicht es mit Hilfe der DNA-Polymerase einen gewünschten DNA-Abschnitt exponentiell zu amplifizieren. Dazu benötigt werden die Template-DNA, eine hitzestabile Polymerase, Primer als Startsequenz für die Polymerase und die einzelnen Nukleotide als Bausteine für die neu synthetisierte DNA. Wenn RNA als Ausgangsprodukt vorliegt, muss zuerst mittels der reversen Transkription die RNA in cDNA umgeschrieben werden (RT-PCR). Das Prinzip der PCR basiert auf einem sich wiederholenden Zyklus, bestehend aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Als erstes wird durch das Erhitzen auf 95°C die Denaturierung der komplementären DNA-Stränge erreicht. Nun wird die Temperatur auf die individuelle Annealingtemperatur gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA kommt. Durch das erneute Erhitzen auf 72°C wird enzymatisch durch die DNA-Polymerase der Primer weiter verlängert, bis er ein genaues Duplikat der ursprünglichen DNA darstellt. Die Syntheserate verläuft nach einem exponentiellen Wachstum, so dass es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Produktmenge kommt. Ab einer gewissen Produktmenge und Zyklenzahl kommt es zu einem Verbrauch der Primer und einem Plateau-Effekt.

3.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Reaktionsansatz:	57,1µl Aqua bidest.
(für 10 Proben)	12µl 10xPCR Puffer (-MgCl ₂)
	12µl 5mM MgCl ₂
	9,6µl 2,5mM dNTP's
	9,0µl Primermix
	0,3µl Taq-Polymerase

Zu 10µl des genannten Reaktionsansatzes wurden je 2µl der genomischen DNA gegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (10µl Reaktionsansatz +2µl Aqua bidest.) pipettiert. Mit Hilfe der Negativkontrolle konnte eine Kontamination des Mix durch DNA kontrolliert werden. Die PCR wurde daraufhin am Thermo-Cycler mit folgenden Parametern durchgeführt:

Zyklus 1 (1x)	Step 1	94°C für 3 Minuten
Zyklus 2 (35X)	Step 1	94°C für 35 Sekunden
	Step2	65°C für 1Minuten
	Step 3	72°C für 1 Minuten
Zyklus 3(1x)	Step 1	72°C für 2 Minuten

Abschließend wurden die Proben auf 10°C heruntergekühlt und im folgenden Schritt in einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der RT-PCR wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden die PCR-Amplifikate mit 1µl Ladepuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt.

Agarosegel (2 %)

1,5 g Agarose

75 ml 1xTAE-Puffer

3,8 µl SYBRsafe®

Die Agarose wurde zusammen mit 1xTAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht, um eine klare, homogene Lösung zu erhalten. Die Lösung wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBRsafe® versetzt und in eine Elektrophoresekammer gegossen. Um Taschen für die Proben zu erhalten, wurden Käbme in die noch flüssige Agarose-Lösung platziert. Das fest gewordene Agarose-Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegeben und diese mit 1xTAE-Puffer befüllt. In die Taschen des Agarose-Gels wurden je 10µl der Proben + 1µl Ladepuffer aufgetragen. Als Referenz für die Fragmentgröße wurde ein DNA-Längenmarker

verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 75 Volt für circa 30 Minuten. Das Gel mit den nun aufgetrennten PCR-Amplifikaten wurde unter UV-Licht ($\lambda=320\text{nm}$) zur Fluoreszenz gebracht und fotografiert. Die Fluoreszenzmaxima des verwendeten Fluoreszenzmittels (SYBRsafe®) liegen bei 280 und 502nm.

Zusammensetzungen

Ladepuffer:

10xTAE-Puffer	x ml
Glycerin	50 % (wt/vol)
Ladepuffer	1 % (wt/vol)
Xylencyanol	1 % (wt/vol)

10x TAE-Puffer:

Tris-Acetat	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

Marker:

100 Base Pair DNA Ladder	0,5 μ l
Bromphenolblau	1 μ l
1xTAE-Puffer	8,5 μ l

3.2 Isolierung von Gesamtherzen

Zur Gewinnung von Gesamtherzen wurden sowohl weibliche, wie auch männliche Mäuse im Alter von im Durchschnitt 10,5 Monaten verwendet.

3.2.1 Präparation zur Gewinnung von Gesamtherzen

Nach dem Bereitlegen aller benötigten Materialien wurden die Tiere nacheinander aus den Käfigen entnommen und umgehend in einer geeigneten Plexiglaskammer mit CO₂ narkotisiert. Durch zervikale Dislokation wurden die Mäuse getötet. Mit einer Schere mit abgerundeten Spitzen wurde eine Thorakotomie vorgenommen. Das Herz wurde durch Einstechen einer Kanüle in einen Ventrikel mit kaltem PBS gespült, bis es sichtbar blasser erschien. Mit einer feinen Pinzette mit abgewinkelten Branchen wurde das Herz gefasst. Mit einer Präparationsschere wurden die Gefäße möglichst proximal, entlang der Herzkontur abgetrennt. Das Herz wurde in ein vorbereitetes Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde umgehend in flüssigen Stickstoff gegeben. Gelagert wurden die Herzen bei -80°C.

3.3 RT-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) und real-time quantitative RT-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung aus Gesamtherzen für real-time quantitative RT PCR und RT-PCR

Die isolierten Herzen wurden direkt in Homogenisator-Röhrchen gegeben, mit 1ml Trizol überschichtet und unter optischer Kontrolle im Homogenisator homogenisiert. Dabei wurden die Proteine denaturiert. Im nächsten Schritt wurden 100µl Chloroform zugegeben. Nach dem vollständigen Durchmischen wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (ca. 500µl) wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Das im Zentrifugierschritt entstandene Pellet wurde verworfen. Dieser Überstand war reich an RNA. Dem Überstand wurden 450µl Isopropanol zugegeben. Zur Präzipitation der RNA wurde das Gemisch 25 Minuten bei -20°C gelagert. Die RNA wurde durch einen weiteren, 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm gefällt. Der Überstand wurde verworfen. Zum Reinigen des RNA-Pellets wurde 1ml 70%iges Ethanol zugegeben. Durch Zentrifugieren für 10 Minuten entstand ein Pellet. Das Ethanol wurde verworfen. Die Pellets wurden unter optischer Kontrolle

getrocknet. Eine Resuspension des Pellets erfolgte in 100µl DEPC-Wasser. Um DEPC-Wasser zu erhalten, wurde 1 Liter destilliertes Wasser mit 100µl DEPC über Nacht gerührt und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert. Dadurch war das Wasser RNase-frei. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Alle Proben und alle Reagenzien wurden während der Versuchsdurchführung auf Eis gelagert.

3.3.2 DNase-Behandlung

Die DNase-Behandlung folgte auf die RNA-Isolation. Sie diente dazu, die RNA von genomischer DNA zu befreien. 10µg RNA wurden zusammen mit 20µl DNase-Mix für 1,5 Stunden bei 37°C erhitzt.

<u>DNase-Mix</u>	(1fach)
10x DNase Puffer (10x PCR-MgCl ₂)	2 µl
DNase	1 µl (1 U/µl)
RNasin	1 µl (25 U/µl)
DEPC-Wasser	16 µl

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Proben durch kurzes Zentrifugieren am Boden der Reaktionsgefäße gesammelt und je 80µl TE/1% SDS zugegeben. Nun wurden 100µl Phenol/Chloroform (1/1, vol/vol) zu gleichen Teilen mit der DNase-behandelten RNA-Lösung gemischt und für 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugesetzt und alles auf dem Vortexer® durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die RNA durch Zugeben und Durchmischen von 10µl 3M Na-Acetat und 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. Es folgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C. Nach Zugabe von 200µl 80%igen Ethanols und Durchmischen folgte eine weitere Zentrifugation über 15 Minuten bei 12.000 rpm bei 4°C. Jetzt wurde das entstandene Pellet unter optischer Kontrolle bei 37°C getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 20µl DEPC-Wasser und 1µl RNasin auf Eis.

3.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 UV/Vis- Spektrophotometer. Das Gerät besitzt einen Messbereich von 120nm-750nm. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Probenvolumen von 1,5 µl benötigt. Vor Beginn der Messung wurde das Gerät mit Aqua bidest. kalibriert. Dann wurde das Probenvolumen auf den Sensor aufgetragen und die Messung gestartet.

Das NanoDrop Gerät errechnet die RNA-Konzentration in ng/µl. Da 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben werden sollte, wurde mit folgender Formel das Probenvolumen bestimmt:

$$\frac{1000ng}{\text{Konzentration der RNA}[ng/\mu l]} = x \mu l$$

3.3.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription wurde mRNA als Matrize zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Das Volumen wurde ad 5 µl mit H₂O ausgeglichen.

Die Probensuspension wurde bei 60°C für 15 Minuten im Thermocycler denaturiert. In dieser Zeit wurde der Reaktionsmix hergestellt.

Reaktionsmix je Probe:

5x RT- Puffer	2,0 µl
Oligo-dT	1,0 µl (0,1 mg/ ml)
dNTP`s	1,0 µl (40 mmol/l)
DTT(Dithiotreitol)	0,5 µl (0,1 mol/l)
RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
M-MLV-RT	0,3 µl (200 U/µl)

Anschließend wurden die Proben auf Eis gelegt und 5 µl Reaktionsmix zugegeben.

Die Reverse Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde im Thermocycler. Anschließend wurde die gewonnene cDNA für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und konnte direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.4.1 RT-PCR: Durchführung der Methode

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt; die verwendeten Reaktionsgefäße wurden zuvor UV-bestrahlt. Als Template diente die unter 3.3.4 gewonnene cDNA. Als Negativkontrolle dienten 8,5µl Reaktionsmix + 1,5µl DEPC-Wasser. Jede Analyse wurde im Doppelansatz durchgeführt.

PCR-Reaktionsmix:

10x PCR-Puffer	1,0 µl
Aqua bidestillata	5,8 µl
Primergemisch (for&rev) (100mmolar)	0,3 µl
dNTP's (10 mmolar)	0,4 µl
MgCl ₂ (50 mmolar)	0,3 µl
1% W1	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

3.3.4.2 PCR-Laufprogramme

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma BioRad® unter den folgenden Konditionen durchgeführt:

Zyklus 1: (1x)

94°C für 5 Minuten

60°C für 3 Minuten

72°C für 3 Minuten

Zyklus 2: (20x)

94°C für 1 Minute (Denaturierung)

x°C für 1 Minute (Annealing)

72°C für 1 Minute (Amplifikation)

Zyklus 3: (1x)

72°C für 15 Minuten

5°C bis zur Entnahme

Die Annealingtemperatur wurde spezifisch für jeden Primer bestimmt.

3.3.5 Real-Time quantitative RT-PCR

Mit der Weiterentwicklung der Real-Time-PCR durch Higuchi (Higuchi et al., 1993) wurde es möglich, mittels Messung von Fluoreszenzsignalen quantitativ DNA-Mengen zu bestimmen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Menge der gebildeten Produkte. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte bei jedem Zyklus am Ende der Extensions-Phase. Zu diesem Zeitpunkt haben SYBRgreen®-Moleküle an die amplifizierte Doppelstrang-DNA gebunden, was zu einem Fluoreszenzsignal führte. SYBRgreen® ist ein zyklischer Cyanfarbstoff. Es besitzt eine 100fach höhere Affinität als Ethidiumbromid und ist weniger mutagen. Ist SYBRgreen® in doppelsträngige DNA eingebaut, beginnt es zu fluoreszieren.

Da die Bindung von SYBRgreen® an die DNA sequenzunspezifisch ist, wird am Ende der PCR mittels einer Schmelzkurve zwischen dem gewünschten Produkt und unspezifisch entstandenen Produkten unterschieden. Die amplifizierten Produkte denaturieren bei einer bestimmten Temperatur, der Schmelztemperatur, und setzen so den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei. Dadurch fällt das Fluoreszenzsignal stark ab. Die Schmelztemperatur ist abhängig von dem Gehalt an Guanin und Cytosin des Produkts. So lassen sich Primerdimere und unspezifische Amplifikate gut von dem spezifischen Produkt abgrenzen (Abb. 3.1).

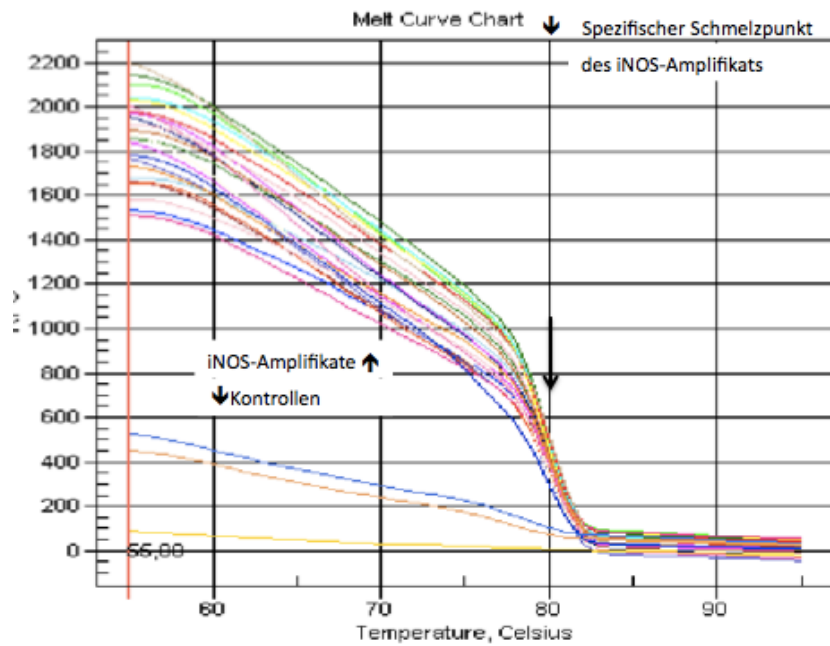


Abb. 3.1a: Melt Curve Chart einer Real-Time quantitative RT-PCR (Primer: iNOS)

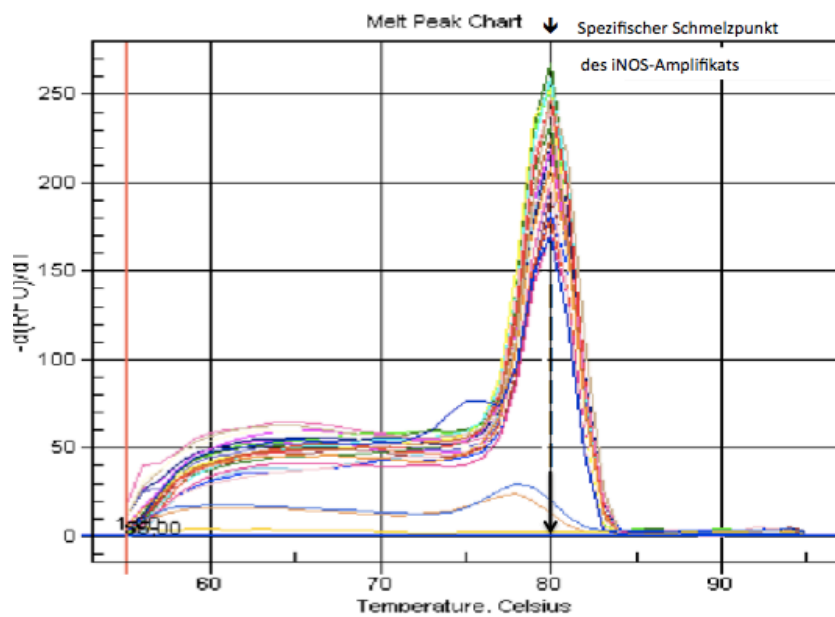


Abb. 3.1b: Melt Peak Chart einer Real-Time quantitative RT-PCR (Primer: iNOS)

Eine weitere Darstellungsmethode des Verlaufs der PCR, die zur Beurteilung herangezogen wird, ist das Amplification Chart (siehe 3.3.6 Abb. 3.4).

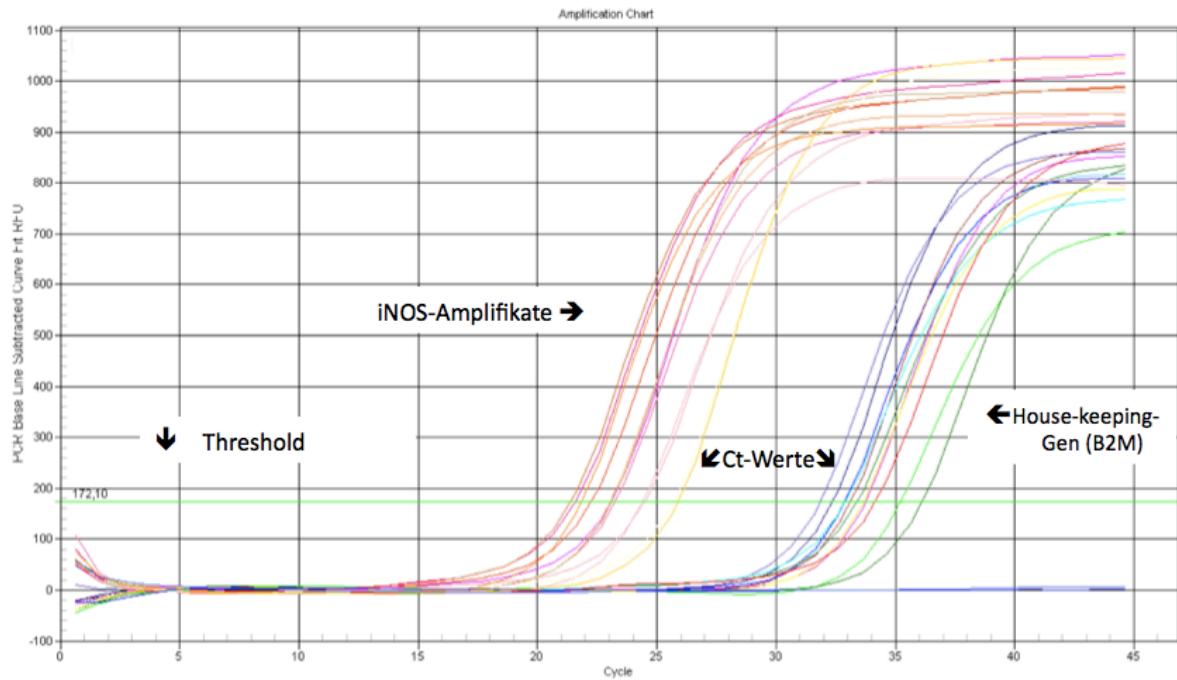


Abb. 3.2: Amplifications Chart einer Real-Time quantitative RT-PCR (Primer: iNOS).

Die verwendeten Primer wurden vor ihrem Einsatz optimiert. Über einen Temperaturgradienten wurde die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Zudem wurde überprüft, ob nach jedem Zyklus von einer Verdopplung beziehungsweise einer exponentiellen Amplifikation der DNA ausgegangen werden konnte. Dies ist für die spätere Auswertung von Bedeutung. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Template-DNA erstellt (1:10 bis 1:10.000). Liegt eine exponentielle Amplifikation vor, ergibt sich in der halblogarithmischen Darstellung eine lineare Steigung von -3,3.

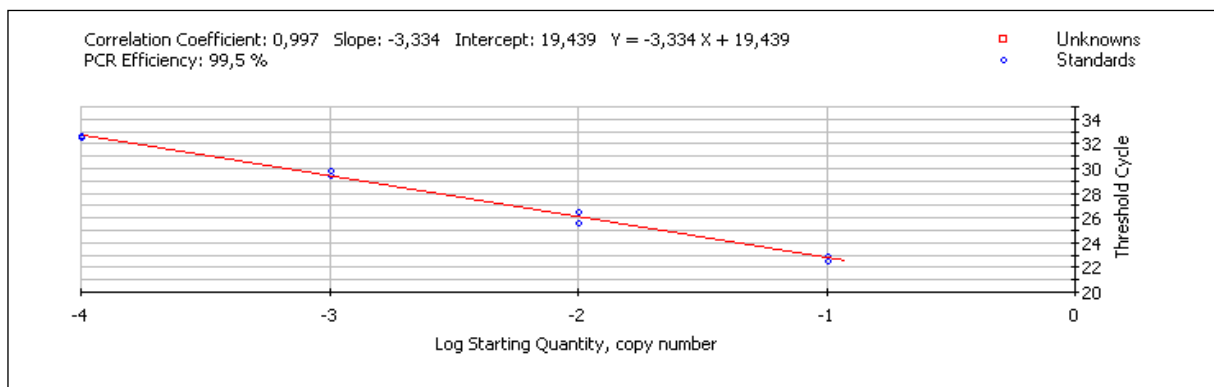


Abb. 3.3 Diese Abbildung zeigt eine Standardkurve mit einer Steigung von -3,3, einem Korrelationskoeffizienten von 0,997 und einer Effizienz von ca. 100 %.

3.3.5.1 PCR-Ansatz

Alle PCR-Analysen wurden als Doppelansatz durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus der unter 3.3.4 gewonnenen cDNA (2µl), die mit 18µl Reaktionsmix versetzt wurde. Verwendung fand hier iQ-SYBRgreen®. Dieser präfabrizierte Supermix (Fa. BioRad®) enthält alle notwendigen Reagenzien. Sich summierende Pipettierfehler können so minimiert werden.

Real-Time-PCR Ansatz

iQ-SYBRgreen Supermix	10,0 µl
Primergemisch (for und rev; je)	0,6 µl (100 nM)
Aqua bidest.	6,8 µl
cDNA	2,0 µl

3.3.5.2 Laufprogramme der RT-PCR:

Die RT-PCR wurde in einem Icycler® (Fa. BioRad®) durchgeführt.

Zyklus 1: (1x)

95°C für 3 Minuten

Zyklus 2: (45x)

95°C für 30 Sekunden (Denaturierung)

x°C für 30 Sekunden (Annealing)

72°C für 30 Sekunden (Amplifikation)

Zyklus 3: (100x)

50°C-100°C je 10 s (Schmelzkurve)

Annealingtemperaturen:

Bcl 2	56°C
BNP	61°C
TGF- β	53°C
Aktin	58°C
α -MHC	63°C
ANF	62°C
B2M	62°C
Bax	58°C
β -MHC	63°C
DAPK1	60°C
HPRT	63°C
iNOS	61°C
SMAD1	63°C
SMAD2	63°C
SMAD3	62°C
SMAD4	62,6°C
SMAD5	60°C
SMAD6	62°C
SMAD7	64°C
SMAD8	57°C

Die Zahl der Zyklen war für jeden der verschiedenen Primer identisch. Zur Unterscheidung der PCR-Amplifikate von Artefakten diente ein Schmelzvorgang (siehe 3.3.5).

3.3.6 Auswertung der PCR

Die erhaltenen Daten wurden nach der Methode von Pfaffl (2001) ausgewertet. Bei dieser Methode wird die relative Expression eines Gens mit einem Referenzgen (Housekeeping-Gen) verglichen. Da das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert (Threshold) übertreffen muss, gibt es zu Beginn des Versuchs eine gewisse Anzahl von Zyklen, in denen das Fluoreszenzsignal nicht vom sog. Hintergrund differenziert werden kann. Durch die exponentielle Zunahme der Amplifikate übertrifft das Fluoreszenzsignal irgendwann den Threshold. Der Schnittpunkt der Kurve mit dem Threshold erfolgt in einem Zyklus, der Ct-Wert genannt wird (siehe Abbildung 3.4). Der Threshold wird über die iCycler-Software ermittelt: dazu werden die Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen den Zyklen 2 bis 10, in denen die Kurve noch keinen signifikanten Anstieg durch die Amplifikation erfährt, ermittelt. Der Mittelwert aller Standardabweichungen der einzelnen Proben wird mit 10 multipliziert. Der erhaltene Wert wird als Threshold festgesetzt (Hunt). Der Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zur DNA-Menge. Je kleiner der Ct-Wert ist, desto mehr DNA war zu Beginn der Reaktion vorhanden.

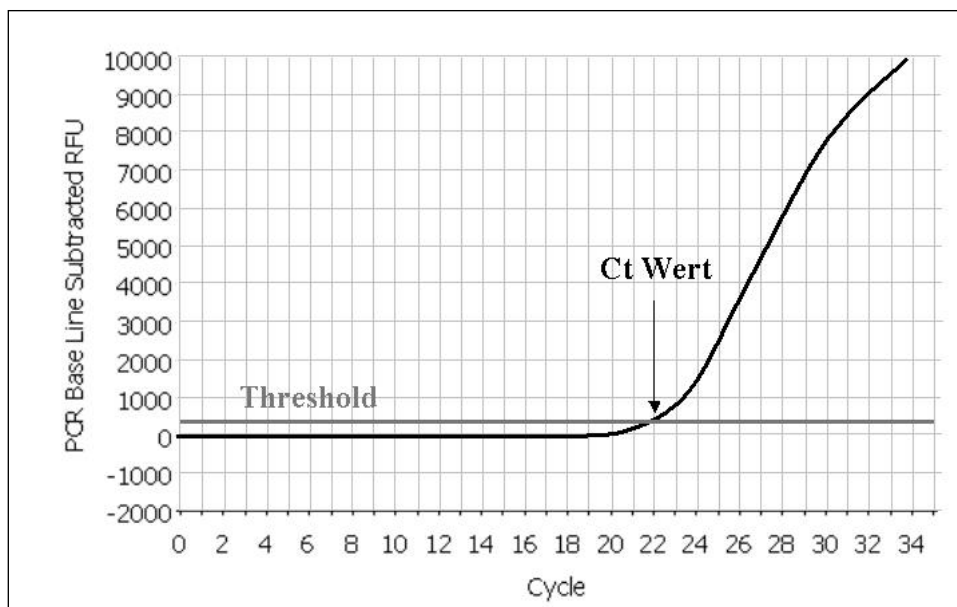


Abb.:3.4:

Zur genaueren Quantifizierung wurden die Amplifikate in Beziehung zu einem nicht regulierten Gen (sog. Housekeeping-Gen) gesetzt. Als Housekeeping-Gen

diente hier *HPRT1*. Der Ct-Wert jeder Probe wurde von dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens der jeweiligen Probe subtrahiert.

3.4 SDS Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen

3.4.1 Aufbereitung der Herzen in RIPA-Puffer

Das entnommene und gespülte Herz wurde direkt in ein Homogenisator-Röhrchen überführt und dieses in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Entnahme aller für die Versuchsreihe benötigten Herzen schloss sich die gleichzeitige Aufbereitung aller Herzen in RIPA-Puffer an. Dazu wurde jedes Herz mit 1000µl auf 4°C gekühlten RIPA-Puffer, sowie 2,5µl PMSF versetzt und unter optischer Kontrolle homogenisiert. Um einer Hitzedenaturierung vorzubeugen, wurden die Proben zwischen den Homogenisierungsschritten von maximal 20 Sekunden Dauer auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich beim Schwenken der Homogenisator-Röhrchen ein homogenes Gemisch zeigte. Das Homogenisat jeder Probe wurde in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt. Zum Abbau der DNA wurden jeder Probe 5µl Benzonase / 250µl Homogenisat, sowie 4µl MgCl₂ / 250µl Homogenisat zugegeben. Die Proben wurden daraufhin bei 4°C und 12.000rpm 15 Minuten lang zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

RIPA-Ansatz:

		1x	2x	3x	4x	5x	6x	7x	8x	9x	10x
RIPA-Stocklösung		236	473	709	945	1181	1418	1654	1890	2126	2363
PMSF (0,1M)	soll 1mM	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
EDTA (0,2M)	soll 1mM	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10	11,25	12,5
Glycerophosphat (1M)	soll 40nM	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Σ in µl:		250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000	2250	2500

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist es möglich, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. In einem elektrischen Feld werden Proteine durch ein Gel bewegt und nach ihrer Größe bzw. molekularen

Masse in unterschiedliche Banden aufgetrennt. Dabei werden die Disulfid-Brücken, die die Tertiärstruktur der Proteine erzeugen durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) zerstört. Die Proteine erhalten durch das SDS eine negative Ladung. Dadurch wandern sie im elektrischen Feld in Richtung der positiven Elektrode (Anode). Das Polyacrylamidgel weist eine gleichmäßige Porenstruktur auf, die es größeren Proteinen erschwert, in gleicher Zeit eine vergleichbare Strecke wie kleinere Proteine im Gel zurückzulegen. Die Folge ist eine Größenauftrennung der Proteine, die als Banden auf dem Gel sichtbar gemacht werden konnten. Es wurde die diskontinuierliche Methode nach Laemmli angewendet. Hierbei besteht das Gel aus zwei Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung. Diese unterschieden sich im pH-Wert, der Konzentration an Tris und dem Acrylamidgehalt und besitzen jeweils unterschiedliche Funktion. Das Sammelgel besitzt große Poren und lässt folglich auch bei großen Proteinen eine ungebremste Bewegung zu. Damit tritt die Proteingröße hinter die elektrische Ladung als Faktor für die Bewegung zurück. Da sich diese unter den Proteinen kaum unterscheidet, bündelt dieses Gel die Proben. Dies führt bei der Auftrennung zu schärfer abgegrenzten Banden. Im Trenngel werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

3.4.3 Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten identischer Größe deckungsgleich übereinandergelegt. Entlang zweier gegenüberliegender Seiten wurde je ein Spacer (1,5mm Dicke) platziert; diese schlossen bündig mit den Kanten der Glasplatten ab. Um den durch die Spacer begrenzten Raum zwischen den Glasplatten abzudichten, wurde ein Gummischlauch entlang der Spacer und der späteren Unterseite platziert. Durch zwei Klammern, im Bereich der Spacer, wurden die Glasplatten mit den Spacern fest verbunden und der Schlauch in seiner Lage gesichert. Zwei weitere Klammern an der späteren Unterseite wurden direkt über dem parallel, im Abstand von ca. 2cm zu den Glaskanten verlaufenden Schlauch platziert. Sie dienten gleichzeitig als Standfüße der Glasvorlage. Diese Glasvorlage wurde parallel zur Tischebene ausgerichtet.

Das Trenngel wurde bis zu einer Füllhöhe, die der Länge des Taschenkamms zuzüglich der Länge der Zähne des Kamms entsprach, befüllt. Um später eine

gerade Trennschicht zwischen Sammelgel und Trenngel zu erhalten und eine Sauerstoffinhibition während des Polymerisationsvorgangs des Trenngels zu verhindern, wurde das Trenngel mit ca. 2ml H₂O überschichtet. Nach einer zweistündigen Polymerisationszeit wurde das Wasser abgeschüttet. Ein verbleibender Rest des Wassers, der sich durch Kapillarkräfte zwischen den Glasplatten halten konnte, wurde mittels Filterpapiers vorsichtig entfernt. Dabei war darauf zu achten, die Geloberfläche nicht zu berühren. Über die Kapillarwirkung und die Saugfähigkeit des Filterpapiers konnten somit alle verbliebenen Wasserreste vollständig entfernt werden. Nun wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Taschenkamm eingesetzt. Mittels rüttelnder Bewegungen vor dem vollständigen Einführen des Kammes wurden eventuell entstandene Luftblasen unter optischer Kontrolle zur Oberfläche bewegt. Die Polymerisationszeit betrug ca. 30 Minuten. Ein Überschuss an unpolymerisiertem Gel-Ansatz verblieb in einem Glasgefäß. Eine Kontrolle auf vollständige Polymerisation konnte somit erfolgen, ohne am Sammelgel manipulieren zu müssen. Das Ergebnis war ein luftblasenfreier Übergang zwischen Trenngel und Sammelgel, sowie luftblasenfreie Taschenwandungen. Die identisch dimensionierten und in immer gleichem Abstand voneinander liegenden Zähne des Taschenkammes formten identisch große Taschen. Somit wurden für alle Proben dieselben Voraussetzungen für die nachfolgende Elektrophorese geschaffen.

3.4.3.1 Zusammensetzung der Elektrophorese-Gele:

Trenngel:

10 %	12 %	15 %	
30% Acrylamid	6,6 ml	8,0 ml	10 ml
Millipore-Wasser	8,4 ml	7,0 ml	5,0 ml
1,5M Tris pH 8,6	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	200 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

Sammelgel (5%) :

30% Acrylamid	1,675 ml
Millipore-Wasser	6,75 ml
1,0M Tris pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	100 µl
10%APS	100 µl
TEMED	20 µl

3.4.3.2 Ansatz der Reagenzien und Puffer:

Acrylamid-Bisacrylamid (30:1):

Acrylamid (30%)	146 g
Bisacrylamid	4 g

ad 500 ml Millipore Wasser.

Trenngelpuffer:

Tris/HCl	181,71 g
----------	----------

ad 1000 ml Millipore Wasser

auf pH 8,6 einstellen

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl	60,57 g
----------	---------

ad 1000 ml Millipore Wasser

auf pH 6,8 einstellen

3.4.3.3 Proteinmengenbestimmung nach Lowry (Lowry, 1951)

Diese Methode dient dem quantitativen Proteinnachweis. Die zwei zugrunde liegenden Reaktionen führen zu einer blauen Färbung der Proben. Diese ist bei 590nm photometrisch messbar. In einem ersten Schritt kommt es im alkalischen Milieu zu einer Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen der Proteine und Kupfer(II)-Ionen. Dieser Komplex besitzt durch das Kupfer eine blau-violette

Färbung. Im zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, um seinerseits mit Folin-Reagenz (gelbe Eigenfarbe) zu reagieren. Das Folin-Reagenz enthält Molybdän(VI). Dieses wird zu Molybdänblau reduziert. Es entsteht eine tiefblaue Färbung. Je mehr Protein und damit Peptidbindungen in der Probe enthalten sind, desto höher ist die Zahl der Kupferkomplexe und letztendlich die Intensität der Färbung. Die Methode nach Lowry ist empfindlich genug, um Proteinkonzentrationen von 0,1µg/ml nachweisen zu können.

Die Proteinmengenbestimmung nach Lowry wurde als Doppelansatz durchgeführt. Als Eichkurve für jede einzelne Messung diente eine sog. Standardreihe. Diese Reihe besaß definierte Proteinkonzentration. Durch das zeitgleiche Umsetzen des Standards unter identischen Bedingungen, mit den selben Reagenzien, können methodisch bedingte Falschmessungen minimiert werden. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte und unter Verwendung von Millipore-H₂O. Die Absorptionswerte sowohl der Platte, wie auch des Millipore-H₂O wurden einzeln bestimmt. Durch Subtraktion der so gewonnenen Werte von den Messwerten der Proben, konnten diese weiter korrigiert werden.

Zusammensetzung der Reagenzien:

Lowry-Assay

Reagenzien:

Lösung 1: Natrium-Kalium-Tartrat ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)

3,3g ad 100ml Aqua bidest. lösen.

Lösung 2: Kupfersulfat ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)

1,25g ad 100ml Aqua bidestillata lösen.

Lösung 3: Natriumcarbonat (Na_2CO_3 , wasserfrei)

25g ad 1000ml Aqua bidestillata lösen.

Lösung 4: 1 N NaOH

4g ad 100ml Aqua bidestillata lösen.

Lösung 5: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck 9001)

22,73 ml Originalreagenz ad 100ml Aqua bidestillata lösen.

Doppelter Ansatz:

Zunächst wird **Reagenz A** angesetzt.

Beispiel: Für **12** Proben benötigt man: 60 µl Lösung 1 (Na-K-Tatrat)
 60 µl Lösung 2 (Cu₂SO₄)
 Auf ein Vol. von 6.000µl auffüllen 5880 µl Lösung 3 (Na₂CO₃)

96 Well-Platte

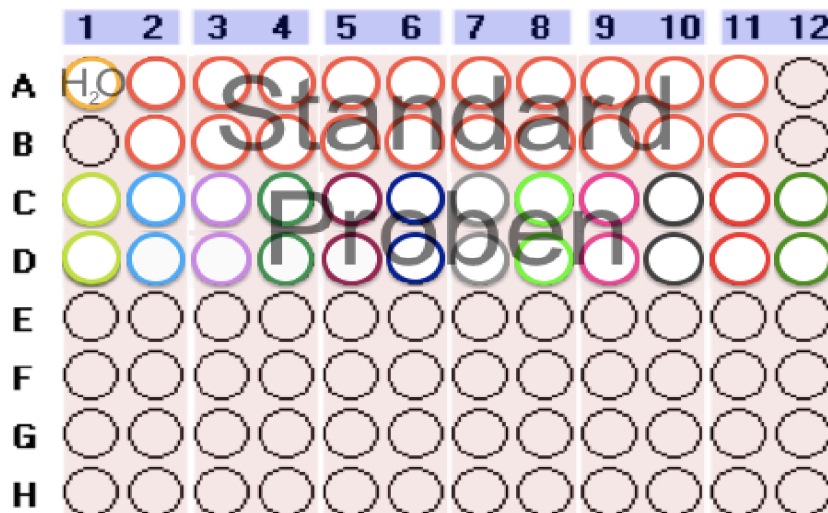


Abb. 3.5 Schema einer 96-Well-Platte. Dargestellt ist die Anordnung bei einem doppelten Ansatz und 12 Proben.

3.4.3.4 Durchführung des Lowry-Assays

Um Fehler in der Durchführung des Lowry-Assay feststellen zu können, diene ein Doppelter Ansatz jeder Probe. Als spätere Bezugsgröße wurden Proben bekannter Konzentrationen (eine sog. Standard-Verdünnungsreihe) unter identischen Bedingungen mitgeführt. Sowohl die Proben-, als auch die Standard-Gefäße wurden mit je 500µl Reagenz A und 50µl Lösung 4 befüllt, dann erhielten die Proben-Gefäße je 50µl Millipore-Wasser, sowie 10µl Probenflüssigkeit und die Standard-Gefäße je 50µl BSA-Verdünnung, sowie 10µl RIPA-Puffer. Alle Gefäße wurden mittels eines Vortexer® gemixt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann erhielten sowohl der Standard, als auch die Proben je 50µl Lösung 5. Danach wurden alle Gefäße für 30 Minuten bei 37°C im Heizblock belassen und im Anschluss daran für 30 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Vom entstandenen Überstand wurden je 200µl in ein Well einer 96 Well Platte

pipettiert (siehe Abbildung 3.4). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte eine Messung im Photometer bei 595nm Wellenlänge.

3.4.3.5 Probenvorbereitung nach Lämmli

Nach Bestimmung des Proteingehalts im Lowry Assay, wurde das jeweilige Probenvolumen mit einem Proteingehalt von 10µg auf ein immer gleiches Gesamtvolumen von 45µl mit RIPA ergänzt. Jede Probe erhielt daraufhin 15µl 4x Lämmli, sowie 1,8µl 0,5M DTT. Die Proben wurden bei 95°C für 10 Minuten in einen Heizblock denaturiert. Nach dieser Zeit wurden die Proben durch Anzentrifugieren wieder am Boden des Reagenzgefäßes gesammelt.

Zusammensetzung des 4x Lämmli:

Tris 1M pH 6,8	2,5ml
SDS 20%	4,0ml
Glycerin	2,0ml
DTT	154mg
Bromphenolblau	1,0mg
H ₂ O	1,5ml

3.4.3.6 Gel-Elektrophorese

Das SDS-Gel wurde in einer Elektrophoresekammer platziert und sowohl die obere Seite als auch die untere Seite des Gels in Kontakt zum Laufpuffer gebracht. Die Unterseite der Glasvorlage wurde von Schaum befreit, um einen direkten Kontakt des Gels zum Puffer zu gewährleisten. Um eventuell vorhandene Reste von Acrylamid zu beseitigen, wurden die Taschen nach Entfernen der Taschenkämme mit Laufpuffer gespült. Dann wurden mit einer Hamilton Spritze die Proben in die einzelnen Taschen pipettiert. Die eingesetzte Probenmenge betrug jeweils 60 µl. Ein Molekulargewichtsmarker wurde jedem Lauf beigefügt. Durch das Anlegen einer Spannung von 200 Volt erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. In Abhängigkeit von der Proteingröße und des Polymerisationsgrades des Polyacrylamidgels dauerte ein Lauf ca. 2-4 Stunden. Die farbliche Markierung der

Proben in dem farblosen Gel ließ eine optische Kontrolle zu. Proteine des Markers dienten zur Orientierung, wie sich die Proteine auftrennen und welche Proteingröße auf dem Gel an welcher Stelle zu sehen ist.

Zusammensetzung des Laufpuffers:3,5

10x: Glycin	576g	1x: 100ml	10x Laufpuffer
Tris	121,4g	900ml	H ₂ O
Aqua bidest.	ad 4l.	10ml	SDS 10%

3.4.4 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben folgten weitere Verfahren zur Identifizierung bestimmter Proteine.

Mit der Western Blot Technik können Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden, die den mechanischen Anforderungen der Folgeschritte genügt. Nach dem Transfer der Proteine folgte eine Ponceau-Färbung. Dieser Schritt diente zur Überprüfung, dass gleiche Mengen des Probenmaterials im Blot-Schritt tatsächlich aus dem Gel in die Membran transferiert haben. Damit können die mittels Ponceau-Färbung dargestellten Banden auch als Bezugsgröße für das gesuchte Protein dienen. Eine qualitative Bewertung der Proben lässt diese Methode allerdings nicht zu. Auch eventuell degradierte Proteine ließen sich an dieser Stelle nicht als solche erkennen. Die Dauer des Blot-Vorgangs und die Porengröße der Membran bestimmen, ob die Proben die Membran erreicht haben oder sogar schon wieder die Membran durchlaufen und verlassen haben.

Anwendung fand hier das sog. Semidry Blotverfahren. Hierbei befinden sich das Acrylamidgel, die Membran sowie einige Filterpapiere sandwichartig geschichtet übereinander (siehe nachstehende Abb. 3.4).

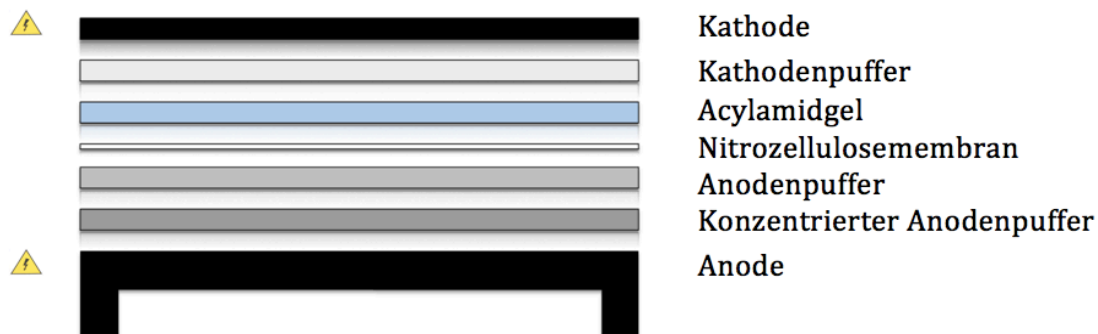


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Sandwichstruktur des Semidry Blotverfahrens.

Die Abmessungen der Membran sowie der verwendeten Filterpapiere wurden genau auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Filterpapiere dienten als Reservoir für Pufferlösungen unterschiedlicher Ionenkonzentration. Die Anordnung aller Bestandteile erfolgte in einer Kammer. Die Kontaktflächen mit der Kammer waren deren Boden und deren Deckel. Diese stellten Kathode und Anode dar. Die Filter-Acrylamidgel-Membran-Filter-Anordnung schloss somit den später angelegten Stromkreis. Die Membran wurde zuerst in Anodenpuffer durchfeuchtet. Jeweils drei Filterpapiere wurden in Anodenpuffer, höher konzentriertem Anodenpuffer und Kathodenpuffer getränkt. Mit der Anode (Kammerboden) beginnend wurde die Anordnung in folgender Weise zusammengesetzt: Filterpapier mit höher konzentriertem Anodenpuffer – Filterpapier mit konzentriertem Anodenpuffer – Membran – Polyacrylamidgel – Filterpapier mit Kathodenpuffer (siehe Abb. 3.6). Da Luftblasen und Areale ohne ausreichende Menge der Pufferflüssigkeit den Stromfluss unterbrechen und den Proben transfer beeinträchtigen würden, wurden alle Bestandteile einzeln platziert und auf Blasenfreiheit und ausreichende Befeuchtung geachtet. Mit einer Glaspipette und maßvollem Druck konnten Luftblasen zum Rand hin ausgestrichen werden, ohne die Pufferlösung mit auszustreichen. Der Blotvorgang erfolgte, je nach Proteingröße, für 1-3 Stunden bei einer Stromstärke von $1,5 \text{ mA/cm}^2$. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran aus der Kammer entnommen und mit Aqua-bidest. von Pufferresten bzw. Gelresten befreit. Die Proben waren somit lagestabil in der Membran bei gleicher Position zueinander und zum jeweiligen Marker. Nun konnten die Proteine mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden.

Zusammensetzung der Blotpuffer:

10 x Anodenpuffer:

Tris; 300mM	36,3 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	800 ml
pH 10,4	

1 x Anodenpuffer:

Tris; 30mM	3,63 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	800 ml
pH 10,4	

Kathodenpuffer:

Tris; 25mM	3,03 g
6- Aminohexansäure; 40mM	5,25 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	800 ml
pH 9,4	

3.4.5 Immunfärbung

Das zugrundeliegende Prinzip der Immunfärbung liegt in der Antikörper-Antigen-Bindung bzw. Antikörper-Antikörper-Bindung begründet. Dabei stellt das gesuchte Protein das Antigen dar. Der Erstantikörper bindet daran und stellt seinerseits das Antigen für den Zweitantikörper dar. Dieser Zweitantikörper ist mit dem Enzym HRP (horseradish peroxidase) markiert, d.h. die HRP ist an ihm gebunden. Diese Peroxidase kann ein zugesetztes Substrat, nämlich Luminol, oxidieren. Damit wird

der Primärantikörper, der an dem Probenprotein gebunden ist, indirekt sichtbar gemacht. Sein Signal wird detektierbar.

Die vorher genannten Verfahren sind zeitintensiv. Darum mussten die durch das Blotverfahren gewonnen Membranen getrocknet und kühl (4°C) gelagert werden. Die getrockneten Nitrozellulosemembranen waren zu diesem Zeitpunkt noch Ponceau-gefärbt. Durch zwei 15-minütige Waschschrte in Waschlösung auf einem Taumler, wurde das Ponceau-Rot ausgewaschen. Darauf wurde die Membran für eine Stunde in Blocklösung gegeben, um die nicht spezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Eine Bindung der Antikörper an ihre spezifischen Bindungsstellen wurde somit erleichtert. Das Hintergrundsignal bei der Detektion konnte somit reduziert werden und eine präzisere Analyse und Auswertung erfolgen. Um ungewollte Interferenzen zwischen den verschiedenen Inkubationslösungen zu verhindern, wurde die Membran zweimal für 15 Minuten in Waschlösung auf dem Taumler gewaschen. Die Inkubation mit dem gelösten Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, ebenfalls auf dem Taumler. Es folgten zwei Waschschrte für 15 Minuten in Waschlösung auf dem Taumler, dann wurde die Membran für eine Stunde mit dem gelösten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten in Waschlösung auf dem Taumler geschwenkt und danach für 1 Minute in ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) geschwenkt. Durch Reaktion mit dem am Zweitantikörper haftenden HRP wird das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol (sowie dessen Derivate) oxidiert. Die oxidierte Form ist lichtemittierend. Diese Lichtemission (chemiluminescence) zeichnet sich als Licht-Bande(n) ab. Diese wurde in einem Chemilumineszenz-Aufnahmegerät detektiert. Zur Auswertung wurde die Stärke des Signals des gesuchten Proteins in ein relatives Verhältnis zu einem nicht regulierten Protein, entweder Vinkulin oder Aktin, gesetzt. Erst dadurch können Veränderungen in der Menge des gesuchten Proteins als solche nachgewiesen werden. Die zur Auswertung der Daten herangezogene Software war das Programm Quantity®one.

Zusammensetzungen des TBS und der verwendeten Lösungen:

1xTBS:

Tris	1 mM
NaCl	15 mM
pH 7,4	

Waschlösung:

Tween 20	0,1 %(vol/vol)
1xTBS	ad 1 l

1. Antikörperlösungen für:

eNOS

Blocklösung mit 5% BSA	10 ml
rabbit-anti-eNOS-Antikörper	5 µl

pSMAD1

Blocklösung mit 5% BSA	10 ml
rabbit-anti-pSMAD1-Antikörper	10 µl

SMAD2

Blocklösung mit 5% BSA	10 ml
mouse-anti-SMAD2-Antikörper	10 µl

pSMAD2

Blocklösung mit 5% MMP 10 ml

rabbit-anti-pSMAD2-Antikörper 10 µl

SMAD3

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-SMAD3-Antikörper 10 µl

pSMAD3

Blocklösung mit 5% BSA 10ml

rabbit-anti-pSMAD3-Antikörper 10µl

SMAD4

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-SMAD4-Antikörper 10 µl

SMAD5

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-SMAD5-Antikörper 10 µl

SMAD6

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-SMAD6-Antikörper 10 µl

Bax

Blocklösung mit 5% MMP 10 ml

rabbit-anti-Bax-Antikörper 10 µl

Bcl-2

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-Bcl-2-Antikörper 10 µl

TGF-β

Blocklösung mit 5% BSA 10 ml

rabbit-anti-TGF-β-Antikörper 10 µl

Zweitantikörperlösungen:

je nach Spezies z.B.:

Blocklösung mit 5% MMP 10 ml

anti-mouse-HRP-Antikörper 5 µl

Blocklösung mit 5% MMP 10 ml

anti-rabbit-HRP-Antikörper 5 µl

3.5 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

3.5.1 Einführung in die Methode

Der EMSA ist eine Nachweismethode für DNA-bindende Proteine. Dies können z. B. Transkriptionsfaktoren sein. Beim EMSA werden Proteine bzw. Proteinkomplexe mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid inkubiert und zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren in einer nativen Gel-Elektrophorese aufgetrennt. DNA-Sequenzen enthalten meist einen regulatorischen Bereich eines Gens, den Promotor oder Enhancer. Die Gel-Elektrophorese lässt in einem elektrischen Spannungsfeld ein Durchlaufen der Proben durch die Gitterstruktur eines Gels zu. Die Geschwindigkeit der Proben hängt dabei von deren molaren Masse ab. Nicht gebundene DNA läuft somit schneller als DNA, an die Faktoren / Proteine gebunden haben. Die fluoreszierenden Banden werden in einem Fluorimager gescannt und sichtbar gemacht.

3.5.2 Kernextraktion bei Mäuseherzen

Das isolierte Mäuseherz (siehe 3.2) wurde mit 1ml Schwellungspuffer versetzt und bei 5.000 rpm zweimal bis viermal für 20 Sekunden unter optischer Kontrolle in einem Homogenisator (Precellys® 24, VWR International, Wien) homogenisiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 40 Minuten auf Eis gestellt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt von 8 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und 1 ml Homogenisierungspuffer auf das Pellet gegeben. Mittels eines Vortexer® wurde das Material mit dem Homogenisierungspuffer durchmischt. Nun wurde das Reagenzgefäß für eine Minute auf Eis gestellt. Der Homogenisierungsschritt erfolgte in einem speziellen Glaspotter mit einem ca. 8cm langen, parallelwandigen Schaftteil (15ml Fassungsvermögen) mit kongruentem Teflonpistill. Die Bedienung erfolgte rein manuell; einer zu starken Schaumbildung konnte so gut vorgebeugt werden. Es erfolgten fünfzehn Durchbewegungen über die gesamte Arbeitslänge des Potters. Im Anschluss wurde das Homogenisat in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut für 8 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 300µl Storagepuffer zu dem Pellet hinzugegeben. Auf dem Taumler wurde das Pellet für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein

Zentrifugationsschritt über 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C folgte. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zusammensetzung der Puffer:

Schwellungspuffer:

Tris-HCl, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1,0 mM
DTT (1:500)	1,0 mM

Homogenisierungspuffer:

Saccharose	300 mM
Tris-HCl, pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DTT	1,0 mM
Triton x-100	0,3% (wt/vol)

Storagebuffer

NaCl	300 mM
KCl	50 mM
HEPES (pH 7,5)	10 mM
DTT (1:500)	1,0 mM
Ethylendiamintetraacetat	1,0 mM
PMSF (1:100)	1,0 mM (wt/vol)

3.5.3 Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide

Um die Bindung der Proteine an die Oligonukleotide, sowie die Menge an gebundenem Oligonukleotid detektieren zu können, wurden die Oligonukleotide fluoreszenzmarkiert. Es wurden hierzu 20ng des zu markierenden Oligonukleotides mit

10x NE-Buffer		5 µl,
CoCl ₂ (2,5 mM)		5 µl,
Cy3-dCTP	(10mM)	2,5 µl und
Terminale Transferase	(20 U/µl)	0,5 µl versetzt.

Es wurde mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde im Thermocycler für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt.

Zusammensetzung des NE-Puffers:

Tris-HCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
DTT	1,0 mM

(pH 7.9)

Es wurden folgende Oligonukleotide fluoreszenzmarkiert:

SBE	5' - G T A C A T T G T C A
	<u>G T C T A G A C A T A C T</u> - 3'
AP1	5' - A T C C G C T T G A
	<u>T G A G T C A G C C G G A A</u> - 3'

3.5.4 Durchführung des EMSAs im nativen Gel

3.5.4.1 Probenvorbereitung

Für die Analysen wurden stets gleiche Konzentrationen eingesetzt. Die unterschiedlichen Volumina der Proben wurden mit TXN-Puffer auf ein Volumen von 10µl ausgeglichen. Danach wurden je 7,5µl Mix 1 zugegeben. Dieser bestand aus 0,5µl dIdC, sowie 7µl TXN-Puffer. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 30°C im Thermocycler inkubiert. Danach wurden je 2,5µl Mix 2 zugegeben. Dieser bestand aus 1µl des markierten Oligonukleotids mit 1,5µl TXN-Puffer. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert.

Zusammensetzung des TXN-Puffers:

Glycerin	10% (vol/vol)
Tris/HCl	20,0 mM
KCl	5,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
DTT	3,0 mM
PMSF	0,2 mM

3.5.4.2 Herstellung des nativen Gels

Für die Herstellung des nativen Gels wurde eine Glasvorlage aus zwei Glasplatten identischer Größe montiert. Entlang zweier gegenüberliegender Seiten wurde je ein Spacer (1,5mm) platziert; diese schlossen bündig mit den Kanten der Glasplatten ab. Durch zwei Schraubklemmen, im Bereich der Spacer, wurden die Einzelteile verbunden. Die Glasvorlage wurde mit den geöffneten Seiten nach oben und unten orientiert in einem Standfuß befestigt. Die untere geöffnete Seite wurde mit Parafilm® Laborfilm verschlossen. Die untenstehende Acrylamid-Lösung wurde umgehend blasenfrei in die vorbereitete Glasvorlage eingefüllt und ein Kamm zum Formen der Geltaschen eingebracht. Das Gel polymerisierte für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Polymerisation werden Taschenkamm und Parafilm® entfernt.

Zusammensetzung des nativen Gels:

AA/BA (80/1) 40%	4 ml
5xTBE-Puffer	4 ml
Glycerin	1 ml
H ₂ O ad	40 ml
TEMED	34 µl
APS 10%	200 µl

Zusammensetzung des 5xTBE-Puffers:

Borsäure	445 mM
EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O	10 mM
Tris / HCl	445 mM

3.5.4.3 Durchführung des Assays

Das Gel wird in einer Elektrophoresekammer platziert. Diese wird mit 0,5x TBE-Puffer befüllt. Die Kammer besitzt einen Deckel, der das Befüllen der Oberseite des Gels samt Probestaschen erlaubt. Das am Deckel befestigte Gel schwebt frei über dem Kammerboden. Dieser wird ebenfalls mit Puffer befüllt. Das Gel schließt den Stromkreis zwischen beiden Teilbereichen der Kammer. Die Elektrophorese wird stets bei 4°C durchgeführt. Nachdem Luftblasen, die den Stromfluss unterbrechen würden, entfernt und die Probestaschen gespült wurden, wird ein sog. Vorlauf von 10-30 Minuten bei 60V durchgeführt. Danach werden die Taschen nochmals gespült und die Taschen mit den Proben beladen. Zur optischen Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke wird eine Tasche mit einem farbigen Marker (gefärbter TAE-Puffer) beladen. Der Probenlauf wird für ca. 2,5h bei 150V durchgeführt. Direkt im Anschluss wird das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, die Schraubklemmen entfernt und die Oberfläche der Glasplatten schlierenfrei gereinigt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt in einem Fluoi-mager®.

3.5.5 Auswertung des EMSAs

Das im Fluorimager® aufgenommene Foto zeigt das Laufgel in seiner gesamten Ausdehnung. So kann der Verlauf aller Proben bzw. die Position aller Banden vollständig überblickt werden. Der sog. Shift der gesuchten Banden ist auf die erhöhte molekulare Masse des Gesamtmoleküls nach Bindung eines Proteins an die zugegebenen Oligonukleotide zurückzuführen. Dadurch ordnen sich die Banden weiter oben im Gel an. Dies entspricht einer geringeren Laufstrecke, als dies bei Proben, ohne gebundene Proteine, der Fall wäre. Der an das Oligonukleotid gebundene Fluoreszenzfarbstoff liefert das Signal für den Photoimager. Die Signalstärke entspricht im Foto der Schwärzung der jeweiligen Bande (siehe Abbildung 3.6). Die geshiftete Bande repräsentiert die Menge an gebundenem, markierten Oligonukleotid. Ungebundene Oligonukleotide besitzen aufgrund ihrer geringeren molekularen Masse eine höhere Laufgeschwindigkeit und ordnen sich weiter unten im Gel an. Die Signalstärke der geshifteten Banden können mit Hilfe der Software Quantity®one quantitativ erfasst werden.

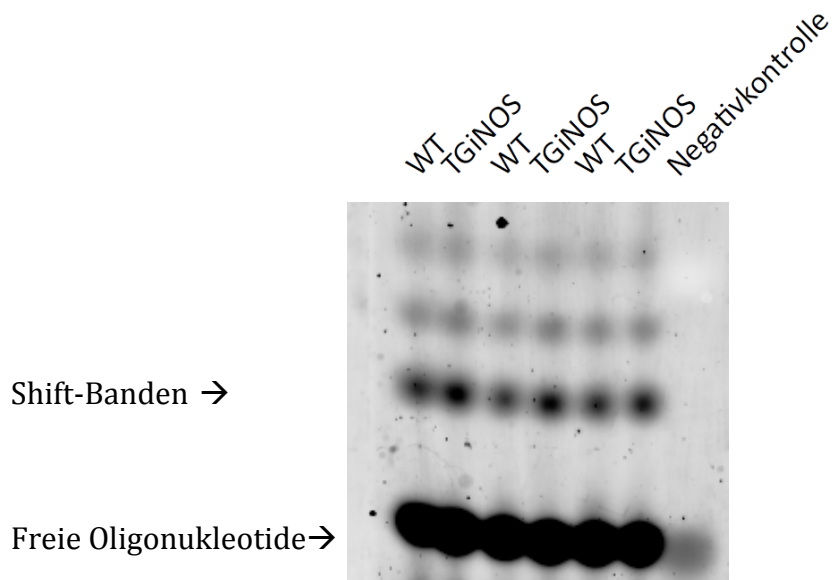


Abb. 3.7 Fotoaufnahme des Fluoreszenzsignals eines EMSAs zum Nachweis der Bindungsaktivität von SMAD-Proteinen. Es wurden sechs Proben aufgetragen. Links beginnend wurden abwechselnd Proben von Wildtyp-Mäusen gefolgt von Proben von TGiNOS-Mäusen aufgetragen. Ganz rechts befand sich eine Negativkontrolle. Bei dieser zeigte sich keine Shift-Bande.

Zum Nachweis der Spezifität der zugrundeliegenden Bindung kann eine sog. kompetitive Bindung durchgeführt werden. Dabei erhalten die Proben in einem zusätzlichen Inkubationsschritt vor Zugabe der markierten Oligonukleotide, unmarkierte Oligonukleotide in 50-fach höherer Konzentration. Gehen die unmarkierten Oligonukleotide bereits eine Bindung zu den Proteinen der Probe ein, können die danach zugegebenen markierten Oligonukleotide nicht mehr binden. Die Folge ist im Fall einer vollständigen Besetzung aller möglichen Bindungsstellen, dass sich keine Shift-Bande in dieser Probe detektieren lässt.

3.6 Präparation isolierter Kardiomyozyten

Die unter 2.1 beschriebenen Tiere wurden mittels CO₂ narkotisiert, getötet und thorakotomiert. Das Herz wurde mit samt der Lungen entnommen und in eine Schale mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) überführt. Das Herz wurde von den Lungen getrennt. Unter Vergrößerung mittels binokularem Operationsmikroskop (Leica, Wetzlar) wurde der Aortenbogen freipräpariert und dargestellt. Die Aorta wurde proximal des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Mit feinen Pinzetten wurde das Lumen der Aorta vorsichtig geweitet und über eine Kanüle platziert. Dabei wurde darauf geachtet, ein zu tiefes Eindringen der Kanüle und damit eine mögliche Schädigung der Aortenklappen zu verhindern. Die Position des Herzens an der Kanüle wurde mit einer Mikroklemme, die möglichst distal an der Aorta platziert wurde, gesichert. Dies erlaubte, das zusätzliche Anlegen einer Ligatur. Die eigens für diese Methode modifizierten Kanülen besaßen eine nicht schneidende, rechtwinklig zur Kanülenachse eingekürzte und entgratete Spitze, sowie eine ca. 2,5mm von dieser entfernt liegende zirkuläre Einkerbung. Die Ligatur kam in dieser Einkerbung zu liegen. Mit einer luftblasenfrei angeschlossenen Spritze wurde das Herz retrograd gespült. Zur optischen Kontrolle, das Herz korrekt auf der Kanüle positioniert zu haben, diente die deutlich sichtbare Volumenzunahme des Herzens und v.a. das Verblässen der Oberfläche insbesondere der Koronargefäße. Das Herz wurde blasenfrei an eine mit 45ml Powell-Medium gefüllte Perfusionsanlage angehängt und mit einer Durchflussmenge von ca. 1 Tropfen/min blutfrei retrograd perfundiert (siehe Abbildung 3.8). Die ersten 5ml, die das angehängte Herz durchflossen, wurden verworfen. Der Kreislauf der Anlage wurde geschlossen, und das

Perfusionsmedium mit 20mg Kollagenase (Biochrom, Berlin), die in 5ml Powell-Medium gelöst wurden, versetzt. Die Zirkulation wurde 25min lang durchgeführt. Das Herz wurde von der Kanüle so abgetrennt, dass die Aorta, sowie die Vorhöfe an der Kanüle verblieben. Das so erhaltene Ventrikelgewebe wurde zur Herzspitze hin eingeschnitten. Ein zweiter Schnitt wurde um 90° versetzt durchgeführt und das Gewebe mit einem Gewebehacker (Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen) bei einer Schnittbreite von 0,7mm mechanisch zerkleinert. Es folgte ein Nachverdau in 5ml des Kollagenase-Puffers für 5 Minuten. Dabei wurde das Gewebe wiederholt mit einer 10ml Pipette eingesaugt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur durch ein Nylonnetz mit 200µm Porengröße filtriert, um Bindegewebsstücke abzutrennen. Das Filtrat wurde für 3 min bei 400 rpm zentrifugiert (Bigifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode/Harz), um Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie z.B. Endothel-Zellen, von intakten Myozyten zu trennen. In vier Schritten wurden die Zellen mit in Powell-Medium gelöstem CaCl₂ von jeweils 125µM, 250 µM, 500 µM und 1000 µM aufgenommen. Dazu folgte jeder Zugabe von 2ml der jeweiligen Lösung ein Zentrifugierschritt mit 300 Upm, für eine Minute. Der Überstand oberhalb des Pellets wurde vorsichtig abgenommen, so dass nur die frei im Medium schwebenden, kaputten Kardiomyozyten entfernt wurden. Umgehend wurde das verbleibende Pellet mit der nächst höher konzentrierten Lösung versetzt. Dieses Vorgehen wurde bis zur Konzentration von 1000 µM CaCl₂ wiederholt und endete mit dem Abnehmen des entstandenen Überstandes. Es verblieb ein Sediment aus aggregierten, vorwiegend intakten Zellen. Die Zellen wurden umgehend für die Kurzzeitkultur in modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT-Medium) resuspendiert. 35mm Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3004) wurden mindestens zwei Stunden zuvor mit 1ml modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT plus 2% Penicillin/Streptomycin, plus 10µl Laminin) vorplattiert und bei 37°C im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Osterode/Harz) aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der im Kulturmedium resuspendierten isolierten Zellen, wurde das Vorplattiermedium von den Kulturschalen abgesaugt. Je 1ml der Zellsuspension wurden in eine 35mm Kulturschale ausplattiert. Nach einer Stunde haben sich die stäbchenförmigen, intakten Kardiomyozyten am Boden der Kulturschale angeheftet. Die im Medium schwimmenden, abgerundeten, devitalen Zellen konnten zusammen mit dem

Medium vor Beginn der Versuche abgesaugt werden. Das abgesaugte Medium wurde durch vorgewärmtes Medium (37°C) ersetzt.



Abb. 3.8 Abgebildet ist der Präparationsplatz mit dem verwendeten Operationsmikroskop (Leica, Wetzlar), zur genauen Präparation der Aorta. Die Kanüle musste in der Aorta so platziert werden, dass das Herz retrograd durch die Koronargefäße perfundiert werden konnte. Die Position des Herzen auf der Kanüle wurde mit einer Mikroklemme und einer zusätzlichen Ligatur gesichert. Die Ligatur wurde über einer zirkulär um die Kanüle verlaufenden Einkerbung platziert, um ein Verschieben zu verhindern.

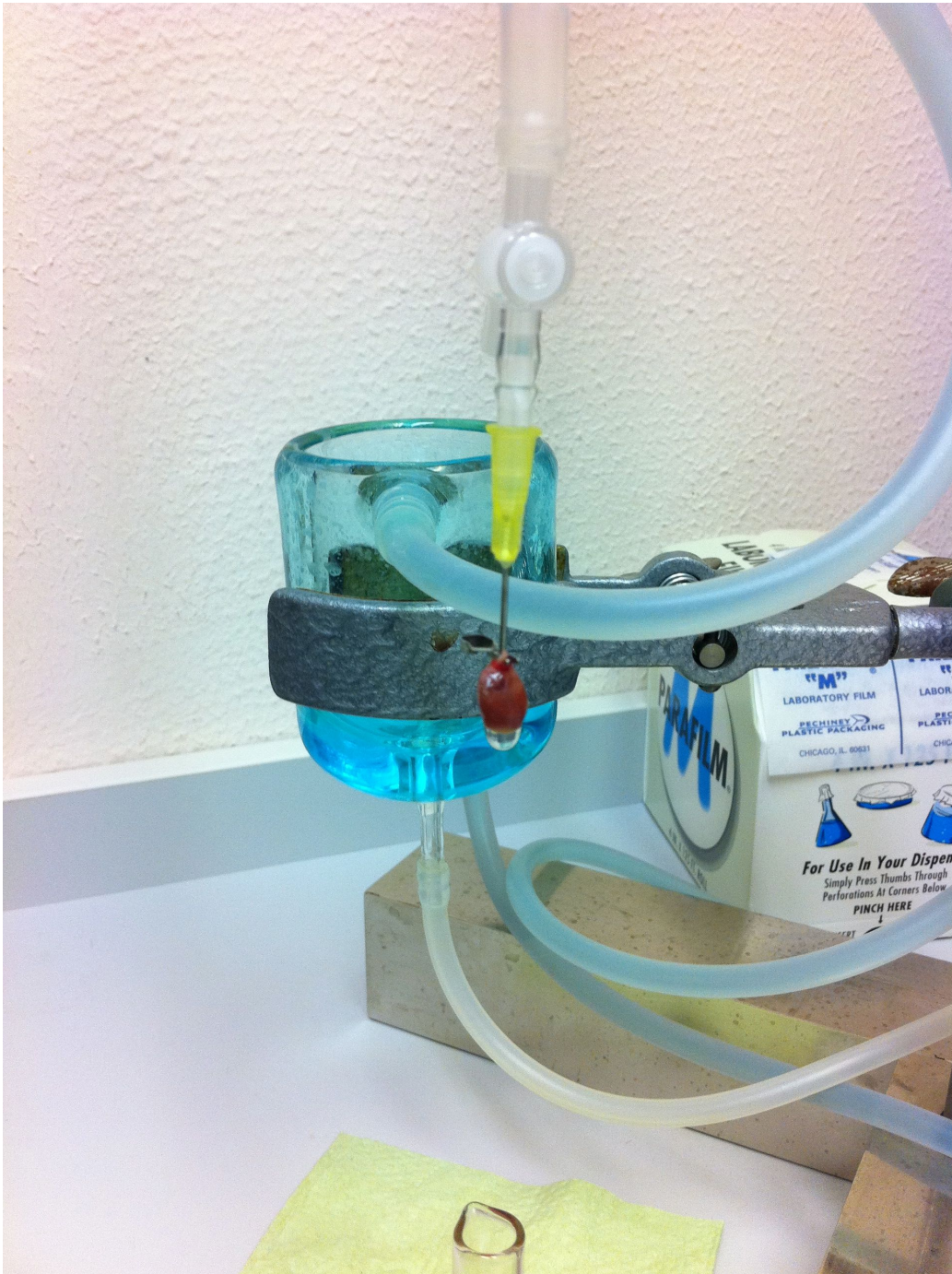


Abb. 3.9 zeigt ein zur retrograden Perfusion präpariertes Mäuseherz. Dieses wurde bereits an die Langendorff-Apparatur angehängt. Das Herz wurde zum Zeitpunkt der Aufnahme zunächst mit Powell-Medium perfundiert, bevor anschließend der im Hintergrund zu sehende, mittels eines internen Flüssigkeitskreislaufs bei konstant 37°C temperierten Auffangbehälter unter dem Herzen platziert und der Kreislauf der Langendorffapparatur somit geschlossen wurde.

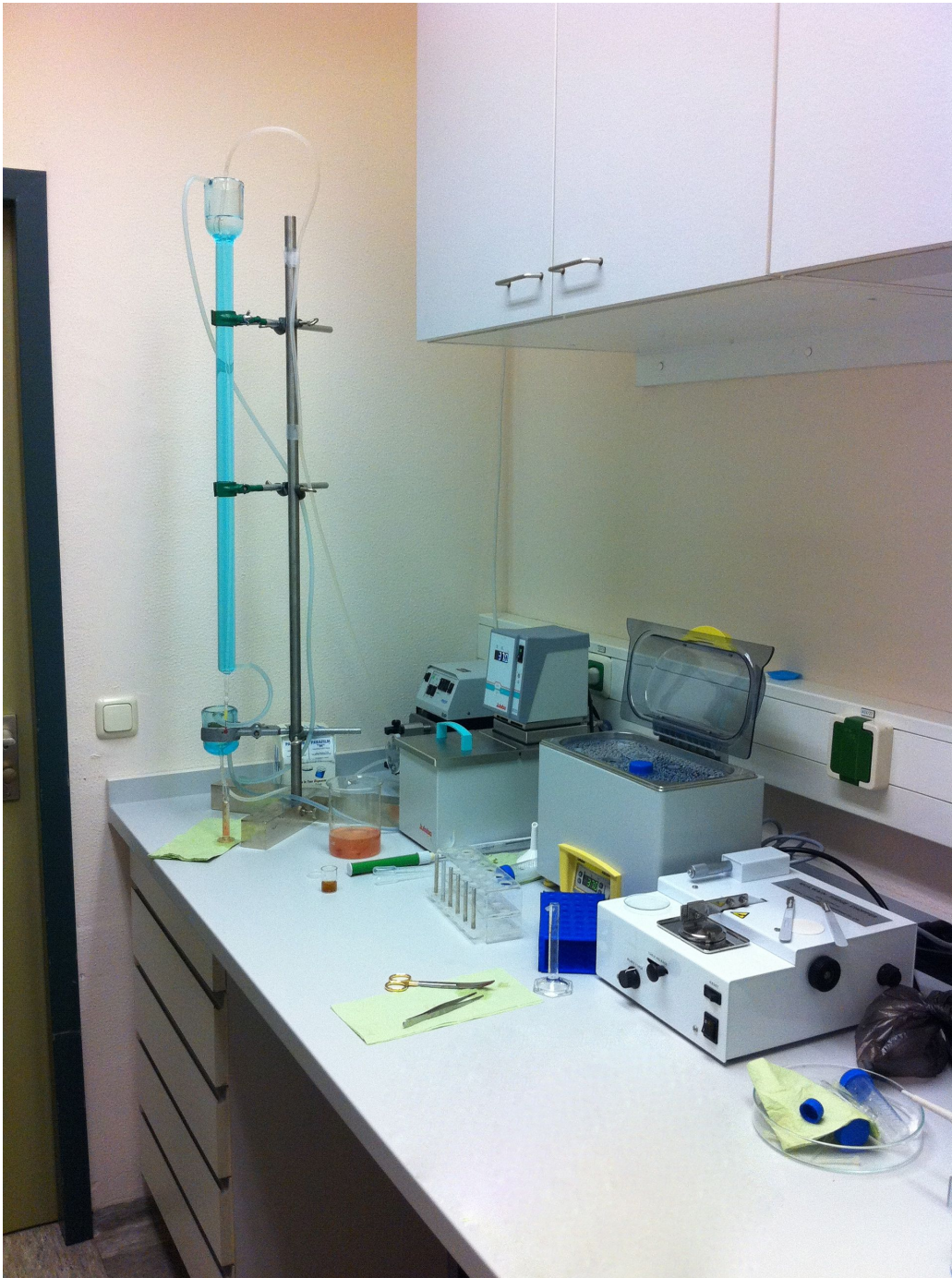


Abb. 3.10 zeigt die Langendorffapparatur, sowie von links nach rechts: eine Rollerpumpe, die das Powell-Medium innerhalb der Langendorffapparatur befördert, eine Warmwasseranlage zur Temperierung der Langendorffapparatur, ein Wasserbad zur Temperierung der verwendeten Medien, sowie ein Tissue-Chopper zum ersten Aufbereiten der perfundierten Herzen.

3.6.1 Probenvorbereitung

Nachfolgende Untersuchungen erfolgten als Akutversuch. D.h., dass sich die Messungen unmittelbar an die Zellpräparation in 3.6 anschlossen. Die Kontraktionsparameter wurden entweder ohne Zugabe von Reagenzien, unter Zugabe von Isoprenalin, zur Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren, oder unter Zugabe von TGF- β_1 , zur Induktion der Apoptose, durchgeführt.

Zusammensetzung der Medien und Puffer:

Powell-Medium:

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
Glukose	11,0 mM

M199/HEPES Stammlösung:

2 Pakete M199 (9,62 g/l) HEPES 15,1 mM

Ad 10l Aqua bidest.

pH 7,4

CCT-Puffer:

M199 / HEPES-Stammlösung	x ml
Kreatin	5 mM
Karnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IE / ml
Streptomycin	100 µg / ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM

Vorplattiermedium:

CCT-Medium	3 ml
Laminin	10 µl

Ausplattiermedium / Waschmedium für isolierte Kardiomyozyten

CCT-Medium	x ml
Streptomycin/Penicillin	2 %
Gentamycin	0,1 %

10 x PBS

KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	8,1 mM

3.7 Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld

3.7.1 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzellkontraktion

Die Kulturschale wurde in eine formkongruente Aussparung eines Objektisches eines Mikroskops eingelassen und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesen Deckel waren vier Bohrlöcher in der Weise angeordnet, dass sie annähernd die Eckpunkte desjenigen Quadrates bildeten, welches die größtmögliche Fläche des kreisförmigen Deckels einschließt. Der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen wurde, war durch eines dieser Löcher in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in das Medium in der Kulturschale eintauchen konnte. Durch ein benachbartes Bohrloch wurde dieser wieder nach außen geführt. Dabei war er so gebogen, dass er annähernd senkrecht in das Medium eintauchte, dann rechtwinklig abbog, um parallel zur Oberfläche des Mediums zu verlaufen und durch eine weitere rechtwinklige Biegung das Medium senkrecht zur Oberfläche verließ. Mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfuhr man auf die gleiche Weise. In der mit diesem Deckel geschlossenen Kulturschale lagen sich also zwei horizontal verlaufende Drähte gegenüber, die beide in den Puffer eintauchten. Die beiden Drähte stellten Kathode und Anode in der Schale dar. Wurden sie an den Stimulator angeschlossen, baute sich zwischen ihnen ein elektrisches Feld auf, das aufgrund der Form des Drahtes einem homogenen Feld angenähert war und so zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähten führte. Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken, entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen mit unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstossfrequenz als Kontraktionsfrequenz vorgab. Zellen, welche die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt. Man konnte nun den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorgeben, indem man die Stimulationsfrequenz änderte.

3.7.2 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Während der Stimulation der Zellen befand sich die Kulturschale auf dem Objektisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war es möglich, die Zellen bei ihren Kontraktionen zu beobachten. An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der anderen handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, Zellgrenzen zu erkennen, da sie verschiedene Helligkeiten wahrnehmen konnte, so auch den Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Übergang an der Grenze zwischen Zelle und Hintergrund. Um nun eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man die Zeilenkamera so positionieren, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu bewegte man die Kulturschale so, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, und drehte dann die Zeilenkamera, bis man am Videobild sehen konnte, dass sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden. Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5V/div (div Abkürzung für: „diversion“, bezeichnet einen Block/Bereich der Skalierung z.B. eines Anzeigeegerätes) geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert. Der Oszillograph begann so die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Kontraktion ihrer Position. So veränderte sich auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog. Die Information „Interface Spannung“ „an“ bzw. „Interface-Spannung“ „aus“ wurde vom Oszillograph an das Interface weitergegeben, welches wiederum an einen

Computer weitergeleitet wurde. Auf diesem PC lief das Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH. Dieses Programm registrierte aus der Information – Spannung an bzw. Spannung aus – die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve welche die Kontraktion der Zelle darstellte. Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus dem jeweiligen 5 Einzelmessungen:

Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern

Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometern

Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (“Time-to-Peak”) in Millisekunden

Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)

Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde

Die Zeit von der 10%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden (“T10-to-Peak”)

Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke (“R90-Wert”)

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

Der Quotient $\frac{\Delta L}{L}$: Man bildet den Quotienten aus systolischer und diastolischer Zelllänge (ΔL). In Prozent ausgedrückt zeigt die $\Delta L/L$ an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.

Die Con_{max} als Ratenkonstante für maximale Kontraktionsgeschwindigkeit:

Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Zellverkürzung bestimmt und in $\mu\text{m/s}$ angegeben.

Die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Relaxation bestimmt und in $\mu\text{m/s}$ angegeben.

3.7.3 Messprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 4Hz viermal ausgemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Danach wurde die Zelle in gleicher Weise bei 2 Hz und 1 Hz ausgemessen. Die so erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden in das Programm Excel übertragen und weiter verarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichungen und Median bestimmt.

3.8 Apoptosenachweis

3.8.1 Caspase-3/7 Assay

Der eingesetzte Caspase Assay (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega, USA) dient der Messung der Caspase 3 und 7- Aktivität. Caspase 3 und 7 sind Angehörige der cysteine aspartic acid-specific protease-Familie. Caspasen spalten Peptidbindungen am C-terminalen Ende der Aminosäure Aspartat. Die Caspase-Aktivität ist spezifisch für Apoptose. Der Nachweis der Aktivität der Caspase 3 und 7 gibt direkten Hinweis auf das Vorliegen apoptotischer Prozesse. Diese Caspasen sind Effektor-Caspasen, die durch Initiator-Caspasen (Caspase 8 und 9) aktiviert werden. Die Effektor-Caspasen spalten zelluläre Strukturproteine wie Aktin und Laminin; aktivieren aber auch Nukleasen, die wiederum nukleäre DNA abbauen.

3.8.2 Durchführung der Methode

Die Präparation der Kardiomyozyten wurde analog zu 3.6 vorgenommen.

Die Zellen wurden direkt nach ihrer Präparation in CCT-Medium ausplattiert. Zur Durchführung des Versuchs wurde eine schwarze 24-Well-Platte verwendet. Die Versuchsanordnung enthielt Kardiomyozyten der transgenen Tiere, sowie Kontrollen (Kardiomyozyten der Wildtypen). Die Zellen eines Herzens wurden in 6 Wells zu je 500µl ausplattiert. Die Wells wurden mindestens 2 Stunden zuvor (oder am Vortag) mit je 10µl Laminin in 3 ml CCT-Medium befüllt und im Brutschrank bei 37°C gelagert. Direkt vor dem Ausplattieren wurde das Medium abgesaugt. Eine Stunde nach dem Ausplattieren wurden die Zellen gewaschen. D.h. alle Zellen, die nicht am Boden der Wells an das Laminin gebunden hatten, wurden

mit dem CCT-Medium abgesaugt. Die Wells wurden mit 200µl CCT-Medium versetzt. Dieses Medium war für vier der sechs Wells unbehandelt. Für zwei Wells wurde das Medium mit 3 ng/ml TGF-β₁ versetzt. Nach zwei Stunden wurden zwei weitere Wells abgesaugt und mit 200µl CCT-Medium mit TGF-β₁ befüllt. Nach weiteren vier Stunden wurde in alle Wells 200µl Caspase-Glo®-Mix gegeben. Damit erfolgte die Messung 4 Stunden bzw. 6 Stunden nach TGF-β Inkubation in einem Photometer.

Um Schwankungen in der Zahl der Kardiomyozyten je Well herausrechnen zu können, wurden die Zellen geerntet und quantitativ analysiert. Als Methode wurde hier die Proteinmengenbestimmung nach Bradford durchgeführt.

3.8.3 Bestimmung des Proteingehalts

Die angewandte Methode nach Bradford (1976), wie auch nach Lowry, greifen auf eine photometrische Messung zurück. Farbstoffe sind: Triphenylmethanfarbstoff und Coomassie-Brilliant-Bau G250. Die Absorption des Farbstoffs liegt bei 465nm, die des Proteinkomplex bei 595nm. Photometrischen Messungen liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde.

$$A = \epsilon \times c \times d$$

(A=Absorption, ϵ =molarer Extinktionskoeffizient, d=Schichtdicke, c=Konzentration der absorbierenden Substanz)

Dieses besagt, dass die Extinktion direkt proportional zur Schichtdicke des durchstrahlten Körpers und der Konzentration des durchstrahlten Stoffes ist. Gemessen wird die Intensitätsschwächung eines monochromatischen Lichtstrahls bekannter Wellenlänge nach dem Durchstrahlen einer absorbierenden Probe bekannten Volumens in einem bekannten Abstand. Somit bleibt die Konzentration der Probe die einzige Unbekannte der Formel und es kann nach ihr aufgelöst werden. Um den intensitätsschwächenden Einfluss des Gefäßes, welches die Proben trägt (96 well plate) und der zugegebenen Reagenzien nicht mit zu erfassen, wurde eine Referenzmessung für jeden Lauf durchgeführt. Die Referenzmessung erfolgte bei 589nm über eine sog. Standardreihe. Dies war eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung bekannter Konzentrationen.

3.8.4 Durchführung der Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die Proben und die Kontrolle wurden jeweils doppelt bestimmt. Dazu wurde ein Volumen von jeweils 10µl in einen zum Photometerfabrikat passenden Probenträger und dazu 200µl Bradford-Reagenz gegeben. Die Bradford-Reagenz färbte das Protein an. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 578nm.

3.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen vom Mittelwert (SD) aus n verschiedenen, unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen in einem Experiment verglichen, wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA) und anschließend ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excell 2000® bzw. Microsoft Excel for Mac 2008® Version 12.2.8 (Microsoft Corp., USA), als auch SPSS® Version 1.5.1 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung transgener Mäuse, die die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) herzspezifisch überexprimieren. Diese transgene Mauslinie-TGiNOS 36 wurde von Frau Dr. J. Heger generiert (Heger et al., 2003) und im Tierstall des Physiologischen Instituts der JLU-Gießen gezüchtet und gehalten. iNOS-überexprimierende Mäuse wurden mit FVB-Mäusen verpaart.

Um die Nachkommen einer der beiden Gruppen (TGiNOS-Mäuse / Wildtyp-Mäuse) zuordnen zu können, wurde jedes einzelne Tier anhand einer Schwanzbiopsie genotypisiert. Die hierfür benutzten Primer amplifizierten ein 920 bp großes DNA-Fragment, das einen Teil des α -MHC-Promotors und den 5'-Bereich des iNOS-Gens beinhaltet. Somit konnte das iNOS-Transgen vom endogenen iNOS-Gen unterschieden werden. Dies ist in Abb. 4.1 zu sehen. Während die iNOS-Probe anhand des 920 bp-Fragments, bei DNA aus TGiNOS-Tieren zu erkennen ist, wird dieses Fragment bei den Wildtyp-Mäusen nicht amplifiziert.

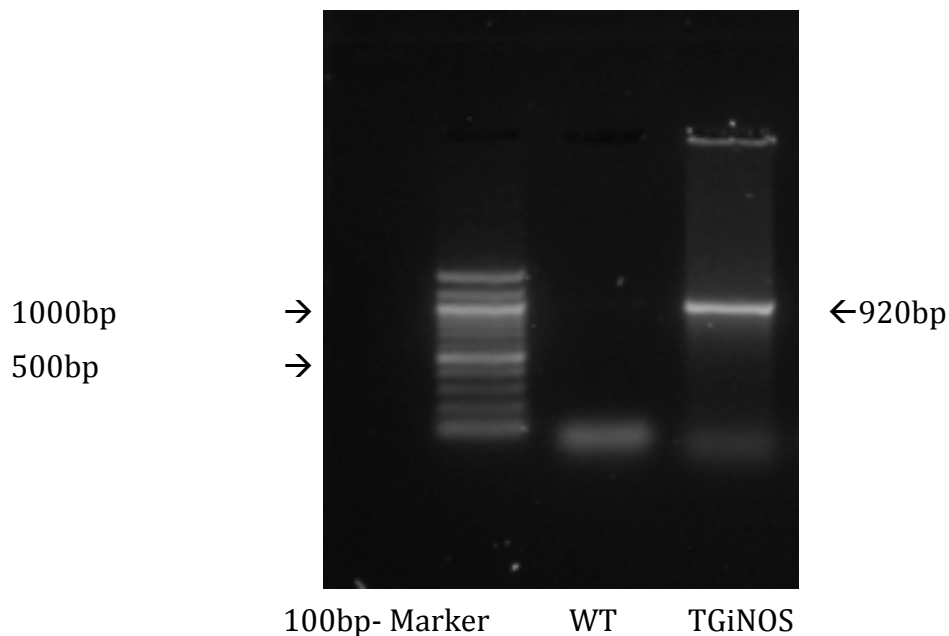


Abb. 4.1 Ausschnitt aus einem Agarose-Gel. Dargestellt sind PCR-Amplifikate von Proben genomischer DNA, isoliert aus Schwanzbiopsien einer Wildtyp-Maus (Mitte) und einer TGiNOS-Maus (Rechts). Als Marker dient ein 100 bp-Marker (Links). Bei den TGiNOS-Proben zeigt sich eine spezifische, 920bp große Bande; bei den Wildtyp-Tieren bleibt diese aus.

Zeitraum dieser Untersuchung ergab die Zucht eine Zahl von 297 Nachkommen. Transgene Nachkommen traten in einem Verhältnis von etwa 1:1 gegenüber Wildtypen auf. Sowohl die Gruppe der TGiNOS-Tiere, wie auch die Gruppe der Wildtypen wiesen eine ausgeglichene Geschlechtsverteilung von etwa 1:1 männlicher zu weiblicher Mäuse auf. In den Versuchen wurden männliche und weibliche Tiere in einem gleichen Zahlenverhältnis eingesetzt.

4.1.1 Expressionsanalyse der TGiNOS-Herzen

Zum Nachweis der Transkription des integrierten Transgens wurde eine Expressionsanalyse mittels Real-Time quantitative RT-PCR vorgenommen und die relative mRNA-Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in TGiNOS-, sowie Wildtyp-Herzen analysiert.

Die RNA wurde aus Gesamtherzen isoliert. Die isolierte RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Intakte RNA ist durch zwei ribosomale Banden in einem ungefähren Verhältnis von 2:1 28S-rRNA zu 18S-rRNA gekennzeichnet (Chomczynski et al., 1987). Wie in Abb. 4.2 zu sehen, waren zwei spezifische und deutlich voneinander getrennte Banden ribosomaler RNA nachweisbar.

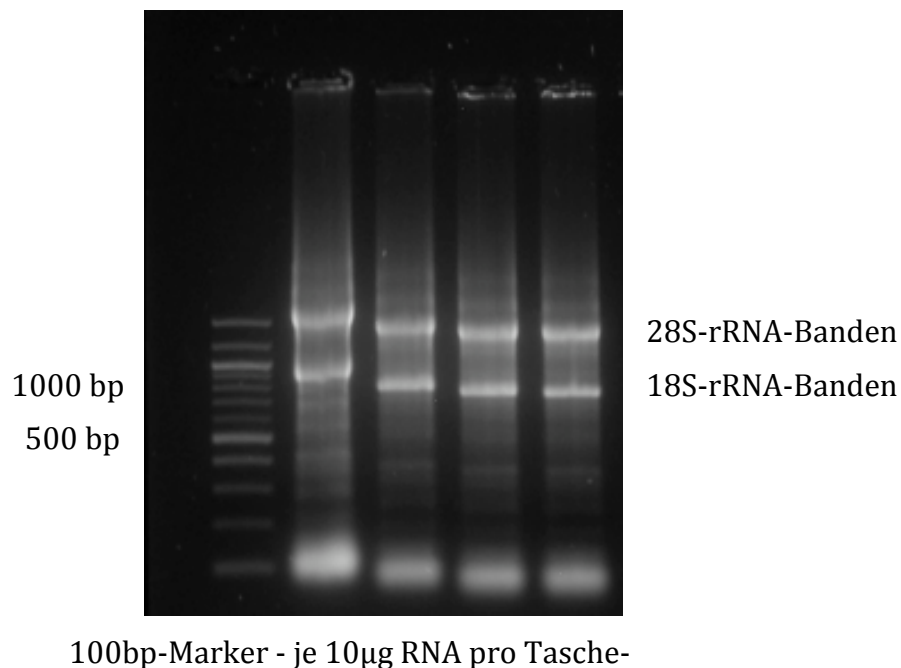


Abb. 4.2 Ausschnitt aus einem 1,5% Agarose-Gel. Verwendet wurde ein 100bp-Marker. Dargestellt sind RNA-Proben der Versuchstiere vor der Analyse der mRNA-Expression. Zu sehen sind die beiden ribosomalen RNA-Banden der 28s- und 18s-rRNA, die die Intaktheit der Gesamt-RNA nachweisen.

In der daraufhin folgend durchgeführten Real-Time quantitative RT-PCR zeigte sich eine signifikant gesteigerte iNOS mRNA Expression bei den TGiNOS-Tieren gegenüber den WT-Tieren. Die relative mRNA-Expression ergab für die TGiNOS-Tiere $1620,58 \pm 489,58\%$ gegenüber der (WT) $1,00 \pm 0,64\%$. Analysiert wurden Proben aus Tieren verschiedener Filialgenerationen.

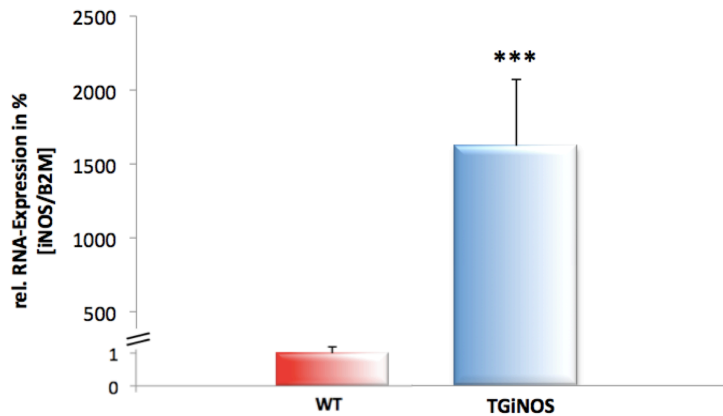


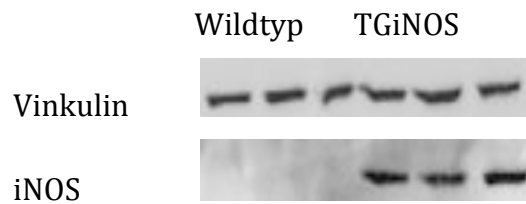
Abb. 4.3 Relative Überexpression der iNOS-mRNA in WT und transgenen Mäusen. Dargestellt ist die mRNA-Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. (WT = 1%) Die Daten wurden mittels Real-Time quantitative RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen. n=10;***p<0,001 TGiNOS vs. WT

Die Integration des Transgens führte somit zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression der iNOS in den Nachfolgegenerationen der transgenen Mäuse.

4.1.1.1 Anstieg der relativen iNOS Proteinexpression

Zum Nachweis der Translation der erhöhten iNOS mRNA-Menge wurde ein Western Blot mit Antikörpern gegen das iNOS-Protein durchgeführt. Untersucht wurden Gesamtproteinproben aus Herzen von transgenen Mäusen. Als Kontrolle dienten identisch aufgearbeitete Proben der Wildtyp Tiere. Abb. 4.4 zeigt, dass die iNOS Protein-Expression in TGiNOS-Mäusen hoch signifikant gestiegen ist. $591 \pm 18,78\%$ vs. $100 \pm 18,91\%$. Somit ist auch auf Proteinebene eine deutliche Überexpression der iNOS zu sehen.

a.



b.

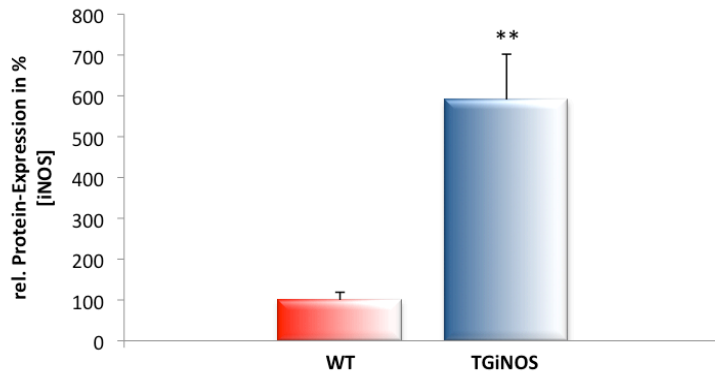


Abb. 4.4 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen iNOS und Vinkulin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für iNOS in Bezug auf das in der Probe enthaltene Vinkulin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6; **p<0,01

4.1.1.2 Keine verringerte eNOS Expression

Insuffiziente Herzen zeigen oft eine reduzierte eNOS-Expression. Da iNOS-Überexpression mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht wird, wurde die Expression der eNOS in TGiNOS- und Wildtyp-Herzen untersucht.

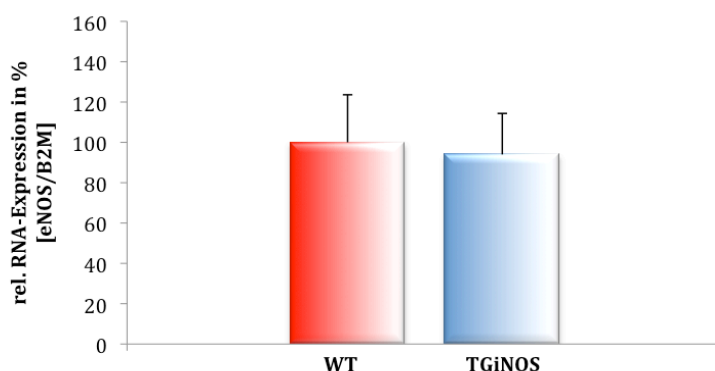


Abb. 4.5 Dargestellt ist die mRNA-Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time quantitative RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen mit etwa 94% bezogen auf die Kontrolle ($95,73 \pm 11,06\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 21,87\%$ in WT-Mäusen) keine signifikant abweichende Expression der eNOS-mRNA und belegen damit weiterhin, dass die alleinige iNOS-Expression basal zu keiner Veränderung anderer NOS-Isoformen führt.

4.2 Funktionsanalysen isolierter adulter Kardiomyozyten

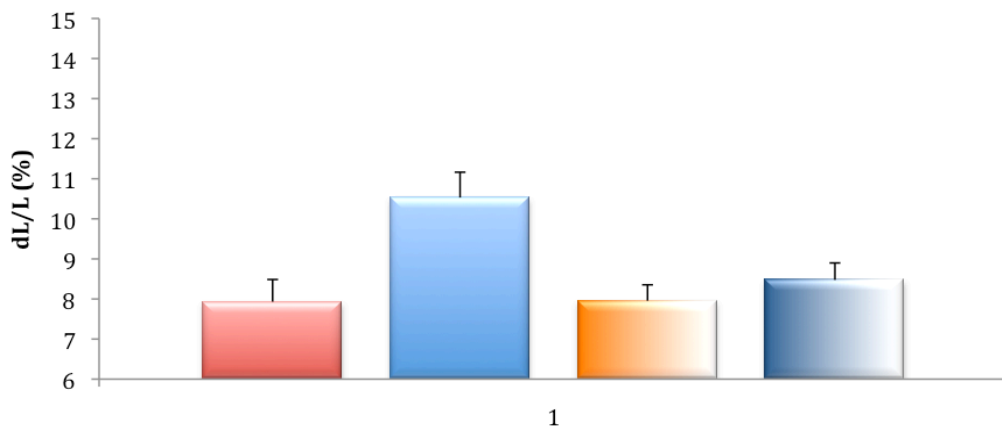
4.2.1 Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld

Bisherige Untersuchungen mit der TGiNOS-Maus wurden ausschließlich an Gesamtherzen durchgeführt. Dabei konnten moderate Einflüsse erhöhter iNOS-Aktivität auf die Hämodynamik gezeigt werden. Deshalb wurden nun Mauskardiomyozyten isoliert und die Zellkontraktion untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen an vereinzelt Kardiomyozyten dargestellt. Dabei wurden die Zellen in nicht modifiziertem Kulturmedium untersucht, wodurch eine weitgehend lastfreie Zellverkürzung gewährleistet wurde.

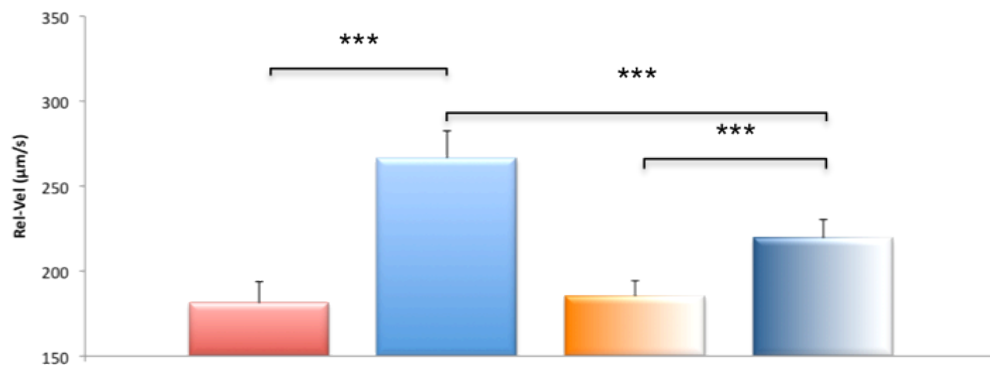
Als Grad für die Kontraktion der Zellen wurden deren prozentuale Verkürzung in Relation zu ihrer diastolischen Zelllänge, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit, sowie die maximale Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 1Hz stimuliert. Es zeigte sich eine, im Vergleich zu den WT-Kardiomyozyten eine signifikant um 34,54% gesteigerte Kontraktionsgeschwindigkeit ($282,43 \mu\text{m/s}$ in TGiNOS vs. $209,8 \mu\text{m/s}$ in WT), sowie eine signifikant um 47,14% gesteigerte Relaxationsgeschwindigkeit ($266,46 \mu\text{m/s}$ in TGiNOS vs. $181,09 \mu\text{m/s}$ in WT), (Abb. 4.6). Bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz (Abb. 4.7) war neben der um signifikant um 43,85% gesteigerten Kontraktionsgeschwindigkeit ($287,03 \mu\text{m/s}$ in TGiNOS vs. $199,53 \mu\text{m/s}$ in WT) und der ebenfalls signifikant um 44,31% gesteigerten Relaxationsgeschwindigkeit ($265,06 \mu\text{m/s}$ in TGiNOS vs. $183,68 \mu\text{m/s}$ WT) auch die relative Zellverkürzung der TGiNOS-Kardiomyozyten signifikant um 47,21% erhöht ($10,54\%$ in TGiNOS vs. $7,16\%$ WT).

4.2.2 Kontraktionsparameter unter L-Arginin-Gabe bei Stimulation mit 1Hz

a.



b.



c.

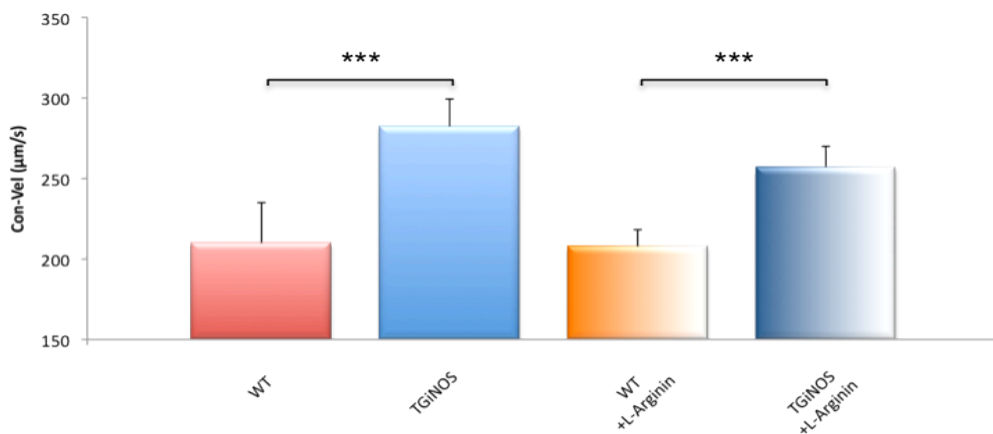


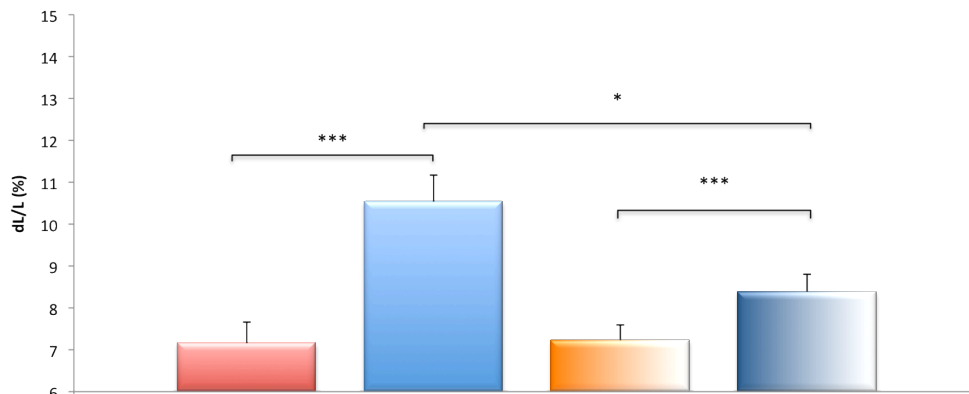
Abb. 4.6 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGiNOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere für eine Stimulationsfrequenz von **1Hz**. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für a. die relative Zellverkürzung [dL/L(%)], b. die Relaxationsgeschwindigkeit [Rel-Vel] und c. die Verkürzungsgeschwindigkeit [Con-Vel]. ***p<0,001 (n=17, aus vier Präparationen)

Die physiologische Konzentration an L-Arginin im Plasma beträgt $200\mu\text{M/L}$ und ist das Substrat für die iNOS. Veränderungen der L-Arginin-Konzentration kann die Aktivität der iNOS beeinträchtigen. $200\mu\text{M}$ L-Arginin entspricht der Konzentration, die auch im Plasma der TGiNOS-Maus gemessen wurde (Heger et. al., 2002). Wie in Abb. 4.6 zu erkennen ist, führt eine Gabe von $200\mu\text{mol}$ L-Arginin um $200\mu\text{mol}$ bei TGiNOS-Kardiomyozyten zu verschlechterten basalen Kontraktionsparametern. Auf das Kontraktionsverhalten der Wildtyp-Kardiomyozyten besaß L-Arginin hingegen keinen Einfluss.

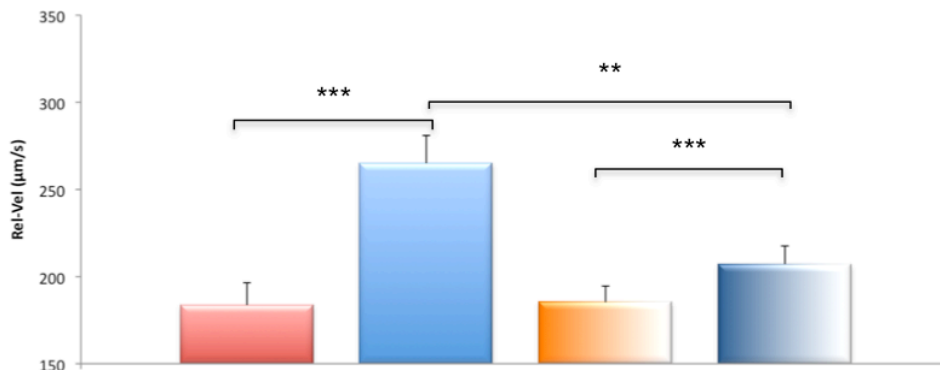
Obwohl L-Arginin-Gaben zu einer Veränderung der Kontraktionsparameter führten, zeigten die TGiNOS-Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz (Abb. 4.6 c), unter zusätzlicher Gabe von L-Arginin, eine signifikant erhöhte Kontraktionsgeschwindigkeit um 23,75% gegenüber den WT-Kardiomyozyten ($257,15\mu\text{m/s}$ in TGiNOS + L-Arginin vs. $207,8\mu\text{m/s}$ in WT + L-Arginin). Die Kontraktionsgeschwindigkeit war dabei nicht signifikant gegenüber der TGiNOS-Kardiomyozyten ohne zusätzliches L-Arginin verringert ($257,15\mu\text{m/s}$ in TGiNOS + L-Arginin vs. $282,43\mu\text{m/s}$ in TGiNOS). Auch in ihrer Relaxationsgeschwindigkeit, siehe 4.6 b. übertrafen die TGiNOS-Kardiomyozyten Arginin-behandelt signifikant die Werte der WT unter Arginin-Stimulation um 18,47% ($219,35\mu\text{m/s}$ in TGiNOS + L-Arginin vs. $185,16\mu\text{m/s}$ in WT + L-Arginin). Vergleicht man jedoch die TGiNOS-Kardiomyozyten untereinander, so zeigt sich eine signifikante Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit unter Zugabe von L-Arginin um 17,68% ($219,35\mu\text{m/s}$ in TGiNOS + L-Arginin vs. $266,46\mu\text{m/s}$ in TGiNOS). Die Relaxationsgeschwindigkeit bei den WT-Kardiomyozyten zeigte keine signifikante Veränderung unter Zugabe von L-Arginin ($185,16\mu\text{m/s}$ in WT + L-Arginin vs. $181,09\mu\text{m/s}$ in WT). Es gab keine signifikanten Abweichungen der Werte für die relative Zellverkürzung zwischen den vier Vergleichsgruppen, siehe 4.6 a.

4.2.3 Kontraktionsparameter unter L-Arginin-Gabe bei Stimulation mit 2Hz

a.



b.



c.

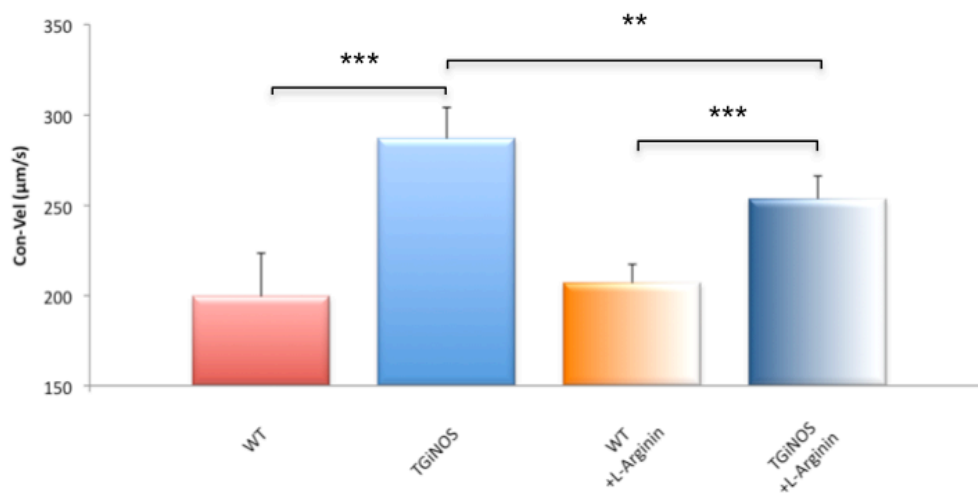


Abb. 4.7 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGiNOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere für eine Stimulationsfrequenz von **2Hz**. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für a. die relative Zellverkürzung [dL/L(%)], b. die Relaxationsgeschwindigkeit [Rel-Vel] und c. die Verkürzungsgeschwindigkeit [Con-Vel]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=17; aus vier Präparationen).

Auch unter einer Stimulationsfrequenz von 2Hz besaß L-Arginin keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Wildtyp-Kardiomyozyten (WT+L-Arginin vs. WT basal: Con.Vel.: 207,00 μ m/s vs. 199,53 μ m/s; Rel.Vel.: 185,43 μ m/s vs. 183,68 μ m/s; dL/L: 7,23% vs. 7,16%).

Wie in Abb. 4.7 c. dargestellt, zeigten die TGiNOS-Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz auch unter Zugabe von L-Arginin, eine signifikant erhöhte Kontraktionsgeschwindigkeit gegenüber Arginin-behandelten WT-Kardiomyozyten. Unter Zugabe von L-Arginin kam es jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit in TGiNOS-Kardiomyozyten von 11,64% (253,62 μ m/s in TGiNOS + L-Arginin vs. 287,03 μ m/s in TGiNOS), die aber immer noch 22,52% über denen der WT-Kardiomyozyten lag (253,62 μ m/s in TGiNOS + L-Arginin vs. 207,00 μ m/s in WT + L-Arginin). Die TGiNOS-Kardiomyozyten zeigten zudem eine signifikante Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit unter Zugabe von L-Arginin um 21,81% (207,24 μ m/s in TGiNOS + L-Arginin vs. 265,06 μ m/s in TGiNOS). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Zellverkürzung der TGiNOS-Kardiomyozyten unter Zugabe von L-Arginin um 20,49%; und dies einzig unter einer Stimulationsfrequenz von 2Hz (8,38% in TGiNOS + L-Arginin vs. 10,54% in TGiNOS basal).

Ein Eigeneffekt des L-Arginin auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten kann somit ausgeschlossen werden. Hätte es einen Eigeneffekt gegeben, hätten sich Änderungen im Kontraktionsverhalten zwischen WT-Kardiomyozyten unter L-Arginin-Gabe, gegenüber WT-Kardiomyozyten basal zeigen müssen. Dies war bei keiner Messung der Fall.

TGiNOS-Mäuse haben basal ein besseres Kontraktionsverhalten als WT-Mäuse. Zusätzliches L-Arginin wurde bei den transgenen Tieren derart verstoffwechselt, dass es einen negativ inotropen Einfluss auf die Kardiomyozyten hat. Alle Werte nehmen bei den TGiNOS-Kardiomyozyten unter zusätzlicher Gabe von L-Arginin ab. Trotzdem ist das Kontraktionsverhalten immer noch besser als bei den WT-Mäusen.

Die folgenden Untersuchungen an isolierten Zellen wurden ausschließlich in modifiziertem Medium, d.h. erhöhter L-Arginin-Gabe, durchgeführt.

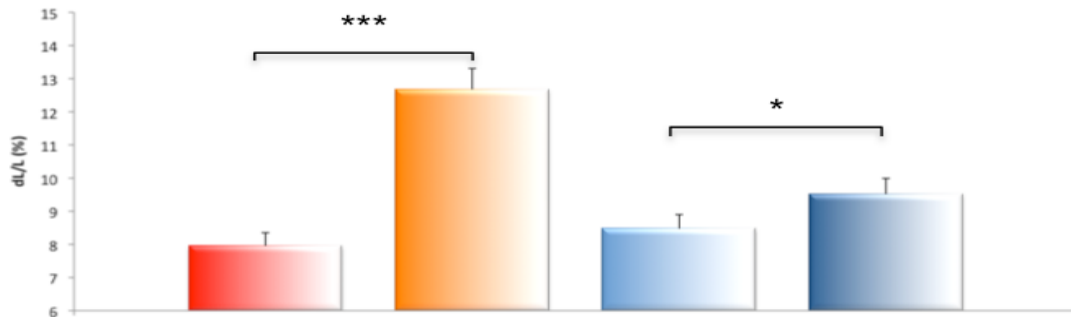
4.3 Verringerte β -adrenerge Stimulierbarkeit

Insuffiziente Herzen zeigen eine veränderte β -adrenerge Ansprechbarkeit. Um das β -adrenerge Ansprechverhalten der TGiNOS-Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden Kontraktionsmessung unter Zugabe von Isoprenalin, einem β -Adrenozeptoragonisten, durchgeführt. Dazu wurden Kardiomyozyten aus jeweils einem Herzen isoliert, auf vier Kulturschalen verteilt und je zwei Schalen nach Zugabe von Isoprenalin, bzw. unstimuliert untersucht. Mit den WT-Kardiomyozyten wurde in gleicher Weise verfahren.

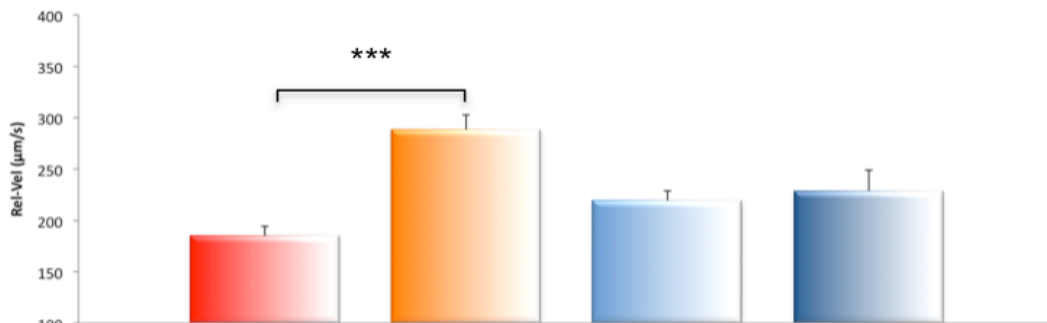
WT-Kardiomyozyten reagierten auf eine Zugabe von Isoprenalin mit einer signifikanten Zunahme der Zellverkürzung auf um 59,17% (12,67% in WT + Isoprenalin vs. 7,96% in WT), wie es bei einer Stimulation der β -Rezeptoren auch zu erwarten ist, (siehe 4.8 a). Dies spiegelt sich auch bei der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit wider. Beide nehmen durch die Zugabe von Isoprenalin signifikant zu. Die Kontraktionsgeschwindigkeit steigert sich um 64,75% und die Relaxationsgeschwindigkeit um etwa 55,67% (342,36 μ m/s Con.-Vel. in WT + Isoprenalin vs. 207,80 μ m/s Con.-Vel. WT; 288,24 μ m/s Rel.-Vel. in WT + Isoprenalin vs. 185,16 μ m/s Rel.-Vel. in WT), (siehe Abb. 4.8 b und 4.8 c).

4.3.1 Kontraktionsparameter nach β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalin (1 Hz)

a.



b.



c.

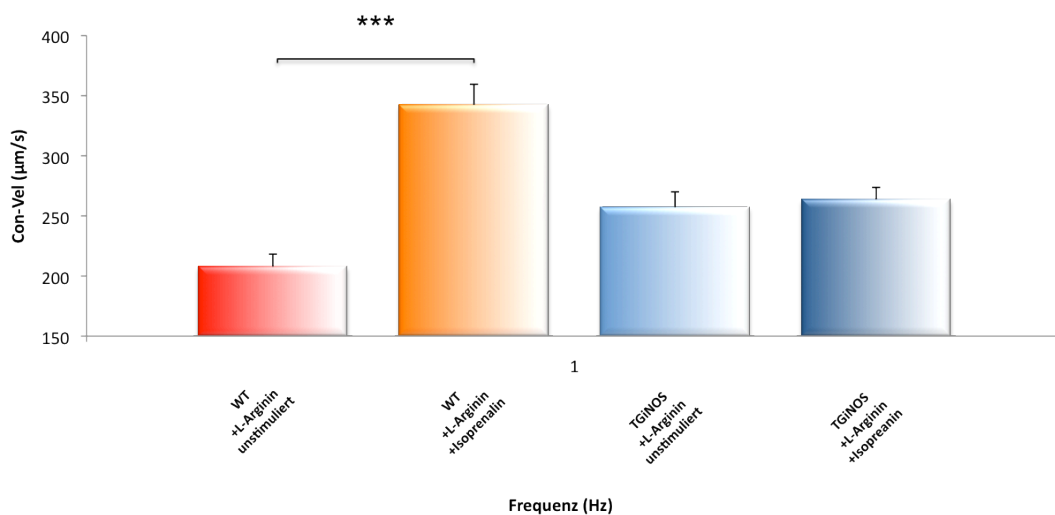


Abb. 4.8 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGfNOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere für eine Stimulationsfrequenz von **1 Hz**. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung [dL/L(%)], die Relaxationsgeschwindigkeit [Rel-Vel] und die Verkürzungsgeschwindigkeit [Con-Vel]. Die Versuche wurden mit modifiziertem Medium durchgeführt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (n=22, aus vier Präparationen).

Im Gegensatz zu den Wildtyp Kardiomyozyten zeigten die TGiNOS Kardiomyozyten eine deutlich geringere Zunahme ihrer Kontraktionsparameter durch β -adrenerge Stimulation. Die TGiNOS Kardiomyozyten erreichten unter β -adrenerger Stimulation bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz eine Steigerung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit um etwa 2,54% (263,69 μ m/s in TGiNOS + Isoprenalin vs. 257,15 μ m/s in TGiNOS), (siehe Abb. 4.8 c).

Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit blieb bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz unverändert (228,69 μ m/s in TGiNOS + Isoprenalin vs. 219,35 μ m/s in TGiNOS), (siehe Abb. 4.8 b).

Die relative Zellverkürzung dL/L blieb bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz unverändert (9,52% in TGiNOS + Isoprenalin vs. 8,48% in TGiNOS), (siehe Abb. 4.8 a).

Dies zeigt, dass TGiNOS-Kardiomyozyten eine herabgesetzte β -adrenerge Ansprechbarkeit besitzen.

Auch bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz reagierten die Wildtyp-Kardiomyozyten auf eine Zugabe von Isoprenalin mit einer signifikanten Zunahme der relativen Zellverkürzung um 59,17% (12,67% in WT + Isoprenalin vs. 7,96% in WT), (siehe Abb. 4.9 a).

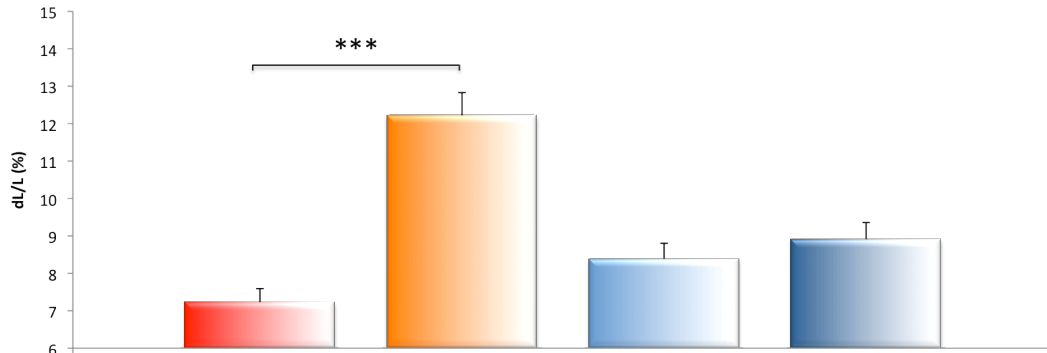
Während die Relaxationsgeschwindigkeit bei einer Frequenz von 2Hz signifikant um 55,67% zunahm (288,24 μ m/s in WT + Isoprenalin vs. 185,16 μ m/s in WT), (siehe Abb. 4.9 b.), war die Kontraktionsgeschwindigkeit nicht signifikant um 64,75% erhöht (342,36 μ m/s in WT + Isoprenalin vs. 207,80 μ m/s in WT), (siehe Abb. 4.9 c).

Die TGiNOS-Kardiomyozyten zeigten unter β -adrenerger Stimulation keine veränderte maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (263,69 μ m/s in TGiNOS + Isoprenalin vs. 257,15 μ m/s in TGiNOS), (siehe Abb. 4.9c).

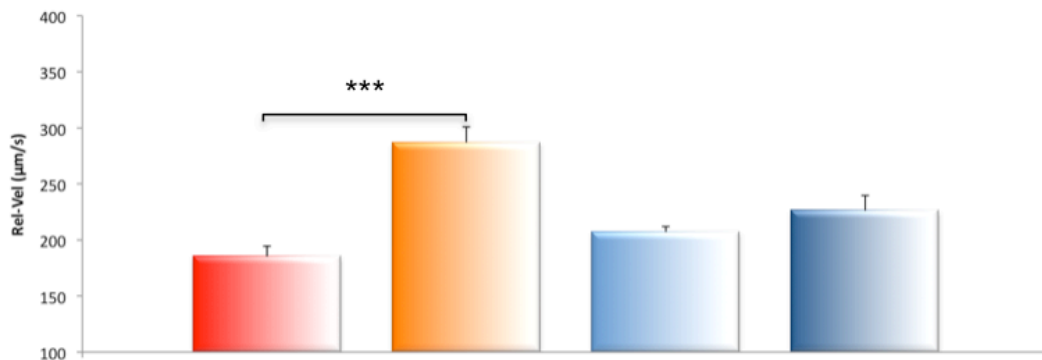
Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit blieb bei einer Stimulation von 2Hz ebenfalls unverändert (228,69 μ m/s in TGiNOS + Isoprenalin vs. 219,35 μ m/s in TGiNOS), (siehe Abb. 4.9 b).

4.3.2 Kontraktionsparameter nach β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalin (2 Hz)

a.



b.



c.

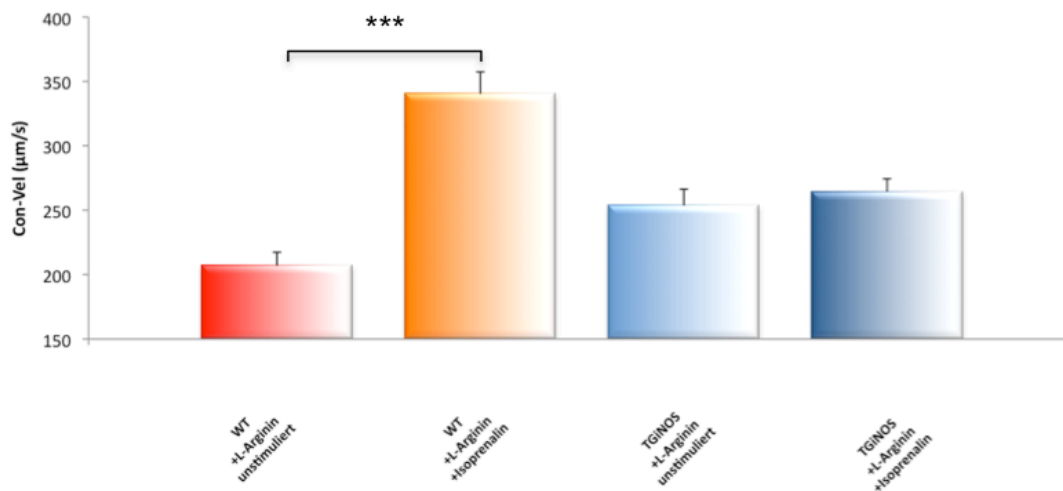


Abb. 4.9 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGINOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere für eine Stimulationsfrequenz von **2 Hz**. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung [dL/L(%)], die Relaxationsgeschwindigkeit [Rel-Vel] und die Verkürzungsgeschwindigkeit [Con-Vel]. Das Kulturmedium wurde bei allen Versuchen mit 200 μ M L-Arginin versetzt. *** $p < 0,001$ (n=22, aus vier Präparationen)

Auch die relative Zellverkürzung blieb bei einer Stimulation von 2Hz gleich (9,52% in TGiNOS + Isoprenalin vs. 8,48% in TGiNOS), (siehe 4.9 a).

Die Messungen ergaben bei beiden untersuchten Frequenzen eine signifikant geringere β -adrenerge Ansprechbarkeit der TGiNOS-Kardiomyozyten.

4.4 Kontraktilität und Ca^{2+} -Handling-Proteine

Die veränderte Kontraktilität der TGiNOS-Kardiomyozyten gab den Anlass, Untersuchungen zum intrazellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel der untersuchten Herzen durchzuführen. Dazu wurden Expressionsanalysen der sog. Calcium-Handling-Proteine vorgenommen. Als Calcium-Handling-Proteine werden der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), die Sarcoplasmatische- und Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2A), sowie das Phospholamban bezeichnet. Der NCX wird über erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert. Daraufhin konkurriert der NCX mit der SERCA um die Ca^{2+} -Elimination.

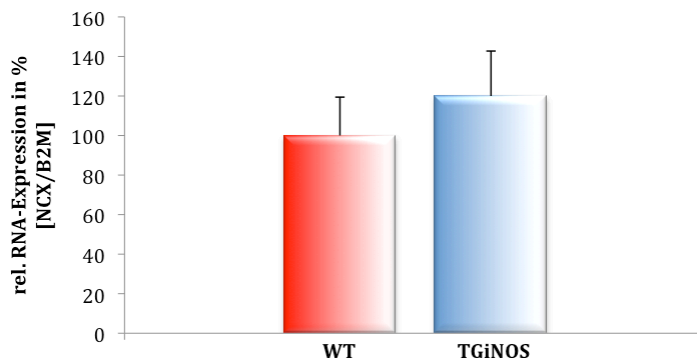


Abb. 4.10 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Calcium-Handling-Proteins NCX. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Wie in Abb. 4.10 dargestellt, lag die relative mRNA Expression des NCX bei $121,73 \pm 12,14\%$ (TGiNOS) gegenüber $100 \pm 17,39\%$ (WT). Dies entspricht keiner signifikanten Expressionsänderung.

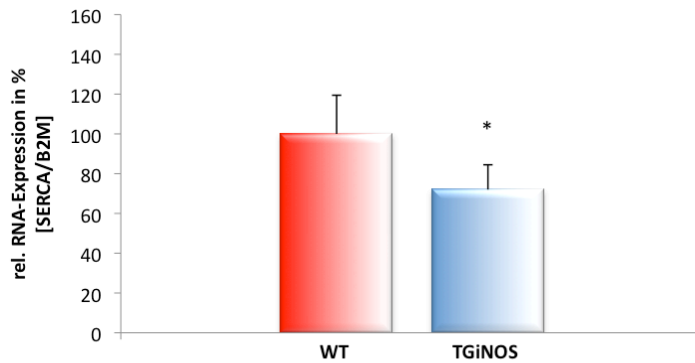


Abb. 4.11 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Calcium-Handling-Proteins SERCA. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05.

Abb. 4.11 zeigt die relative SERCA mRNA-Expression. Diese ergab eine signifikante Abnahme der mRNA Expression auf 72,15 \pm 10,92% (TGiNOS) gegenüber 100 \pm 12,78% (WT).

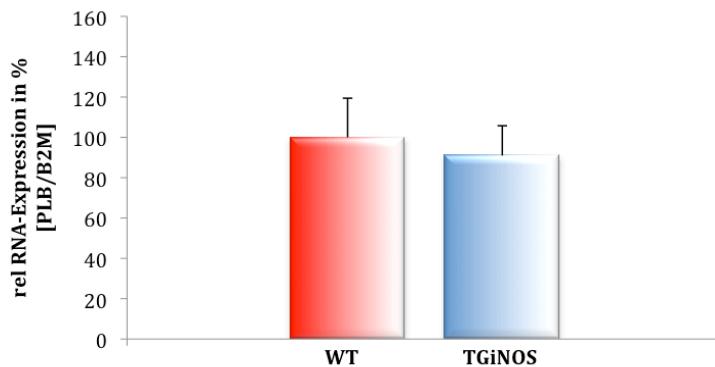


Abb. 4.12 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Calcium-Handling-Proteins PLB. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Wie in Abb. 4.12 zu sehen ist, zeigte sich in der relativen mRNA-Expression des PLB kein Unterschied 90,59 \pm 10,23% (TGiNOS) vs. 100 \pm 8,97% (WT).

Da die Veränderungen der Expressionswerte von NCX und PLB geringgradig und nicht signifikant waren, könnte somit von den Ca²⁺-handling-Proteinen

ausschließlich die verringerte SERCA2A-Expression Einfluss auf die Kontraktilitätsveränderungen in den TGiNOS-Kardiomyozyten nehmen.

4.4.1 Keine Veränderungen der β -Rezeptoren

Zusätzlich zu der verringerten SERCA-Expression könnte eine Erklärung für das geringere β -adrenerge Ansprechverhalten der TGiNOS-Kardiomyozyten eine Veränderung der β -Rezeptordichte oder Expression sein. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression des β -2-Adrenozeptors durch Real-Time RT-PCR analysiert.

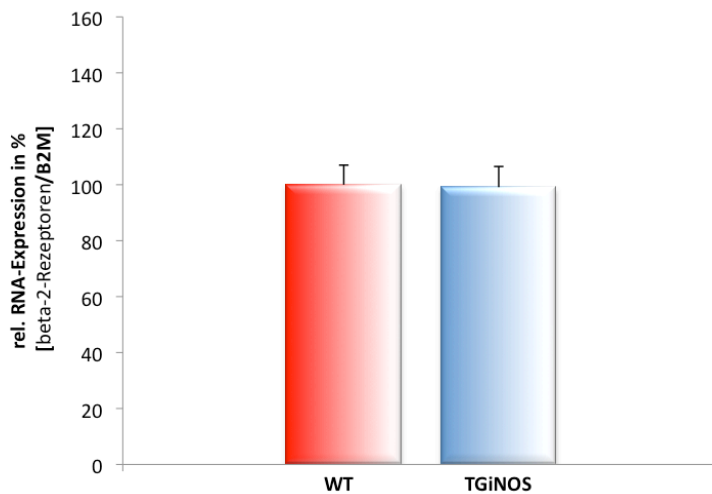


Abb. 4.13 Dargestellt ist die mRNA-Expression von β -2-Adrenozeptoren. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=12)

Die in Abbildung 4.13 dargestellte mRNA-Expression des β_2 -Adrenozeptors zeigt, dass die TGiNOS-Herzen den Wildtyp-Herzen mit einer relativen Expressionshöhe von $99,12\% \pm 1,12\%$ gleichen. Somit ist die schlechte β -adrenerge Ansprechbarkeit nicht auf eine Änderung der β_2 -AR-Expression zurückzuführen.

4.5 Stickstoffmonoxid und SMADs

4.5.1 SMAD-Bindungsaktivität

Frühere Studien haben gezeigt, dass NO zu einer Aktivierung von SMAD-Transkriptionsfaktoren führt (Schneiders et al., 2005). Nach Translokation in den Zellkern binden diese an die DNA und führen darüber zu einer Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene. Es sollte deshalb geprüft werden, ob es in TGiNOS-Mäusen zu einer erhöhten SMAD-Bindungsaktivität kommt. In EMSAs wurde deshalb die Bindungsaktivität der Proteine aus Kernextrakten zu SMAD-Oligonukleotiden analysiert.

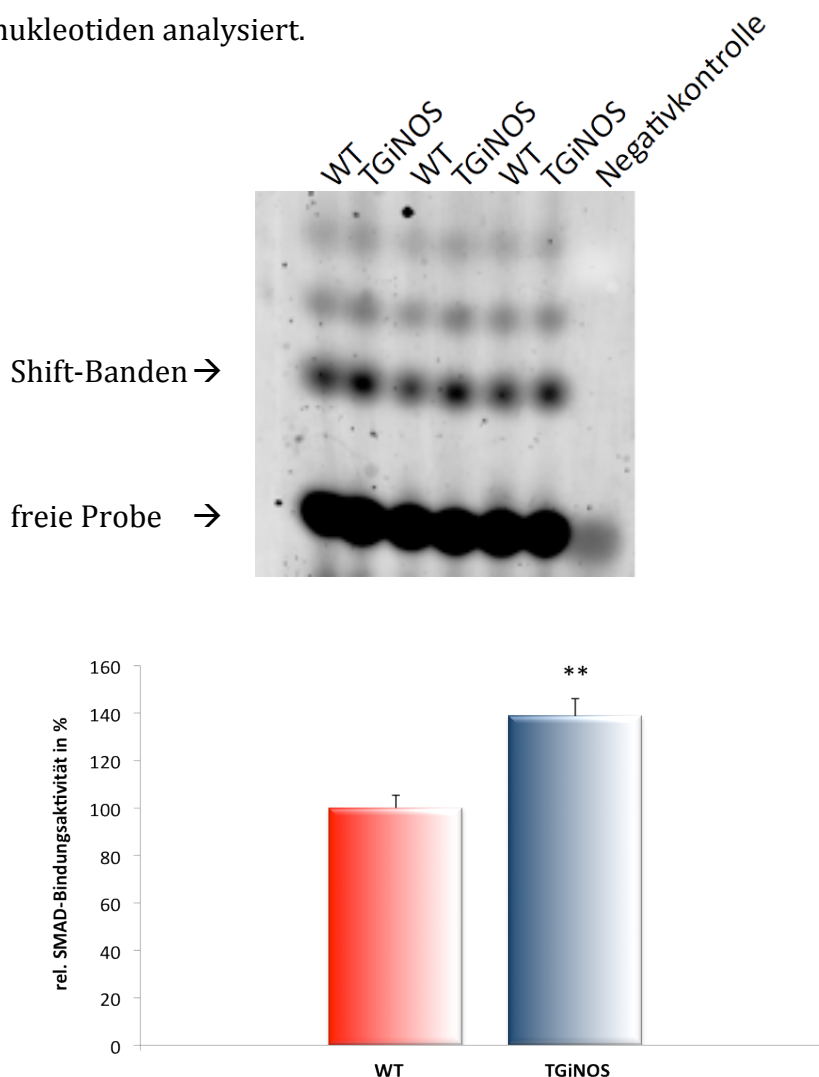


Abb. 4.14 Dargestellt ist a. eine Fotoaufnahme des Fluoreszenzsignals eines EMSAs zum Nachweis der Bindungsaktivität von SMAD-Proteinen. Es wurden sechs Proben aufgetragen. Links beginnend wurden abwechselnd Proben von Wildtyp-Mäusen gefolgt von Proben von TGiNOS-Mäusen aufgetragen. Ganz rechts befand sich eine Negativkontrolle. Bei dieser zeigte sich keine Shift-Bande, sowie b. die quantitative Auswertung der SMAD-Bindungsaktivität. Die Daten wurden mittels EMSA an Proben aus Kernextrakten von Gesamtherzen erhoben. n=6; **p<0,01

Hierfür wurden Kernextrakte von Gesamtherzen isoliert und mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten SBE-Oligonukleotiden, die die Sequenz für die SMAD-Bindung (SMAD Binding Element – SBE) enthalten, die SMAD-Bindungsaktivität ermittelt. In Abb. 4.14 ist das Ergebnis dieses EMSAs dargestellt. Im Vergleich zu den WT-Proben kommt es bei den TGiNOS-Proben zu einer verstärkten Schwärzung der SMAD-Bande. Bei den TGiNOS Proben kommt es zu einer signifikant gesteigerten Bindungsaktivität auf etwa $138 \pm 5,3\%$.

4.5.2 Keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1

SMAD Transkriptionsfaktoren haben alleine eine geringe DNA-Bindungsaktivität, so dass sie mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagieren. Für Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit NO neben SMAD auch zu einer Aktivierung von AP-1 führt (Schneiders et al., 2005). Um dies auch in der TGiNOS-Mäusen zu untersuchen, wurden Kernextrakte aus Herzen der Tiere untersucht.

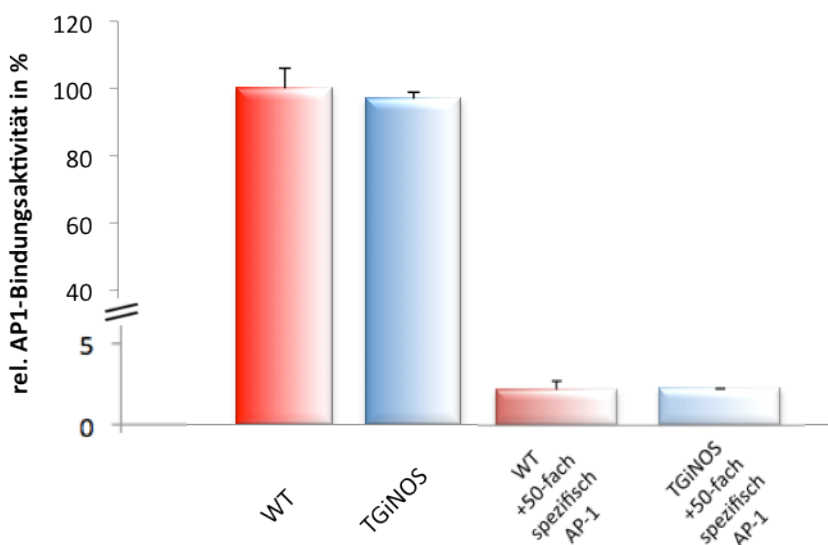


Abb. 4.15 Dargestellt sind die DNA-Bindungsaktivitäten zu AP-1, sowie ein Kompetitionsversuch mit 50-fach höher konzentrierten, nicht markierten Oligonukleotiden. Die Daten wurden mittels EMSA an Proben aus Kernextrakten von Gesamtherzen erhoben. n=4

In Abb. 4.15 sind (Proben links) die Ergebnisse der AP-1 DNA-Bindungsaktivität von Kernextrakten dargestellt. Die TGiNOS-Proben zeigen mit etwa 97% relativer Bindungsaktivität keine signifikante Abweichung gegenüber der Wildtypen

(96,93±3,12% TGiNOS vs. 100±8,62% WT). Somit zeigt sich trotz der stark erhöhten kardialen NO-Spiegel keine erhöhte AP-1-Aktivität in TGiNOS-Mäusen.

4.5.2.1 Die AP-1-Bindung ist spezifisch

Um die Spezifität der AP-1-Bindungsaktivität zu zeigen, wurde ein Wettbewerbsversuch durchgeführt. Hierfür wurden vor der Inkubation der Kernextrakte mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, die Kernextrakte mit unmarkierten Oligonukleotiden (50-fach höher konzentriert) inkubiert. Sättigen die AP1-Proteine, in einer spezifischen Bindungsreaktion, die DNA-Bindungsstellen bereits ab, kommt es während der darauf folgenden Inkubation mit markierten Oligonukleotiden zu keiner nennenswerten Bindungsreaktion mehr. In der den Versuch abschließenden Fluoreszenzmessung bleibt somit das spezifische AP1-Signal fast vollständig aus (Abb. 4.15).

4.5.3 Veränderungen der SMAD-Signalkaskade

Da die Ergebnisse der EMSAs auf eine Beteiligung der SMADs hinweisen, wurde der Einfluss der iNOS-Überexpression auf die SMAD-Expression untersucht. Für Signalweitergabe von NO via SMADs spielen SMAD2, SMAD3 und SMAD4 eine wichtige Rolle. Die mRNA- und Protein-Expressionen verschiedener SMADs wurden im Folgenden analysiert.

Es zeigt sich eine Erhöhung der SMAD2 mRNA-Expression auf 173±13,15% TGiNOS (vs. 100±11,33% WT).

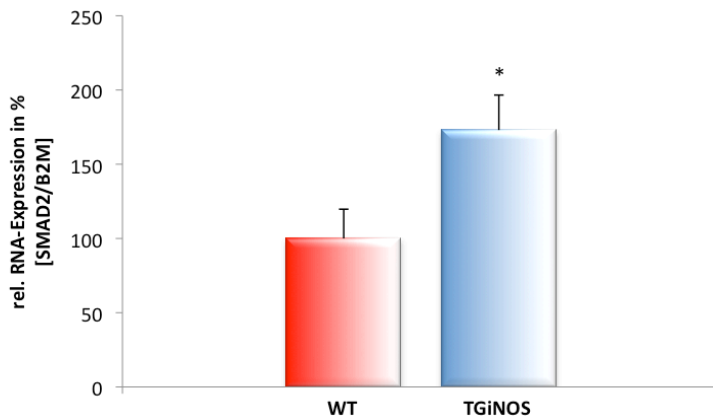


Abb. 4.16 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD2. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05

Auch die relative mRNA-Expression von SMAD3 (Abb. 4.17) ist in TGiNOS-Herzen auf etwa 200% erhöht.

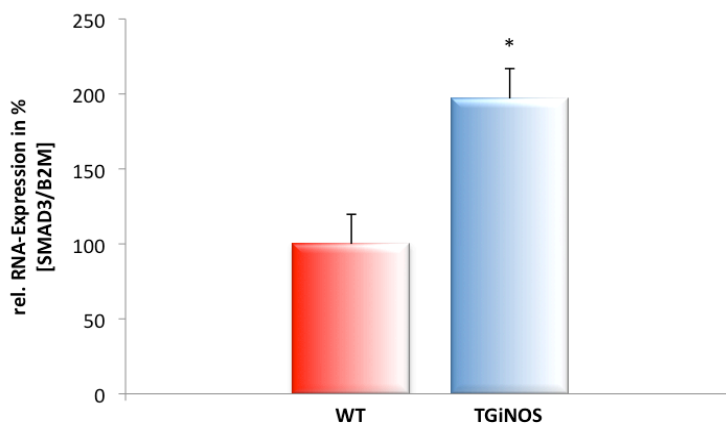


Abb. 4.17 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD3. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05

Eine erhöhte Expression von SMAD2/3 allein ist nicht ausreichend für eine gesteigerte Bindungsaktivität. Beide Proteine müssen über Phosphorylierung aktiviert werden. Das Verhältnis von pSMAD2 zu SMAD2 zeigt somit an, wie viel des vorhandenen SMAD2 tatsächlich aktiv ist.

a.



b.

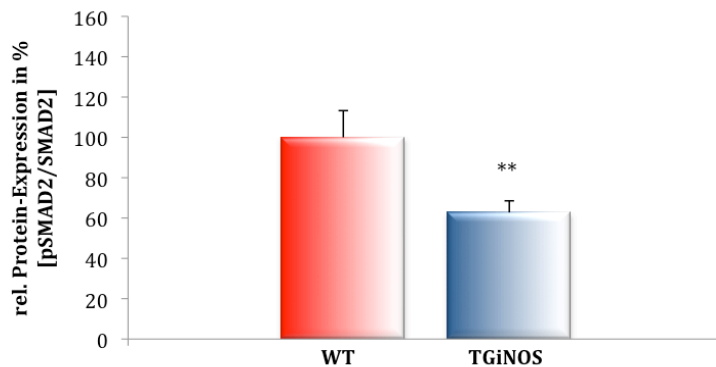
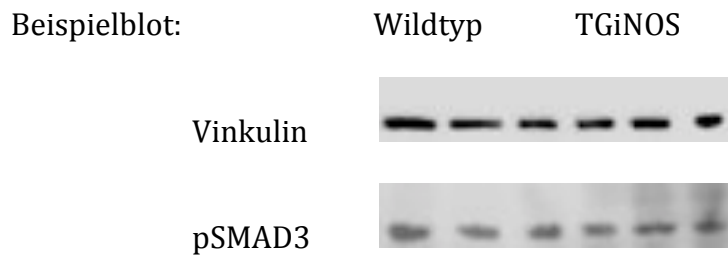


Abb. 4.18 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen pSMAD2 und SMAD2, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für pSMAD2 in Bezug auf das in der Probe enthaltene SMAD2. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6; **p<0,01

In Abb. 4.18 ist das Ergebnis der pSMAD2-Analyse bezogen auf die nicht phosphorylierte Form dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Verringerung des pSMAD2/SMAD2 Verhältnisses auf etwa 63% in TGiNOS-Herzen (62,73±4,09% TGiNOS vs. 100±5,94% WT).

Da neben SMAD2 auch SMAD3 durch NO aktiviert werden kann und pSMAD2 mit pSMAD3 im Verhältnis von 1:1 komplexiert, war zu prüfen, wie hoch die Menge an pSMAD3 war. Darum wurde ein Western Blot mit Antikörpern gegen pSMAD3 durchgeführt.

a.



b.

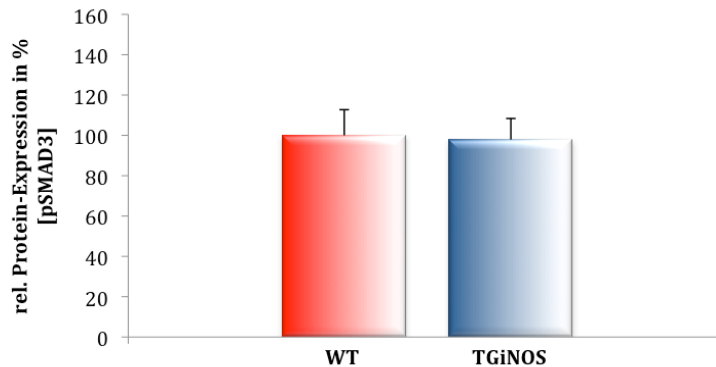


Abb. 4.19 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen pSMAD3 und Vinkulin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für pSMAD3 in Bezug auf das in der Probe enthaltene Vinkulin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6.

In Abb. 4.19 ist das Ergebnis der Proteinanalyse von pSMAD3 dargestellt. Es ist kein Unterschied im Phosphorylierungsgrad von SMAD3 in TGiNOS-Herzen vs. WT zu sehen. (97,60±23,92% TGiNOS vs. 100±28,74% WT).

Die SMAD Signaltransduktion erfordert die Komplexierung der R-SMADs pSMAD2/pSMAD3 mit dem Co-SMAD4. SMAD4 wird nicht phosphoryliert und bindet den pSMAD2/pSMAD3-Komplex im Verhältnis 1:1:1. Dieser Komplex transloziert dann in den Zellkern. Um eine mögliche Veränderung auf SMAD4-Ebene zu untersuchen, wurde sowohl die mRNA-Expression, als auch die Protein-Expression von SMAD4 analysiert.

Auf RNA-Ebene zeigte sich eine signifikante Abnahme der Expression von SMAD4 auf ca. 65% des WT-Wertes (64,43±2,9% TGiNOS vs. 100±5,62% WT).

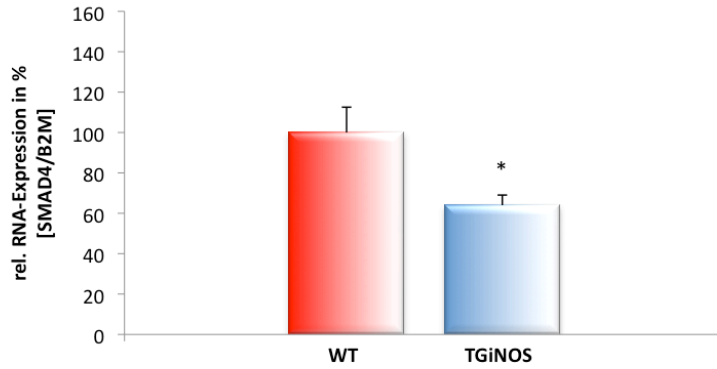


Abb. 4.20 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD4. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05

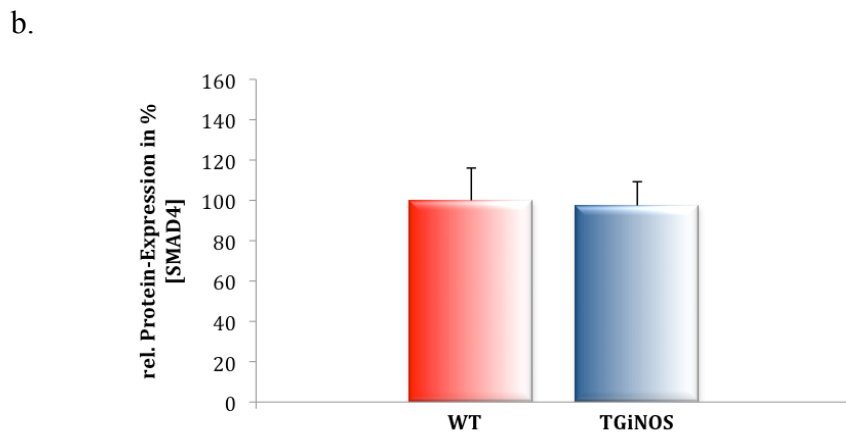
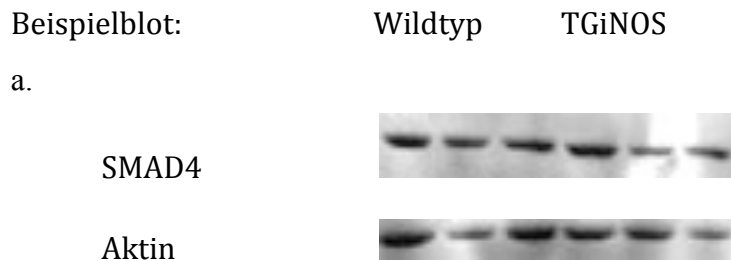


Abb. 4.21 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen SMAD4 und Aktin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für SMAD4 in Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6.

Wie in Abbildung 4.21 zu sehen ist, unterscheidet sich die Menge des exprimierten SMAD4 mit etwa 97% nicht signifikant von den WT-Werten ($97,46 \pm 27,05\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 35,84\%$ WT). Das bedeutet, dass die erhöhten kardialen NO-Spiegel zu keinem signifikanten Anstieg der Expression von SMAD 2/3/4 führt.

Da die SMAD-Bindungsaktivität erhöht ist, SMAD2 und SMAD3 jedoch nicht verstärkt phosphoryliert werden, wurde die Expression von SMAD1, SMAD5 und SMAD8 (siehe Abb. 1.4) analysiert. Da auch diese SMADs für eine erhöhte SMAD-Bindungsaktivität verantwortlich sein können.

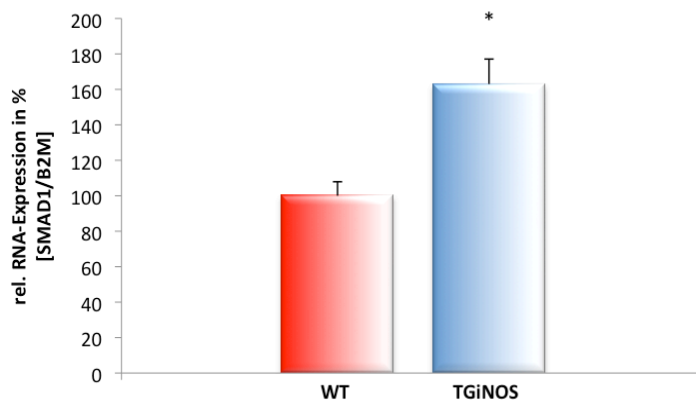


Abb. 4.22 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD1. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10) *p<0,05

Die mRNA-Expression von SMAD1 war in TGiNOS-Herzen signifikant auf etwa 164% gegenüber der WT-Herzen erhöht ($163,41 \pm 11,26\%$ TGiNOS vs. $100\% \pm 7,77\%$ WT), (siehe Abb. 4.22).

In Abb. 4.23 ist das Ergebnis der SMAD5 mRNA Expression dargestellt. Die Expression ist signifikant auf etwa 109% ($108,74 \pm 3,44\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 15,88\%$ WT) erhöht.

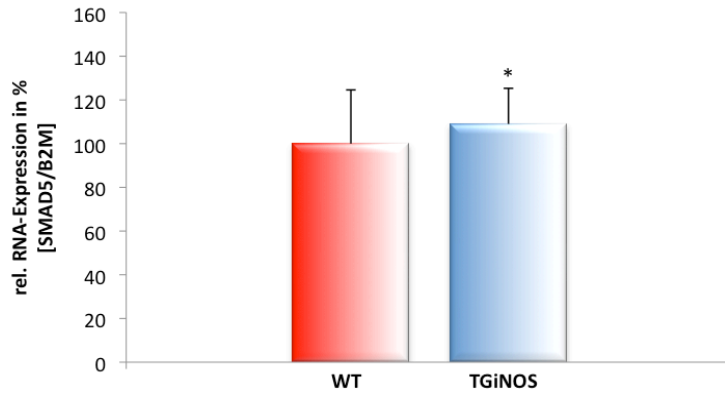


Abb. 4.23 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD5. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05

Weiterhin wurde die Proteinexpression von SMAD5 untersucht.

a.



b.

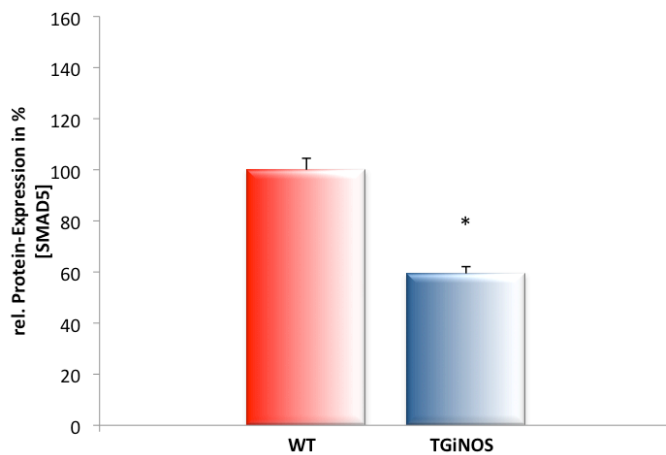


Abb. 4.24 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen SMAD5 und Aktin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für SMAD5 in Bezug auf das in der Probe enthaltene Aktin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6; *p<0,05

Abb. 4.24 zeigt das Ergebnis der Protein Expressionsanalyse von SMAD5. Die Proteinexpression ist signifikant auf etwa 59% reduziert ($59,54 \pm 8,15\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 4,53\%$ WT) reduziert.

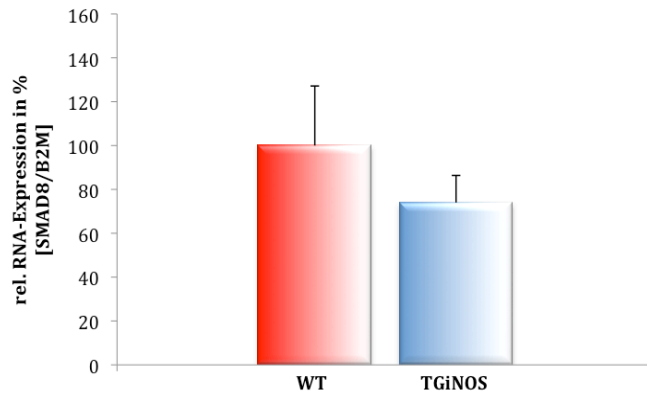


Abb. 4.25 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD8. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. $74,84 \pm 16,72\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 27,16\%$ WT. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die mRNA Expression von SMAD8 war tendenziell verringert. Die Aktivierung und in der Folge die Komplexbildung von SMAD 1, 5 und 8 erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierung. Daher sind die phosphorylierten Formen von besonderem Interesse. Die Menge der phosphorylierten SMAD 1, SMAD 5 und SMAD 8 wurden in einem Western Blot mit Antikörpern gegen pSMAD1,5,8 analysiert.

Die Abb. 4.26 stellt die Ergebnisse der Proteinanalyse der pSMAD1, pSMAD5 und pSMAD8 dar. Die Menge an pSMAD1,5,8 ist signifikant auf etwa 90% ($90,12 \pm 6,84\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 6,17\%$ WT) verringert.

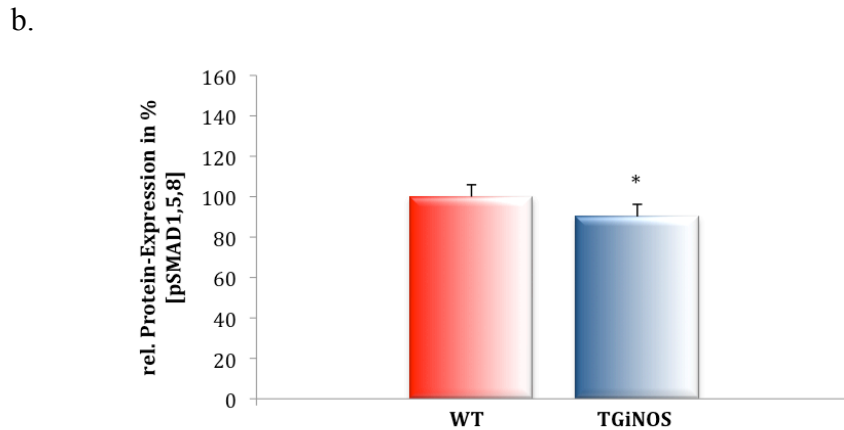
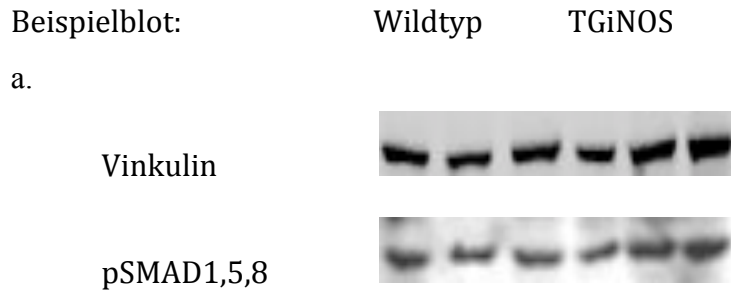


Abb. 4.26 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen pSMAD1,5,8 und Vinkulin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für pSMAD1,5,8 in Bezug auf das in der Probe enthaltene Vinkulin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6; *p<0,05

Die SMAD-Kaskade enthält zwei Mitglieder, die im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus eine hemmende Wirkung auf die SMAD-Signalkaskade haben. Diese sind SMAD6 und SMAD7. Um zu untersuchen ob in TGiNOS-Tieren eine aktive Hemmung der SMAD-Signalkaskade aktiviert ist, wurde die mRNA-Expression von SMAD6 und SMAD7 analysiert. Während SMAD7 mit SMAD4 kompetitiv um die Bindung an den pSMAD2/pSMAD3-Komplex konkurriert und sowohl die TGF- β , Aktivin oder BMP ausgelösten Signale negativ reguliert, hemmt SMAD6 vorwiegend die Signale der BMPs, die über die SMADs 1/5/8 vermittelt werden (Hayashi et al. 2005, Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997).

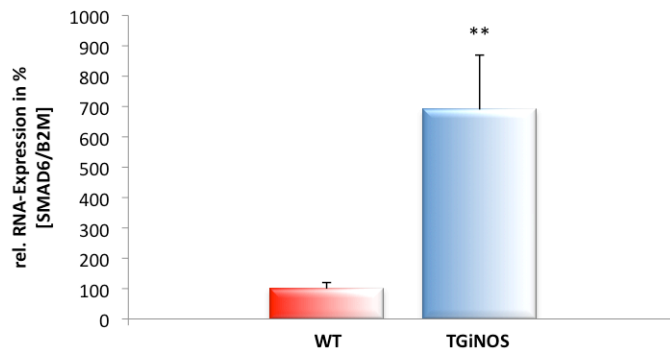


Abb. 4.27 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD6. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); **p<0,01

Aus Abb. 4.27 wird eine signifikante Erhöhung der SMAD6 mRNA-Expression in TGiNOS-Herzen auf etwa 700% gegenüber der WT ersichtlich (690 \pm 26,06% TGiNOS vs. 100 \pm 19,05% WT).

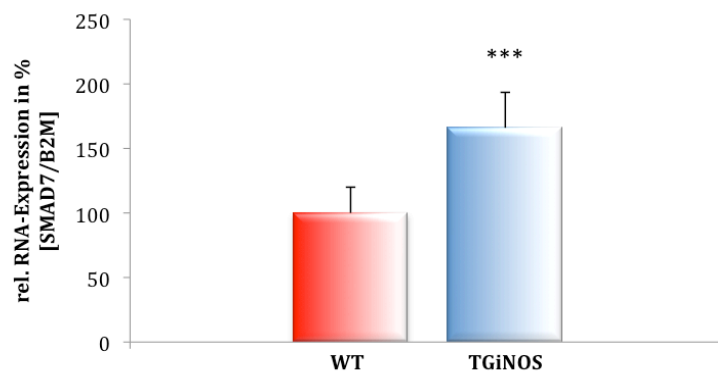


Abb. 4.28 Dargestellt ist die mRNA-Expression von SMAD7. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10); *p<0,05

Abbildung 4.28 zeigt die mRNA Expression von SMAD7. Diese ist signifikant auf etwa 170% in TGiNOS-Herzen gegenüber WT erhöht (166 \pm 16,54% TGiNOS vs. 100 \pm 22,65% WT).

4.6 SMADs und TGF- β_1 in TGiNOS-Herzen

TGF- β besitzt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Sein Einfluss erstreckt sich über Fibrosierung, Myokardhypertrophie und apoptotischen Zelluntergang bis hin zur kontraktile Dysfunktion (Henning, 2009). Außerdem wurden Zusammenhänge zwischen erhöhter TGF- β -Expression und NO-Freisetzung gezeigt.

4.6.1 TGF- β Level signifikant verringert

Um den Einfluss massiv erhöhter Stickstoffmonoxid-Level auf die TGF- β -Expression zu untersuchen, wurden TGF- β_1 -mRNA-, sowie die Protein-Expression analysiert.

Wie in Abb. 4.29 zu sehen, ist die mRNA-Expression von TGF- β signifikant auf etwa 70% in TGiNOS-Herzen verringert ($69,50 \pm 10,99\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 9,95\%$ WT).

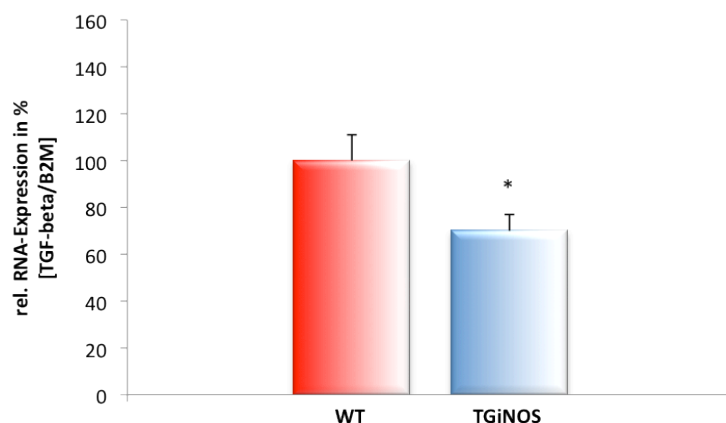


Abb. 4.29 Dargestellt ist die mRNA-Expression von TGF- β_1 . Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen. n=6; *p<0,05

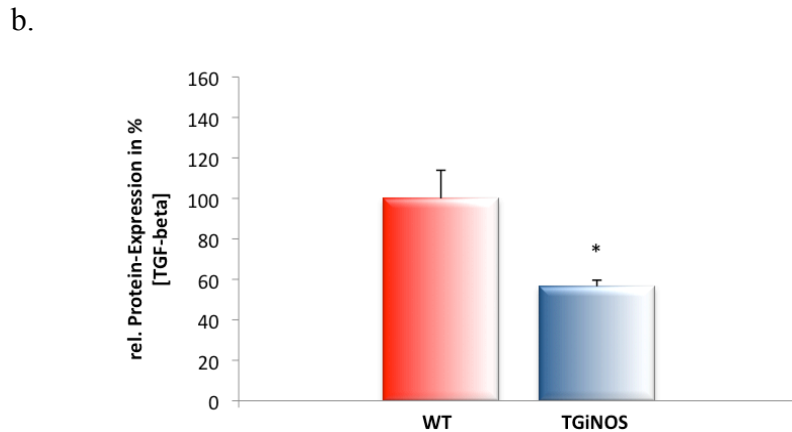
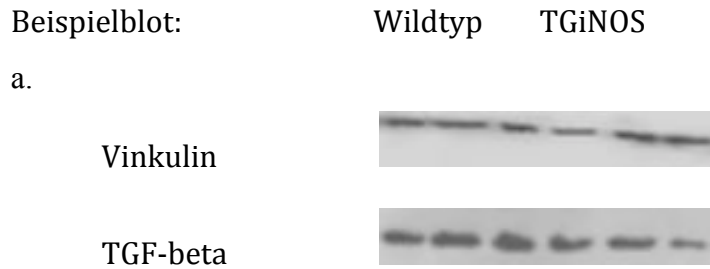


Abb. 4.30 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen TGF- β und Vinkulin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für TGF- β in Bezug auf das in der Probe enthaltene Vinkulin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6; *p<0,05

Im Western Blot zeigte sich eine signifikante Abnahme der TGF- β -Protein-Expression auf etwa 57% (56,56±12,02% TGiNOS vs. 100±17,83% WT).

Die verringerte Proteinexpression von TGF- β ist auf die stark erhöhten kardialen NO-Spiegel zurückzuführen.

DAPK1 ist ein TGF- β -Target-Gen und ein Aktivator der Apoptose (Eisenberg-Lerner, 2007). Um zu untersuchen, ob *DAPK1* verstärkt exprimiert wird, wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt.

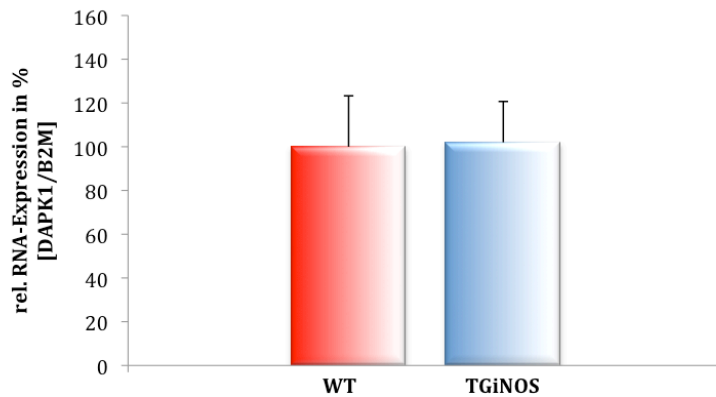


Abb. 4.36 Dargestellt ist die mRNA-Expression von DAPK1. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Das Ergebnis dieser Untersuchung (Abb. 4.36) zeigt keine nennenswerte Veränderung der mRNA-Expression der DAPK1 in TGiNOS-Herzen (95,97 \pm 13,06% TGiNOS vs. 100 \pm 19,40% WT).

4.7 Fibrose in TGiNOS-Herzen

Eine erhöhte Fibrosierung des Myokards ist eines der Hauptmerkmale in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Um zu untersuchen, wie sich die veränderten NO-Spiegel auf die Fibrosierung auswirken, wurde die relative RNA-Expression des Fibrosemarkers Collagen1 analysiert.

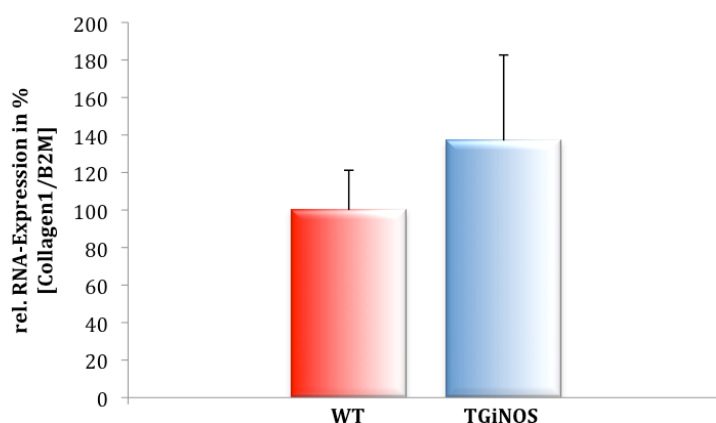


Abb.4.31 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Matrixproteins Collagen1. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die Analyse des Fibrosemarkers Collagen-1 ergab keine signifikante Erhöhung der mRNA Expression in TGiNOS-Herzen ($136,95 \pm 33,31\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 21,22\%$ WT).

4.8 Hypertrophie in TGiNOS-Herzen

Als ein wichtiger Parameter für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz gilt die Hypertrophie (Levy et al., 2002). Um zu untersuchen, ob die erhöhten NO-Spiegel einen Einfluss auf die kardiale Hypertrophie haben, wurde die relative RNA-Expression der Hypertrophiemarker ODC, ANP, BNP und α -MHC analysiert.

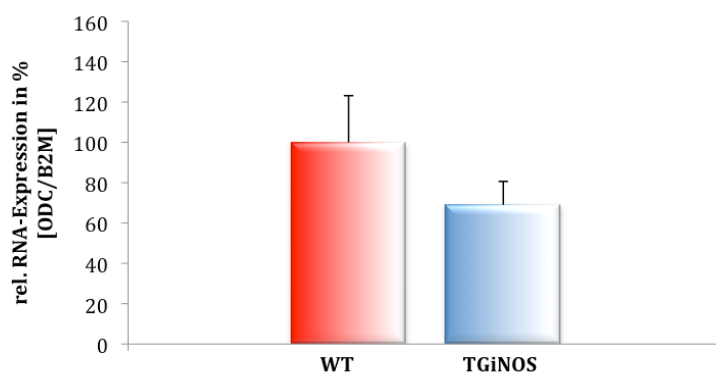


Abb. 4.32 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Hypertrophiemarkers ODC. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die Analyse des Hypertrophiemarkers ODC ergab keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression ($68,61\% \pm 16,87\%$ TGiNOS vs. $100\% \pm 26,15\%$ WT). Die erhöhten kardialen NO-Spiegel zeigen damit keinen Einfluss auf die ODC-Expression.

Weitere Hypertrophiemarker sind das ANP und das BNP. Noch vor einer kardialen Dekompensation der Herzinsuffizienz werden ANP und BNP vermehrt exprimiert (Langenickel et al., 2000).

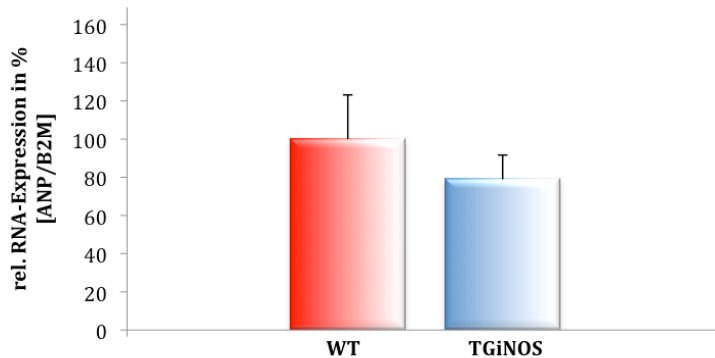


Abb. 4.33 Dargestellt ist die mRNA Expression des Hypertrophiemarkers ANP. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die mRNA Expressions-Analyse des Hypertrophiemarkers ANP zeigte keine signifikante Veränderung (78,84 \pm 16,01% TGInOS vs. 100 \pm 28,18% Kontrolle). Eine Zunahme der ANP-Expression, wie sie im hypertrophen Milieu einer Herzinsuffizienz anzutreffen wäre, zeigt sich hiermit nicht.

Zur genaueren Charakterisierung eines Einflusses der erhöhten kardialen NO-Spiegel auf die Hypertrophie, wurde die Genexpression des Hypertrophie-Markers BNP analysiert.

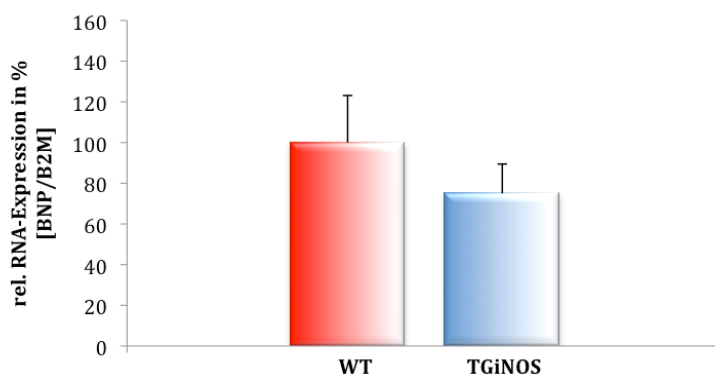


Abb. 4.34 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Hypertrophiemarkers BNP. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die kardiale Kontraktilität ist abhängig von kontraktilen Proteinen, wie dem α -MHC. Wei et al. (1998) zeigten in quantitativen Genexpressions-Analysen von α -MHC an gesunden und herzinsuffizienten Wistar Ratten, dass die kardiale Kontraktilität, sowie die α -MHC-Level in herzinsuffizienten Ratten gegenüber den gesunden Ratten verringert waren. Tanigawa et al., (1990), zeigten darüber hinaus, dass Mutationen in dem Gen, das α MHC codiert, zu u.a. einer hypertrophen Kardiomyopathie und atrialen Septumdefekten führt.

Die in Abbildung 4.34 dargestellten Ergebnisse, zeigen keine signifikante Änderung der mRNA-Expression des Hypertrophiemarkers BNP. ($71,76 \pm 19,27\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 27,30\%$ WT).

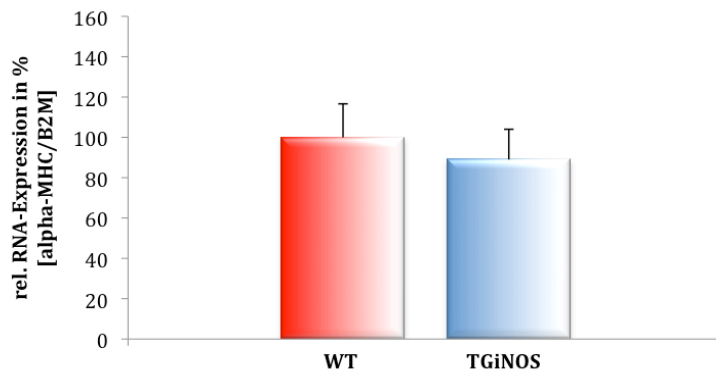


Abb. 4.35 Dargestellt ist die mRNA-Expression von α -MHC. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die Analyse ergab keine signifikante Änderung der Expressionswerte von α MHC in TGiNOS-Herzen ($89,32 \pm 16,87\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 1,08\%$ WT).

Es lässt sich somit aus den Ergebnissen der untersuchten Hypertrophie-Marker kein Einfluss der erhöhten kardialen NO-Spiegel auf die Hypertrophie ableiten.

4.9 NO und Apoptose

Die Induktion apoptotischen Zelluntergangs ist für die Progredienz der Herzinsuffizienz von großer Bedeutung. Um die Herzen der TGiNOS Versuchstiere im Hinblick auf veränderte Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Apoptosemarker analysiert.

4.9.1 Keine Anzeichen für Apoptose auf Bcl2/Bax-Ebene

Bcl-2 ist ein Angehöriger der gleichnamigen Proteinfamilie, dem ein anti-apoptotischer Effekt durch Stabilisierung der mitochondrialen Integrität zugeschrieben wird.

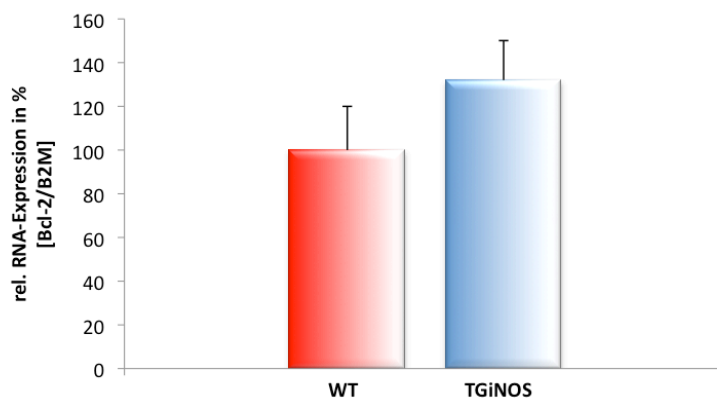


Abb. 4.37 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Apoptosemarkers Bcl-2 (anti-apoptotisch). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10).

Die in Abbildung 4.37 dargestellten Ergebnisse zeigen keine signifikante Veränderung der Bcl-2 mRNA-Expression (132,14 \pm 20,44% TGiNOS vs. 100 \pm 16,04% WT). Die erhöhten kardialen NO-Spiegel scheinen somit den apoptotischen Zelluntergang im Herzen nicht über eine veränderte Bcl-2-Expression zu beeinflussen. Um einen möglichen Einfluss des NO auf Bcl-2 abschließend bewerten zu können, wurde die Protein-Expression von Bcl-2 analysiert.

a.



b.

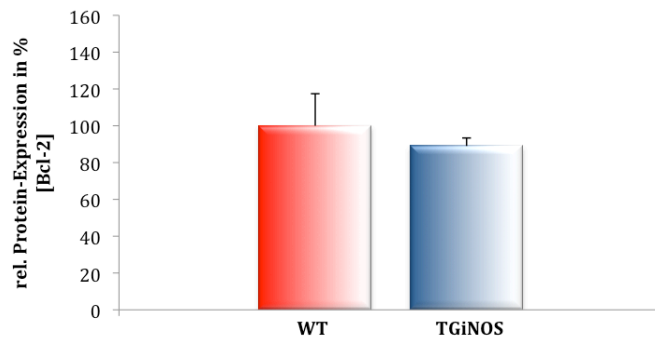


Abb. 4.38 Dargestellt sind a. Beispiel-Blots mit Antikörpern gegen Bcl-2 und Vinkulin, sowie b. die quantitative Analyse der Proteinexpression für Bcl-2 in Bezug auf das in der Probe enthaltene Vinkulin. Die Daten wurden mittels Western Blot an Proben aus Gesamtherzen erhoben. n=6

Der mit Antikörpern gegen Bcl-2 durchgeführte Western Blot (Abb. 4.38) zeigt auch auf Proteinebene keine signifikante Veränderung der Bcl-2-Expression ($88,62 \pm 11,76\%$ TGiNOS vs. $100 \pm 34,59\%$ WT) gegenüber der WT-Herzen. Es zeigt sich damit keine Wirkung von NO auf den Apoptosemarker Bcl-2. Dies allein lässt kaum eine Aussage über das Vorliegen eines entweder apoptotischen oder anti-apoptotischen Milieus in den TGiNOS-Kardiomyozyten zu. Als weiterer wichtiger Marker dient das Bax, welches im Folgenden untersucht wurde.

Ein weiterer Angehöriger der Bcl-2-Superfamilie ist Bax. Bax ist der direkte Gegenspieler des Bcl-2; seine Wirkung ist pro-apoptotisch.

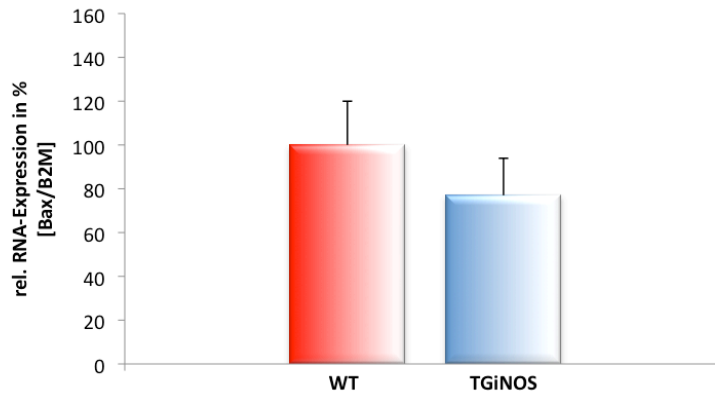


Abb. 4.39 Dargestellt ist die mRNA-Expression des Apoptosemarkers Bax (pro-apoptotisch). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen (n=10; *p<0,05).

Die mRNA-Expression des pro-apoptotisch wirkenden Apoptosemarkers Bax ist nicht signifikant verändert (76,86 \pm 13,77% TGINOS vs. 100 \pm 4,64% WT).

Nicht allein die absoluten Mengen beider Proteine sind für die Apoptoseinduktion entscheidend. Durch die Interaktion von Bcl-2 und Bax besitzt deren Verhältnis zueinander Aussagekraft für die Beurteilung der Apoptoseregulation. Üblicherweise wird dazu das Verhältnis von Bax/Bcl-2, die sog. Bax-Bcl-2-Ratio, betrachtet. Erhöhte Werte stehen dabei für ein pro-apoptotisches, erniedrigte für ein anti-apoptotisches Milieu.

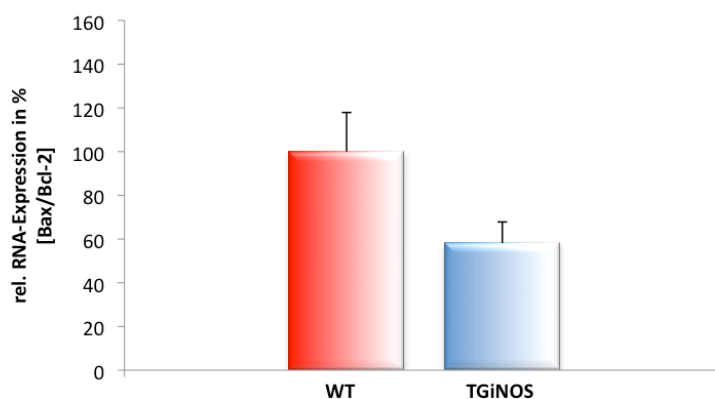


Abb. 4.40 Dargestellt ist die mRNA-Expression von BAX bezogen auf Bcl-2. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SD. Die Daten wurden mittels Real-Time RT-PCR aus Proben von Gesamtherzen gewonnen.

Das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 in TGiNOS-Herzen gegenüber der Wildtypen war tendenziell auf etwa 58% erniedrigt (58,17±16,63% Bax/Bcl-2 TGiNOS vs. 100±17,91% Bax/Bcl-2 WT).

4.9.2 Keine Toleranz gegen zusätzliche Gabe von TGF- β

NO und TGF- β sind beides Moleküle, die bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielen. Es sollte im Folgenden untersucht werden, welche Rolle eine zusätzliche TGF- β -Stimulation in TGiNOS Kardiomyozyten spielt. Dazu wurde ein Caspase-3/7-Assay durchgeführt. Kardiomyozyten wurden isoliert und für eine Dauer von 6 Stunden mit TGF- β_1 inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle unter identischen Bedingungen mitgeführt, welche nicht mit TGF- β_1 inkubiert wurde. Die erhaltenen Werte wurden in Beziehung zu den jeweiligen Kontrollen gesetzt.

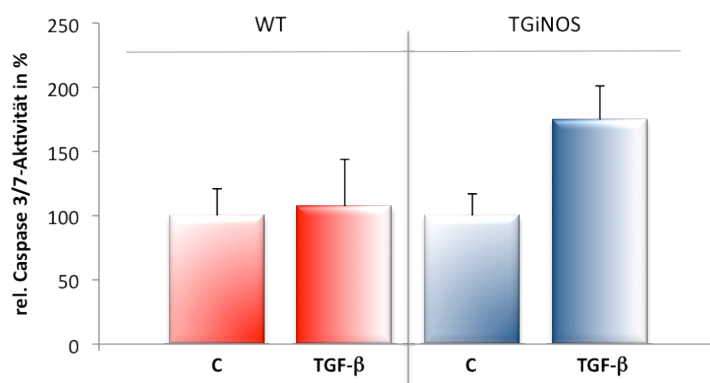


Abb. 4.41 Dargestellt ist die quantitative Auswertung der relativen Caspase 3/7-Aktivität in isolierten WT-Kardiomyozyten (erste und zweite Säule v.l.), sowie TGiNOS-Kardiomyozyten (dritte und vierte Säule v.l.). Die unbehandelten Kontrollen befinden sich jeweils links. Die zweite und vierte Säule v.l. zeigen die relative Caspase 3/7-Aktivität der jeweiligen Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 3 ng/ml TGF- β_1 . Die Daten wurden des Caspase-Glo® 3/7 Assays (Promega) an isolierten und kultivierten Kardiomyozyten erhoben. (n=3; **p<0,01).

Die in Abb. 4.41 dargestellten Ergebnisse zeigen bei den Wildtyp-Kardiomyozyten eine tendenzielle Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität um etwa 7% gegenüber der Kontrolle, während es bei den TGiNOS Kardiomyozyten zu einer signifikanten Erhöhung auf etwa 175% gegenüber der Kontrolle kam. Dies zeigt, dass TGF- β in iNOS-überexprimierenden Mäusen verstärkt Apoptose im Herzen auslösen kann.

4.10 NO und TGF- β

4.10.1 Kontraktionsversuche

Da eine zusätzliche TGF- β -Stimulation zu einer Aktivierung der Caspase 3 oder 7 führt, wurde untersucht, welche Auswirkung TGF- β_1 auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten hat. Dafür wurden isolierte Kardiomyozyten für 6 Stunden mit 1ng, sowie 3ng TGF- β_1 inkubiert und auf ihre Kontraktionsparameter hin analysiert.

Die in Abb. 4.42 und 4.43 dargestellten Messergebnisse zeigen keine signifikante Verringerung der Kontraktionsparameter der WT Kardiomyozyten durch Gabe von 1ng/ml TGF- β_1 gegenüber der Kontrolle. (199,46 μ m/s Con.-Vel. in WT + 1ng TGF- β_1 vs. 205,21 μ m/s Con.-Vel. WT; 183,5 μ m/s Rel.-Vel. in WT + 1ng TGF- β_1 vs. 178,79 μ m/s Rel.-Vel. in WT; 6,57% dL/L in WT + 1ng TGF- β_1 vs. 7,46% dL/L in WT).

Eine Gabe von 3ng/ml TGF- β_1 führte hingegen zu einer signifikanten Verringerung der Kontraktionsparameter. Nach Inkubation von 3ng/ml TGF- β_1 sanken sowohl die Kontraktionsgeschwindigkeit, als auch die Relaxationsgeschwindigkeit der WT-Kardiomyozyten auf ungefähr die Hälfte ab. Sowohl unter einer Stimulationsfrequenz von 1Hz, (98,17 μ m/s Con.-Vel. in WT + 3ng TGF- β_1 vs. 205,21 μ m/s Con.-Vel. WT; 81,71 μ m/s Rel.-Vel. in WT + 3ng TGF- β_1 vs. 178,79 μ m/s Rel.-Vel. in WT), (siehe Abb. 4.48 b, c), wie auch von 2Hz, (120,31 μ m/s Con.-Vel. in WT + 3ng TGF- β_1 vs. 205,21 μ m/s Con.-Vel. WT; 86,94 μ m/s Rel.-Vel. in WT + 3ng TGF- β_1 vs. 178,79 μ m/s Rel.-Vel. in WT).

Im Gegensatz zu den WT-Kardiomyozyten zeigten die TGiNOS-Kardiomyozyten bereits nach Gabe von 1ng/ml TGF- β_1 eine, mit den Folgen der Gabe von 3ng/ml TGF- β_1 bei WT-Kardiomyozyten vergleichbare, signifikante Verringerung ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit, sowie ihrer Relaxationsgeschwindigkeit auf ebenfalls ungefähr die Hälfte des Kontrollwertes. Auch diese Veränderungen unterschieden sich unter den beiden Stimulationsfrequenzen nur geringfügig. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz: (146,5 μ m/s Con.-Vel. in TGiNOS + 1ng TGF- β_1 vs. 254,55 μ m /s Con.-Vel. TGiNOS; 112,00 μ m/s Rel.-Vel. in TGiNOS + 1ng TGF- β_1

vs. 209,56 $\mu\text{m/s}$ Rel.-Vel. in TGiNOS), (siehe Abb. 4.48 b, c). Bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz: (135,3 $\mu\text{m/s}$ Con.-Vel. in TGiNOS + 1ng TGF- β_1 vs. 251,47 $\mu\text{m/s}$ Con.-Vel. TGiNOS; 132,4 $\mu\text{m/s}$ Rel.-Vel. in TGiNOS + 1ng TGF- β_1 vs. 219,22 $\mu\text{m/s}$ Rel.-Vel. in TGiNOS), (siehe Abb. 4.43 b, c).

Eine Gabe von 3ng/ml TGF- β_1 führte bei den TGiNOS Kardiomyozyten zu einem vollständigen Verlust der Kontraktionsfähigkeit.

4.10.2 Kontraktionsparameter nach TGF- β -Inkubation (1Hz)

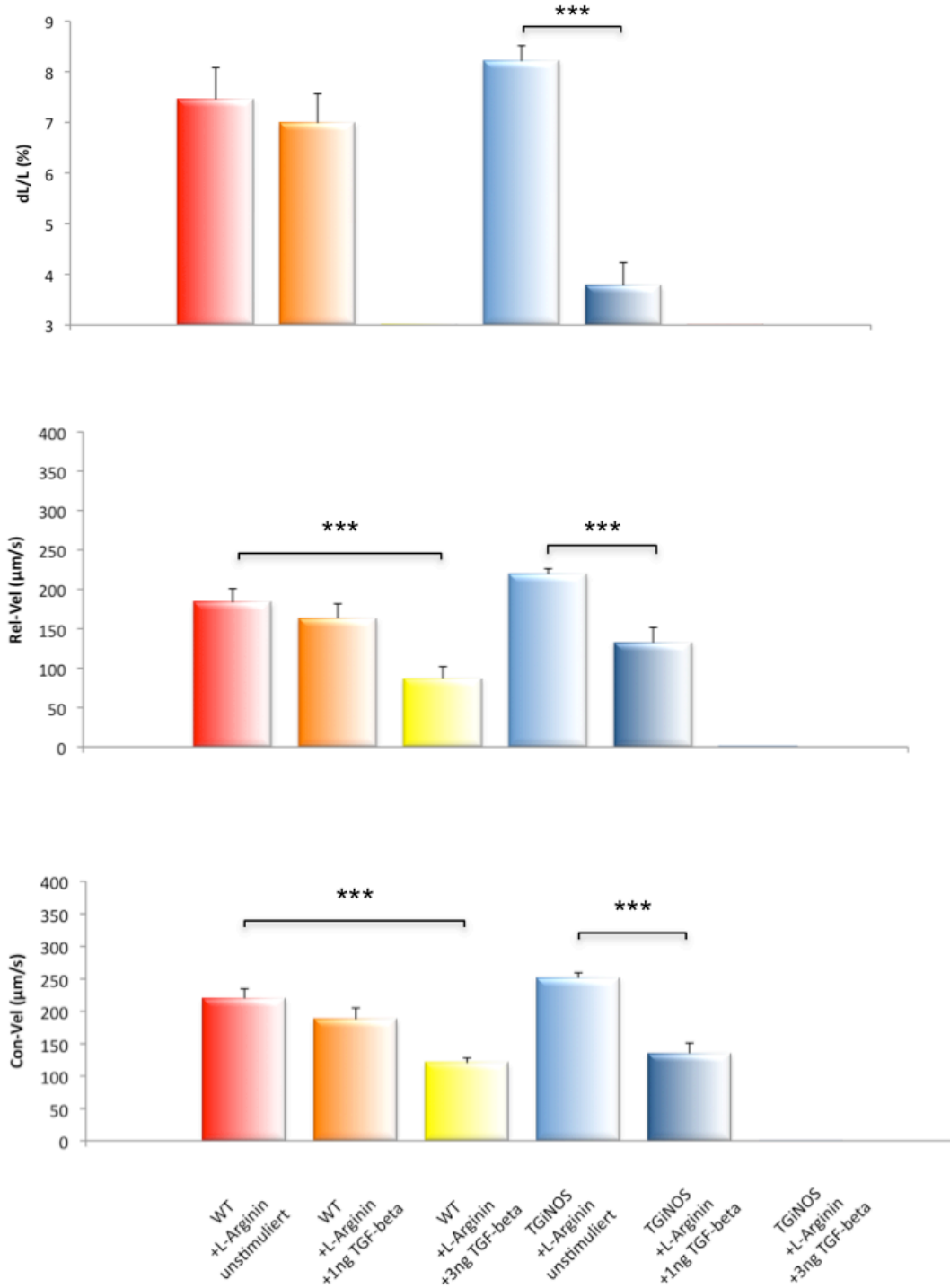


Abb. 4.42 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGINOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung, die Relaxationsgeschwindigkeit und die Verkürzungsgeschwindigkeit. Das Kulturmedium wurde bei allen Versuchen mit 200mM L-Arginin versetzt. *** $p < 0,001$ (n=19, aus vier Präparationen).

4.10.3 Kontraktionsparameter nach TGF- β -Inkubation (2Hz)

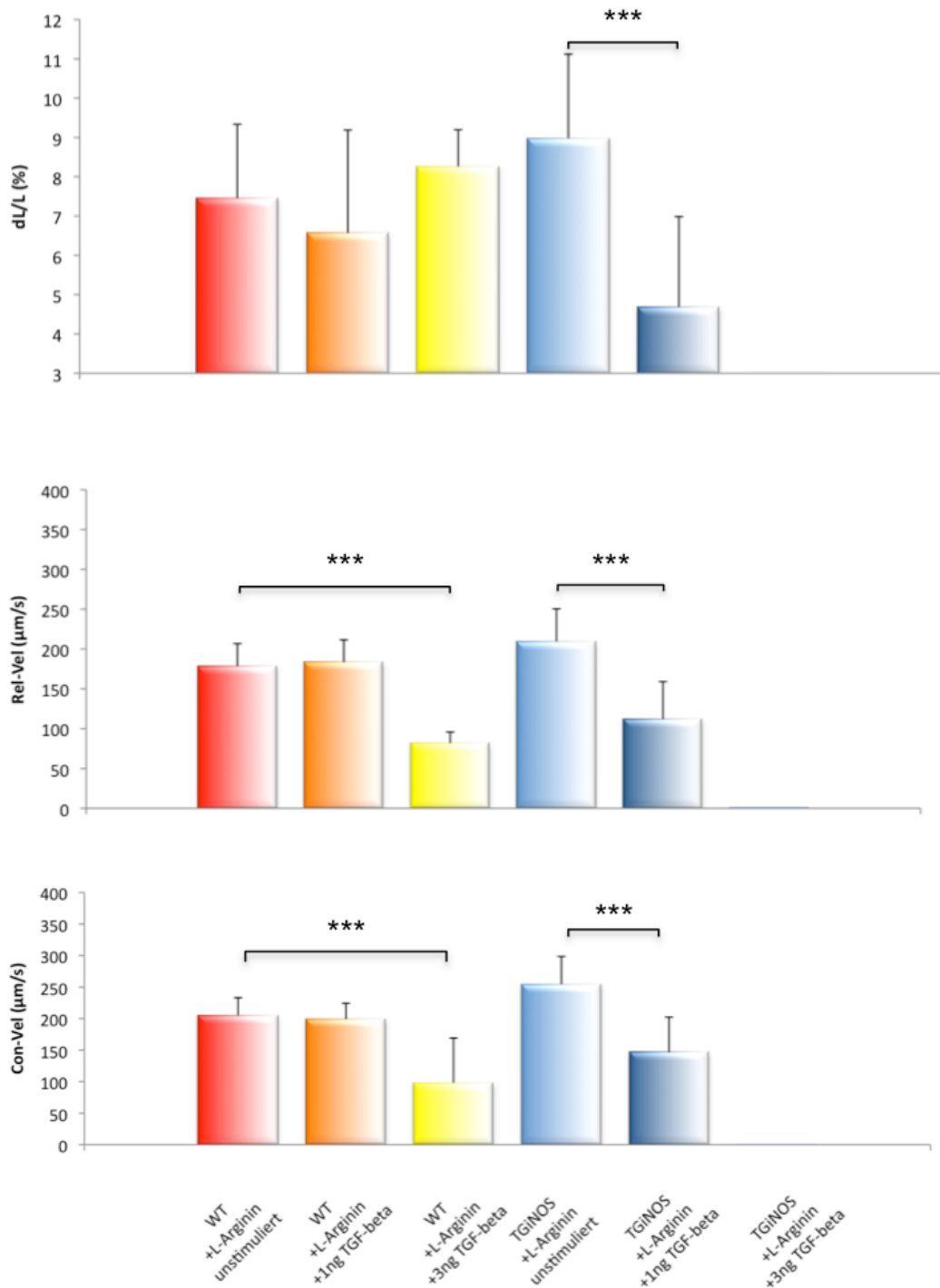


Abb. 4.43 Vergleich des Kontraktionsverhaltens adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der TGINOS-Tiere gegenüber der WT-Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung, die Relaxationsgeschwindigkeit und die Verkürzungsgeschwindigkeit. Das Kulturmedium wurde bei allen Versuchen mit 200mM L-Arginin versetzt. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=19, aus vier Präparationen).

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass TGiNOS-Kardiomyozyten eine bessere basale kontraktile Funktion besitzen als WT-Kardiomyozyten. Durch zusätzliche Gabe von L-Arginin verschlechtert sich zwar die Kontraktilität der TGiNOS-Kardiomyozyten, bleibt dabei aber höher als die Kontraktilität der WT-Kardiomyozyten. Die zusätzliche Gabe von L-Arginin hat auf die WT-Kardiomyozyten keine Auswirkung. TGF- β ist herunterreguliert. R-SMAD-Proteine sind aktiviert, allerdings nicht SMAD 2/3/4 und AP1, was zur Apoptose führen würde. Die Expression der inhibitorischen SMADs 6 und 7 ist TGF- β -unabhängig erhöht. Auch das Bax/Bcl-2-Verhältnis ist nicht signifikant erniedrigt und auch DAPK ist nicht erhöht, was für anti-apoptotische Verhältnisse spricht. Die TGiNOS-Kardiomyozyten weisen eine geringere β -adrenerge Ansprechbarkeit auf, da sie unter Stimulation mit Isoprenalin kaum ihre Kontraktilität steigern können. Gleichzeitig ist die Expression der SERCA 2A signifikant verringert. Die Relevanz des verringerten TGF- β -Spiegels als einflussreicher Kompensationsmechanismus wird auch auf Ebene der Kardiomyozyten deutlich. Dies scheinen Mechanismen zu sein, die dafür sorgen, dass die Tiere klinisch unauffällig erscheinen. Die TGiNOS-Kardiomyozyten zeigen bei Inkubation mit geringen Mengen an TGF- β_1 ein rapides Absinken ihrer Kontraktilität bis hin zum völligen Kontraktilitätsverlust. Die TGiNOS-Kardiomyozyten gehen durch geringe TGF- β_1 -Gaben in die Apoptose über, bei denen WT-Kardiomyozyten keine Veränderungen zeigen.

5.1 NOS-Expression

Um die Eignung des gewählten Tiermodells zur Untersuchung des Einflusses erhöhter iNOS-Spiegel auf Herzmuskelzellen zu prüfen, wurden die phänotypischen Eigenschaften der iNOS-Transgenität charakterisiert. Da die Transgenität von Versuchstieren nach mehreren Generationsfolgen verloren gehen kann, war es unerlässlich, jedes Versuchstier auf seine Transgenität hin zu analysieren. Dazu wurden die Herzen TGiNOS überexprimierender Mäuse vergleichend mit Kontrollen nicht transgener Mauserzen (Wildtypen, WT) auf ihre iNOS-Genexpression hin analysiert. Die TGiNOS-Hezen zeigten eine, auf das 1600-fache gesteigerte iNOS-RNA-Expression. Die Proteinexpression zeigte eine

signifikante Steigerung auf den 6-fachen Wert. Diese Erhöhung zeigt die Auswirkung der iNOS-Transgenität auf die Versuchstiere. Die Genexpression der eNOS in den TGiNOS-Herzen zeigt allerdings keine signifikante Änderung. Auch Reinartz et al. (2011) konnten bei Untersuchungen an iNOS-überexprimierenden Mäusen zeigen, dass sowohl die Genexpression, als auch die Proteinexpression der beiden Isoformen eNOS und nNOS unverändert waren.

5.2 Kontraktilität isolierter adulter TGiNOS-Kardiomyozyten

Bisherige Veröffentlichungen über TGiNOS-Mäuse beruhen auf Untersuchungen, die ausschließlich an Gesamtherzen durchgeführt wurden. In der hier vorliegenden Arbeit werden erstmals Ergebnisse auf Zellebene dargestellt. Es konnte eine Steigerung der basalen Kontraktilität als Einfluss erhöhter NO-Spiegel an isolierten TGiNOS-Mauskardiomyozyten nachgewiesen werden. Denn bei den TGiNOS-Kardiomyozyten zeigt sich, sowohl unter einer Stimulationsfrequenz von 1Hz, als auch von 2Hz eine signifikante Erhöhung der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, sowie der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit. Der Einfluss von NO auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten wird kontrovers diskutiert. Jedoch gibt es Hinweise, dass die NO-Wirkung auf die Kontraktilität biphasisch ist. Kojda et al. (1997) zeigten an isolierten Ratten-Kardiomyozyten, dass NO-Konzentrationen in physiologischer Höhe positiv inotrop wirken, hohe NO-Konzentrationen dagegen eine negativ inotrop Wirkung besitzen. Damit besitzen TGiNOS-Kardiomyozyten eine basal erhöhte Kontraktilität.

Aufgrund der erhöhten iNOS-Aktivität in den TGiNOS-Herzen kommt es zu einer dauerhaften Verringerung des L-Arginin-Spiegels im Herzen, da Arginin als Substrat zur NO-Synthese benötigt wird. Heger et al. (2001) zeigten, dass die physiologische L-Arginin-Konzentration, wie sie in Wildtyp-Mäusen gemessen wurde und 85% abgesunken war. Dies gab Anlass dazu, alle Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten unter zusätzlicher Gabe von L-Arginin durchzuführen. Das Medium, in dem die Kardiomyozyten kultiviert wurden, besaß bereits physiologische L-Arginin Konzentrationen. Vergleichende Kontraktilitätsmessungen zwischen TGiNOS-Kardiomyozyten mit physiologischer L-Arginin-Konzentration und zusätzlicher L-Arginin-Gabe zeigen bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz eine signifikante Abnahme der maximalen

Kontraktionsgeschwindigkeit, der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, sowie der relativen Zellverkürzung durch zusätzliche L-Arginin-Gabe.

Die zusätzliche Arginin-Gabe führt somit wahrscheinlich zur erhöhten NO-Synthese, so dass die hohen NO-Spiegel einen negativ inotropen Effekt ausüben. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, wie eingangs erwähnt, dass NO konzentrationsabhängig positiv inotrop oder negativ inotrop wirken kann (Champion et al., 2004). Sarkar et al. (2000) zeigten an isolierten humanen Kardiomyozyten einen positiv inotropen Effekt durch NO. Sie erkannten dabei, dass die Menge des durch die eingesetzten NO-Donatoren gebildeten NOs für die differentielle Inotropie-Wirkung ausschlaggebend war. Müller-Strahl et al. (2000) zeigten in Versuchen an Rattenherzen, dass physiologische NO-Konzentrationen, durch die NO-Donatoren SNAP und DEA/NO eine positiv inotrope Wirkung in Langendorff-Herzen vermittelten. Einen negativ inotropen Effekt iNOS-abhängigen NOs in Kardiomyozyten beschreiben Kinugava et al. (1997) und führen ihn auf eine Aktivierung cGMP-abhängiger Protein-Kinasen zurück. Funakoshi et al. konnten (2002) an transgenen TNF- α Mäusen zeigen, dass eine Inaktivierung der iNOS u.a. einen positiv inotropen Effekt hatte. Die, im Rahmen einer Herzinsuffizienz erhöhte iNOS-Aktivität, führt zu kardialen NO-Spiegeln, die einen negativ inotropen Effekt vermitteln. Wunderlich et al. (2003) zeigten einerseits den negativ inotropen Effekt hoher iNOS-abhängiger NO-Spiegel, sowie andererseits, dass Myoglobin ein wichtiger zytoplasmatischer Puffer iNOS-abhängigen NOs ist. Sie konnten die Scavenger-Wirkung von Myoglobin durch Kohlenstoffmonoxid hemmen und eine negativ inotrope Wirkung des iNOS-abhängigen NOs zeigen. Die NO-Verfügbarkeit wird damit über das Myoglobin reguliert.

Die, im Rahmen dieser Arbeit gemessene Verringerung der Kontraktionsparameter durch Gabe von L-Arginin in TGiNOS-Kardiomyozyten legt nahe, dass die iNOS in unseren Versuchen das zusätzliche L-Arginin zur vermehrten NO-Synthese nutzt und die NO-Synthase dadurch in einen Bereich negativ inotroper Wirkung kommt, wie sie auch in insuffizienten Herzen bei erhöhter iNOS-Aktivität gefunden wird.

Trotz der signifikanten Abnahme der Kontraktionsparameter unter zusätzlicher L-Arginin-Gabe übertreffen die basalen Kontraktionsparameter immer noch diejenigen der Wildtyp-Kardiomyozyten. Unsere Messungen scheinen die in der

vorgenannten Arbeit (Heger et al., 2001) geäußerte Vermutung, die NO-Synthese werde durch die deutlich eingeschränkte Substratverfügbarkeit nicht maximal ausgeschöpft, zu stützen. Dabei induziert eine zusätzliche Gabe von L-Arginin in der verwendeten Konzentration keinen Eigeneffekt auf das Kontraktionsverhalten der Wildtyp-Kardiomyozyten. Dies zeigen die unveränderten Kontraktionsparameter der Wildtyp-Kardiomyozyten mit bzw. ohne zusätzliche L-Arginin-Gabe. Wie von Heger et al. (2001) gezeigt, synthetisieren die Herzen bereits große Mengen NO. Dies belegen u.a. die erhöhten Spiegel der NO-Abbauprodukte Nitrit und Nitrat. Damit stellt sich die Frage, ob durch die höhere Verfügbarkeit des L-Arginin durch die iNOS höhere Konzentrationen an NO synthetisiert wurden, oder ob das zusätzliche L-Arginin durch ein weiteres Enzym umgesetzt wurde. Das NO-Abbauprodukt Nitrat konnte in den Herzen der hier untersuchten TGiNOS-Tiere in erhöhten Mengen nachgewiesen werden. Nitrat entsteht bei dem Abbau des NO durch Myoglobin.

Arginin wird neben der iNOS auch durch das Enzym Arginase als Substrat umgesetzt (siehe 1.4.2). Das Produkt dieser Reaktion ist das Substrat der ODC; das Ornithin. Die ODC katalysiert daraus Putrescin.

Die TGiNOS-Gesamtherzen weisen keine signifikante Änderung der RNA-Expression der ODC gegenüber den Wildtypen auf.

Zhao et al. (2009) beschrieben die kardioprotektive Wirkung erhöhter ODC-Expression durch die Proteinkinase C an isolierten Rattenkardiomyozyten. Bei der hier gezeigten, tendenziell verringerten Genexpression, scheint ein solcher kardioprotektiver Einfluss in TGiNOS-Herzen nicht gegeben.

Jung et al. (2005) zeigten, dass Arginase I in Kardiomyozyten die Verfügbarkeit von L-Arginin als Substrat für den NO/cGMP-Weg limitiert. Als Folge konnten sie eine erhöhte basale Kontraktilität der Kardiomyozyten messen. Die negativ inotrope Wirkung der in den Untersuchungen bestehenden NO-Konzentrationen nahm durch die verringerte NO-Produktion ab. Jung et al. (2005) postulierten ein dynamisches Gleichgewicht zwischen NOS und Arginase über deren gemeinsames Substrat L-Arginin und schreiben der Arginase eine Rolle als Modulator der NO-Produktion zu.

Die in dieser Arbeit gezeigte erhöhte basale Kontraktilität lässt sich auf die positiv inotrope Wirkung der NO-Spiegel in TGiNOS-Herzen zurückführen. Aufgrund der hohen iNOS-Aktivität fehlt es der Arginase an ihrem Substrat, dem L-Arginin. Es wird kein Ornithin gebildet. Zudem ist die Expression der ODC nicht erhöht.

Die zusätzliche Gabe von L-Arginin könnte nun aber auch als Substrat für die Arginase dienen. Es zeigt sich allerdings ein negativ inotroper Effekt durch das zusätzliche L-Arginin in den TGiNOS-Kardiomyozyten, wie er durch eine weitere Steigerung des NO-Spiegels durch die iNOS erklärt werden kann.

5.3 Isolierte, adulte TGiNOS Kardiomyozyten und Isoprenalin

Kontraktionsversuche unter β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalin konnten zeigen, dass das β -adrenerge Ansprechverhalten der TGiNOS-Kardiomyozyten signifikant geringer als das der WT-Kardiomyozyten ist. Die Kontraktilität der Kardiomyozyten wird im späteren Verlauf einer Herzinsuffizienz stark verringert. Insgesamt zeigt die Gruppe der TGiNOS keine signifikante β -adrenerge Ansprechbarkeit. Die WT-Kardiomyozyten zeigen hingegen eine signifikante Erhöhung ihrer Kontraktionsparameter unter β -adrenerger Stimulation. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden unter Zugabe von 5 μ g/ml Isoprenalin gewonnen. Dabei lässt sich unter einer Stimulationsfrequenz von 1Hz eine signifikante Zunahme der relativen Zellverkürzung zeigen.

Neben den erhöhten basalen Kontraktionsparametern, wie zum Beispiel einer erhöhten relativen Zellverkürzung, besitzen die TGiNOS-Kardiomyozyten auch eine geringere β -adrenergen Ansprechbarkeit als die WT-Kardiomyozyten. Die durchgeführten Untersuchungen zur RNA-Expression der β 2-Adrenozeptoren zeigte keinerlei Unterschiede zwischen TGiNOS- und Wildtyp-Herzen. Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen von Reinartz et al. (2011), die, allerdings an Gesamtherzen, ebenfalls eine unveränderte Expression der β 2-Adrenozeptoren nachwies. Somit können die β 2-Adrenozeptoren nicht als Erklärung für die stark verringerte β -adrenerge Ansprechbarkeit der TGiNOS-Kardiomyozyten dienen. Vielmehr könnte ein möglicherweise veränderter Ca^{2+} -Stoffwechsel eine Erklärung der verringerten β -adrenergen Ansprechbarkeit liefern.

5.4 Kontraktilität und Ca^{2+} -Stoffwechsel

Da die Kontraktilität der Kardiomyozyten von der zeitlichen und räumlichen Verteilung des intrazellulären Ca^{2+} , sowie der Calcium-Konzentration abhängig ist, wurde die Expression der sog. Calcium-Handling-Proteine analysiert. Dies sind der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), die Sarcoplasmatische- und Endoplasmatische Ca^{2+} -ATP-ase (SERCA 2A) und das Phospholamban. Die SERCA 2A, sowie das Phospholamban spielen eine wichtige Rolle für die myokardiale Relaxationsgeschwindigkeit. Die SERCA 2A initiiert die Relaxation der Kardiomyozyten durch Wiederaufnahme von Ca^{2+} . De la Bastie et al., (1990) und Mercadier et al. (1990) zeigten, dass die Genexpression der SERCA 2A in Kardiomyozyten bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz absinkt. Um eine Ca^{2+} -Clearance und damit die Relaxation des Kardiomyozyten gewährleisten zu können, kommt es kompensatorisch zu einer gesteigerten Expression des NCX. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz wird die SERCA 2A verringert exprimiert (Jiang et al., 2002). In TG*i*NOS-Mäusen kommt es nicht zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz und doch wird die SERCA 2A signifikant geringer exprimiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern eine signifikante Abnahme der SERCA 2A RNA-Expression, bei einer nicht signifikanten Erhöhung der NCX RNA-Expression; dies kann als ein Trend in Richtung der, in den letztgenannten Arbeiten beschriebenen Expressionsverschiebungen bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz, gewertet werden. Die TG*i*NOS-Kardiomyozyten zeigen trotz der verringerten SERCA 2A-Genexpression eine basal erhöhte Kontraktilität. Es erscheint plausibel, dass die beschriebene Expressions-Veränderung der Calcium-Handling-Proteine der positiv inotropen NO-Wirkung in TG*i*NOS-Kardiomyozyten entgegen wirken sollen.

Luo et al. (1994) zeigten an Phospholamban-Knockout-Mäusen, dass die basale Kontraktilität derer der maximal β -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten von Wildtyp-Herzen entsprach. Gleichzeitig beschrieben sie den Verlust der β -adrenergen Stimulierbarkeit. Die hier dargestellten Analysen der Calcium-Handling-Proteine können nicht zur Erklärung der verringerten β -adrenergen Ansprechbarkeit der TG*i*NOS-Kardiomyozyten dienen. Auch stellen die hier beschriebenen Ergebnisse Analysen von TG*i*NOS-Gesamtherzen dar. Damit können

nur Aussagen über die basalen Veränderungen innerhalb der TGiNOS-Herzen getroffen werden. Die kardiomyozytären Veränderungen können aus den Analysen der Gesamtherzen damit nur sehr eingeschränkt und nicht abschließend bewertet werden.

5.5 NO und TGF- β

Die TGiNOS-Herzen zeigen eine signifikant verringerte RNA-Expression, sowie Proteinexpression von TGF- β . Interessanter Weise ist die Verringerung der Proteinlevel noch ausgeprägter als es die Gen-Expression erwarten ließe. Eine Regulation zwischen mRNA-Expression und der Synthese des Proteins scheint wahrscheinlich. Bascom et al. (1989) untersuchten die posttranskriptionale Autoregulation der TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3. Dabei beobachteten sie eine frühe (1h, 6h, 12h), bis 25-fach erhöhte mRNA-Expression und eine spätere Herunterregulation. Die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression können nicht auf eine Autoregulation zurückgeführt werden. Die hier erhobenen Daten beinhalten keine Zeitkinetik. Sie stellen die RNA-, sowie Protein-Expressionswerte in TGiNOS-Herzen gegenüber Wildtyp-Herzen dar. Die Veränderungen in den TGiNOS-Herzen können als Anpassung an die chronisch erhöhte iNOS-Expression gewertet werden.

Saura et al., (2005) zeigten u.a. in kultivierten Aorta-Endothelzellen eNOS-defizienter Mäuse, dass NO cGMP-abhängig durch den TGF- β -/SMAD-Signalweg regulierte Gene, sowie die Expression von TGF- β selbst inhibiert. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass die Kerntranslokation von SMAD2/3 durch NO in ihrer Geschwindigkeit verzögert und insgesamt verringert wird. Saura et al. schreiben der gezeigten Hemmung der TGF- β -Wirkung durch eNOS-abhängiges NO die Funktion eines Kompensationsmechanismus gegen die pathologischen Folgen erhöhter TGF- β -Expression und -Signalgebung im Herzen zu. Sie vermuten in der eNOS-abhängigen Kontrolle der TGF- β -Expression und Signalgebung einen Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer Homöostase der Gefäßwände. In dem hier untersuchten Modell iNOS-überexprimierender Mäuse, scheint das iNOS-abhängige NO ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die TGF- β -Expression zu besitzen. Dies steht in Einklang mit den Expressionsanalysen der TGF- β -Target-Genen, die keine erhöhten Expressionswerte zeigen.

TGF- β besitzt verschiedene Target-Gene, deren Expressionen durch TGF- β induziert werden. Aufgrund der, in den TGiNOS-Herzen verringerten TGF- β -Spiegel, ist keine Expressionserhöhung der TGF- β -Target-Gene zu erwarten. Die DAP-Kinase-1 (*DAPK1*) ist ein TGF- β -Target-Gen. DAPK1 wirkt als Aktivator der Apoptose (Eisenberg-Lerner, 2007). Ihre Genexpression ist in TGiNOS-Herzen unverändert, obwohl eine verringerte Expression zu vermuten war. TGF- β führt neben Fibrosierung, auch zu einer Hypertrophie des Herzen (Lijnen et al., 2000). Um Informationen über das Vorliegen möglicher Veränderungen zu erhalten, wurde die Genexpression von Collagen-1 (*COL1A*), einem weiteren TGF- β Target-Gen, analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es in den TGiNOS-Herzen zu keiner Fibrosierung kommt, wie sie im Zuge des Remodeling beim Übergang einer kompensierten in eine dekompenzierte Herzinsuffizienz auftritt (Definition des späten kardialen Remodelings: Pfeffer und Braunwald; 1990; Ertl et al., 1993 und Jessup and Brozena, 2003). Die Betrachtung der Durchschnittswerte des Fibrosemarkers Collagen1 zeigt lediglich einen Trend zu erhöhter Fibrosierung von TGiNOS-Herzen. Das Ergebnis der Gen-Expressionsanalyse des Hypertrophiemarkers ODC in TGiNOS-Herzen zeigt keine signifikanten Veränderungen zwischen TGiNOS- und WT-Herzen. Die weiteren Hypertrophiemarker ANP (Atriales natriuretisches Peptid) und BNP (Brain natriuretic Peptid) werden in TGiNOS-Herzen ebenfalls leicht verringert exprimiert. Eine Hypertrophie der TGiNOS-Herzen liegt nicht vor.

5.6 NO, TGF- β und SMADs

Die Signaltransduktion der TGF- β -RII und -RI erfordert u.a. eine Komplexierung der phosphorylierten und damit aktivierten SMAD-Proteine 2 und 3. Diese bilden Homodimere und Heterodimere mit SMAD4 (Shi & Massagué, 2003). Als wichtige Kenngröße für die effektive Signalweitergabe kann das Verhältnis der phosphorylierten zur inaktiven Form phosphorylierbarer SMADs gelten. Das Verhältnis phosphorylierter SMAD2 zur inaktiven Form ist in TGiNOS-Kardiomyozyten signifikant verringert.

Die signifikante Abnahme der Phosphorylierung von SMAD-Proteine scheint eine Möglichkeit der TGiNOS-Mäuse zu sein, die NO-/TGF- β -Wirkung zu kompensieren. Eine weitere Einflussnahme besteht in der Regulation inhibitorischer SMADs

(SMAD 6 und 7). Die Genexpression von SMAD7 ist signifikant erhöht. Ulloa et al. (1999) zeigten, dass das gegenüber TGF- β antagonistisch wirkende IFN- γ die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD3, die Komplexierung von SMAD 3 und 4 und die Akkumulation von SMAD 3 im Zellkern hemmt. Darüber hinaus erhöhte TGF- β die Expression des I-SMADs SMAD 7, was die Bindung des TGF- β -Rezeptors mit SMAD 3 verhindert. Die bekannte autoregulatorische Funktion des SMAD 7 stellt einen negativen Feedback-Mechanismus auf erhöhte TGF- β -Spiegel dar.

Das Gesamtbild unserer Untersuchungen der TGF- β /SMAD-Signalkaskade zeigt neben den zu erwartenden Folgen des verringerten TGF- β -Spiegels auch die Feedback-unabhängige Erhöhung der I-SMAD-Expression. Die erhöhte Expression der I-SMADs führt zu einer Hemmung der Signalweitergabe innerhalb der SMAD-Kaskade.

Es ist nachgewiesen, dass eine Stimulation mit NO zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und von SMADs führt und Apoptose in Kardiomyozyten auslöst (Schneiders et al., 2005).

Weil die SMAD-Bindungsaktivität erhöht ist, aber die Spiegel von SMAD 2/3/4 niedrig, wurden auch Expressionsanalysen der SMAD-Proteine 1/5/8 durchgeführt. Neben einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von SMAD 1 zeigen sich nicht signifikante Änderungen der Expression von SMAD 5 und 8. Schneiders et al. zeigten 2005, dass erhöhte NO-Spiegel mit einer Aktivierung von SMAD-Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten einhergehen. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Bindungsstudien eine erhöhte Bindungsaktivität für SMAD-Transkriptionsfaktoren in TGiNOS-Herzen nachgewiesen werden. SMAD2 kann nicht für die erhöhte Bindungsaktivität verantwortlich gemacht werden, da keine erhöhte Phosphorylierung von SMAD2 gezeigt werden konnte. Andere Isoformen könnten zu der Erhöhung der Bindungsaktivität geführt haben. So könnte zum Beispiel SMAD4 dafür verantwortlich sein. SMAD4 transloziert auch in den Zellkern, wird aber nicht durch Phosphorylierung aktiviert. Allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Translokationsuntersuchungen an SMAD-Proteinen durchgeführt. Somit kann nur vermutet werden, dass SMAD4 für die erhöhte Bindungsaktivität verantwortlich ist.

SMAD 8 zeigt eine nicht signifikante Abnahme seiner Genexpression. Die Genexpression von SMAD 5 ist nicht signifikant erhöht. Sun et al. (2005) konnten zeigen, dass ein Verlust von SMAD5 in Kardiomyozyten zu einem Anstieg des apoptotischen Zelluntergangs führte. Unsere Ergebnisse zeigen keine Verringerung der Genexpression von SMAD5 und keine Apoptose in TGiNOS-Herzen.

Für die Beurteilung der tatsächlichen Wirkung sind Betrachtungen auf Proteinebene, sowie, bei den phosphorylierbaren SMADs, deren Phosphorylierung ausschlaggebend. Die Proteinexpression von SMAD5 ist signifikant verringert. Die rezeptoraktivierten SMADs 1, 5 und 8 werden durch Phosphorylierung aktiviert. Auf Proteinebene zeigt sich eine nicht signifikante, geringgradige Abnahme der pSMADs 1, 5 und 8. Eine Beeinflussung der BMP/SMAD-Signaltransduktion ist damit nicht gegeben. Hata et al. (1998) zeigten, dass das inhibitorische SMAD-Protein SMAD6 zu einer Hemmung von SMAD1 führt. Da inhibitorische SMADs auf alle rezeptoraktivierten SMADs wirken können, könnte ihre Hochregulation auch erhöhte SMAD 1, 5 und 8 Werte kompensieren. Da die SMADs 1, 5 und 8 unverändert sind, gilt die Hochregulation der inhibitorischen SMADs (SMAD6 und 7) der Kompensation von SMAD2/3/4. Es müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Bedeutung von SMAD 1/5/8 zeigen zu können.

5.7 NO, TGF- β und Kontraktilität

Das Zytokin TGF- β führte in Versuchen von Schlüter et al. (2004), in einer Konzentration von 10ng/ml eingesetzt, in Myokardzellen der Ratte zu einer Verminderung der basalen Kontraktionsfähigkeit. Dies wurde auf eine Relaxationsstörung zurückgeführt, ging allerdings mit einer unveränderten β -adrenergen Ansprechbarkeit einher. Die hier vorgestellten Expressionsuntersuchungen zeigen eine Abnahme der kardialen TGF- β -Spiegel unter dem endogen erhöhten kardialen NO-Spiegel der TGiNOS-Herzen. Eine deutlich verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit wurde mittels Isoprenalin-Stimulation gezeigt. Um zu klären, wie sich das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter dem Einfluss zusätzlicher TGF- β_1 -Gaben verhält, wurden weitere Kontraktionsversuche an vereinzelt, adulten Kardiomyozyten vorgenommen.

Diese Versuche zeigten die hemmende Wirkung von TGF- β_1 -Gaben auf die Kontraktilität der TGiNOS-Kardiomyozyten.

Mufti et al. (2008) zeigten eine signifikante Verringerung der relativen Zellverkürzung in Versuchen an Kardiomyozyten der Ratte nach Inkubation mit 10ng/ml TGF- β_1 . Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an Wildtyp Kardiomyozyten der Maus zeigen nach Gabe von 1ng/ml TGF- β_1 keine signifikante Abnahme der ermittelten Kontraktionsparameter: der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, sowie der relativen Zellverkürzung. Erst nach einer Inkubation mit 3ng/ml TGF- β_1 zeigten sich eine signifikante Abnahme der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit, sowie der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Diese Abnahme ist sowohl bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz, wie auch von 2Hz messbar. In iNOS-Kardiomyozyten zeigt sich bereits nach Inkubation mit 1ng/ml TGF- β_1 eine vergleichbare Abnahme der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit und maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, wie sie bei den WT-Kardiomyozyten erst bei der dreifachen Konzentration an TGF- β_1 auftritt. Der Unterschied zwischen den beiden Stimulationsfrequenzen (1Hz und 2Hz) ist auch hier nur marginal. Bei einer Gabe von 3ng/ml TGF- β_1 kommt es bei den TGiNOS Kardiomyozyten zu einem vollständigen Verlust der Kontraktionsfähigkeit. Damit deckt sich dieses Erkenntnis indirekt mit den Untersuchungen von Mufti et al. (2004), in denen beschrieben wird, dass erhöhte TGF- β -Spiegel zu einer Abnahme der myokardialen Relaxationsgeschwindigkeit führen. Die vorliegende Arbeit lässt nun auch den Umkehrschluss zu, nämlich, dass ein verringerter TGF- β -Spiegel eine Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit bedingt.

Insgesamt zeigt sich eine sehr stark eingeschränkte Toleranz der TGiNOS-Kardiomyozyten gegenüber eines erhöhten TGF- β -Spiegel. Dies kann in der Weise gewertet werden, dass die für den Umgang mit dem erhöhten kardialen NO-Spiegel erfolgte Kompensation der TGF- β -Wirkung erschöpft ist. Somit können die TGiNOS-Herzen keine weitere Erhöhung des TGF- β -Spiegels mehr kompensieren.

5.8 NO, TGF- β und Apoptose

Die TGiNOS-Kardiomyozyten weisen unter basalen Bedingungen keine mit Apoptose assoziierten Veränderungen auf. Unsere Messungen zeigten keine erhöhte Bindungsaktivität von Kernextrakten zu AP-1 in TGiNOS-Herzen. Damit fehlt in den TGiNOS-Herzen ein für die NO/TGF- β -vermittelte Apoptose notwendiger Faktor. Taimor et al. (2001) zeigten, dass die Gabe des NO-Donor SNAP bei isolierten Kardiomyozyten der Ratte zu einer erhöhten Bindungsaktivität von AP-1 führen, Apoptose in adulten Kardiomyozyten der Ratte auslöst. In den TGiNOS-Herzen können die erhöhten NO-Spiegel durch das Ausbleiben der AP-1-Aktivierung nicht zur Apoptoseinduktion führen. Dies zeigt, dass die fehlende AP-1-Aktivierung ein weiterer, wesentlicher Kompensationsmechanismus der TGiNOS-Herzen gegen die schädigenden Folgen der erhöhten iNOS-Aktivität zu sein scheint. Childs et al. zeigten 2002 eine adaptive Verringerung der Bax/Bcl2-Ratio unter oxidativem Stress. Chae et al. (2004) zeigten, in glatten Gefäßmuskelzellen, dass die NO-induzierte Apoptose zu einem Anstieg der Bax/Bcl-2-Ratio durch eine gesteigerte Gen-Expression führt. In der Folge kommt es zu einer mitochondrialen Cytochrome c Freisetzung ins Zytosol, die über eine Aktivierung der Caspase-3 zur Apoptose führt. Die hier vorliegenden Genexpressionsanalysen der Apoptosemarker Bcl-2 und Bax zeigen eine nicht signifikante Verschiebung zugunsten des anti-apoptotischen Bcl-2. Die Bax/Bcl-2-Ratio nimmt ab. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich dieser Trend auch auf Proteinebene fortsetzt. Hier ist ebenfalls eine nicht signifikante Verschiebung des Bax/Bcl2-Verhältnisses hin zum anti-apoptotischen Bcl-2 nachweisbar. Aufgrund der verringerten TGF- β -Spiegel in den TGiNOS-Herzen, sind die Voraussetzungen für eine Apoptoseinduktion in TGiNOS-Herzen nicht gegeben. Die TGiNOS-Herzen zeigen keinen Anstieg der, aufgrund der erhöhten NO-Spiegel zu erwartenden Apoptose. Allerdings findet sich auf Ebene der Apoptose eine fehlende Toleranz der TGiNOS-Kardiomyozyten gegenüber zusätzlichen TGF- β_1 -Gaben, ähnlich wie sie bereits in den Kontraktionsversuchen gezeigt wurde. Die TGiNOS-Kardiomyozyten zeigen nach 6-stündiger Inkubation mit 3 ng/ml TGF- β_1 einen signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelluntergangs um etwa 75%. Die Wildtyp-Kardiomyozyten zeigen lediglich einen Anstieg der Apoptose um etwa 7%.

Da durch eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β auch AP-1 aktiviert wird, weisen die TGiNOS-Kardiomyozyten in der Folge eine deutliche Zunahme der Apoptose auf. Auch ist das Bax/Bcl-2-Verhältnis verringert, ein Ausbleiben der Phosphorylierung der R-SMADs und eine Feedback-unabhängige I-SMAD-Aktivierung sind nachweisbar, was ebenfalls einen Kompensationsmechanismus vor Apoptoseinduktion darstellen könnte.

6. Conclusio und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen erstmals Funktionsuntersuchungen an isolierten Maus-Kardiomyozyten in einem Modell iNOS-überexprimierender Mäuse dar und zeigen die große Bedeutung der TGF- β -SMAD-Signalkaskade für die schädigende Wirkung stark erhöhter, kardialer NO-Spiegel.

Die fatalen funktionellen Folgen einer TGF- β -Applikation auf kultivierte Kardiomyozyten, das Ausbleiben der AP-1-Aktivierung, die verringerte Phosphorylierung der R-SMADs, sowie die Feedback-unabhängige Aktivierung der I-SMADs und das verringerte Bax/Bcl-2-Verhältnis zeigen deutlich, dass die TGiNOS-Kardiomyozyten über erfolgreiche Kompensationsmechanismen gegen die erhöhte iNOS-Aktivität verfügen. Insgesamt kann aus dem Kontext der fatalen Wirkung zusätzlicher TGF- β -Gaben der Schluss gezogen werden, dass die Tiere neben den genannten Kompensationsmechanismen vor allem durch den stark verringerten kardialen TGF- β -Spiegel ihre Herzfunktion sicherstellen können. In der verringerten TGF- β -Expression ist damit der wohl bedeutsamste Schutz der TGiNOS-Kardiomyozyten zu sehen.

Die Bedeutung erhöhter, kardialer NO-Spiegel, insbesondere als Folge erhöhter iNOS-Aktivität, für die Progredienz der Herzinsuffizienz wird kontrovers diskutiert. Mit den in dieser Forschungsarbeit vorgestellten Ergebnissen stehen wir am Anfang, die funktionellen Folgen für Kardiomyozyten auf Zellebene zu verstehen. Reinartz et al. (2011) äußern die Vermutung eines veränderten Ca²⁺-Handlings in TGiNOS-Herzen. Mit einem veränderten Ca²⁺-Handling könnte, in Anbetracht der hier vorgestellten Ergebnisse einer unveränderten Expression der β 2-Adrenozeptoren, die verringerte β -adrenerge Ansprechbarkeit erklärt werden. Für die myokardiale Relaxationsgeschwindigkeit spielen v.a. die SERCA 2A, sowie

Phospholamban eine wichtige Rolle. Unter niedriger intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration überwiegt der Einfluss der SERCA 2A. Phospholamban stellt dabei das Bindeglied zur β -adrenergen Einflussnahme des Ca^{2+} -Haushalts dar. Die SERCA 2A hemmende Wirkung von Phospholamban wird durch β -adrenerge Stimulation aufgehoben, was einen positiv lusitropen, also die Relaxationsgeschwindigkeit steigernden Einfluss zur Folge hat. Eine Abnahme der SERCA 2A könnte als ein Mechanismus für eine verringerte Inotropie gesehen werden.

Die von Jung et al. (2005) beschriebene Beziehung zwischen der iNOS und dem Arginase-Stoffwechselweg, mit einer möglicherweise modulierenden Funktion der Arginase für die iNOS-Aktivität, ließ weitere Untersuchungen zur Bedeutung der Substratverfügbarkeit von L-Arginin unter Berücksichtigung der konzentrationsabhängigen Inotropie-Wirkung des NO sinnvoll erscheinen. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen, aufgrund der negativ lusitropen Wirkung zusätzlicher L-Arginin-Gaben, den Schluss zu, dass in TGiNOS-Kardiomyozyten zusätzliches L-Arginin durch die iNOS zu NO verstoffwechselt wird. In weitergehenden Untersuchungen könnten die hier vorgestellten Kontraktionsversuche mit ansteigenden L-Argininkonzentrationen durchgeführt werden, um eine mögliche Dosisabhängigkeit zu prüfen. Ziel sollte die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve für L-Arginin in TGiNOS-Kardiomyozyten sein.

Die klinische Studie von Schulman et al. (2006) zeigte die fatalen Folgen einer L-Arginin-Medikation im Langzeit Postinfarkt-Geschehen. Die erhöhte Mortalität der Probanden kann auf eine schädigende Wirkung aufgrund der erhöhten Substratverfügbarkeit für die iNOS und der damit erhöhten NO-Produktion erklärt werden. Versuche zur Regulation der iNOS-Aktivität könnten weitere Hinweise auf mögliche Wege zur klinisch anwendbaren Regulation der iNOS liefern, mit dem Ziel die schädigenden Einflüsse iNOS-abhängigen NOs abwenden zu können.

Der möglicherweise bestehende Einfluss der SMAD-Signalkaskade, für den TGF- β -vermittelten, apoptotischen Zelluntergang, legt nahe, eine Beeinflussung der SMAD-Proteine auf ihre therapeutische Relevanz hin zu überprüfen. Ein gezieltes Eingreifen in die SMAD-Signalkaskade, mit der Folge verringerter Apoptose von Kardiomyozyten, könnte die Prognose von Patienten mit Herzinsuffizienz entscheidend verbessern. Unsere Ergebnisse legen nahe, dabei insbesondere Wege

einer Feedback-unabhängigen I-SMAD-Aktivierung zu untersuchen. Untersuchungen von Ulloa et al. (1999) zeigen, dass $\text{INF-}\gamma$ u.a. die Expression von SMAD 7 induziert, dessen selektive Regulation möglicherweise von therapeutischem Interesse sein könnte. Wicks et al. (2000) zeigten, dass bis dato nicht nachgewiesene Cross-Talk-Mechanismen zwischen Ca^{2+} -abhängigen Kinasen und SMAD-Proteinen ohne Beteiligung von TGF- β bestehen. In den TGiNOS-Mäusen ist der kardiale TGF- β -Spiegel verringert. Cross-Talk-Mechanismen zwischen Ca^{2+} -abhängigen Kinasen und SMAD-Proteinen könnten den Mechanismus einer Feedback-unabhängigen I-SMAD-Aktivierung erklären. Die von Wicks et al. gezeigte, direkte Phosphorylierung der SMAD-Proteine u.a. von SMAD2, welches nachweislich das TGF- β -vermittelte Apoptose-Signal übermittelt, legt die Untersuchungen von Proteinen mit Kinaseaktivität nahe. Die Kenntnis über die Rolle bestehender Cross-Talk-Mechanismen könnte eine genauere Charakterisierung der Herzinsuffizienz ermöglichen. Vielleicht könnten auch daraus Erkenntnisse für eine therapeutische Beeinflussung der TGF- β /SMAD-Signalkaskade resultieren und eine medikamentöse Regulation von SMAD-Proteinen ermöglichen.

Des Weiteren bleibt zu untersuchen, wie es in den TGiNOS-Herzen zur Abnahme des TGF- β -Spiegels gekommen ist. Vor allem $\text{INF-}\gamma$ sollte auf seinen Einfluss in TGiNOS-Herzen analysiert werden.

Wünschenswert wären auch in vivo Daten zur körperlichen Leistungsfähigkeit der TGiNOS-Mäuse. Dazu könnten vergleichende Untersuchungen unter physiologischer Belastungen im Laufradtraining erfolgen. Die trainierten Tiere sollten dann auf Unterschiede in der physiologisch adaptiven Herzhypertrophie untersucht werden. Ebenfalls sollten die hier vorgestellten Kontraktionsversuche auf Zellebene mit Kardiomyozyten trainierter Tiere durchgeführt werden. Diese könnten einen klinischen Kontext zu den hier dargestellten in-vitro Analysen liefern.

7. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Modells transgener, herzspezifisch überexprimierender iNOS-Mäuse, die Auswirkungen einer hohen iNOS-Aktivität auf die Expression von u.a. Apoptosemarkern, Hypertrophiemarkern, Kalzium-Handling-Proteinen, TGF- β und SMAD-Proteinen analysiert. Zudem wurde erstmals die Wirkung iNOS-abhängigen NOs auf die Kontraktilität vereinzelter, isolierter Kardiomyozyten untersucht. Die TGiNOS-Herzen zeigten, trotz einer 1600-fach gesteigerten *iNOS*-Genexpression, keine Anzeichen erhöhter Hypertrophie oder Apoptose. TGF- β , welches beim Übergang von einer angepassten Hypertrophie zur Apoptose stark exprimiert wird, wurde in den TGiNOS-Herzen verringert exprimiert. Die TGF β -Target-Gene DAPK-1, welches Apoptose induziert, sowie Collagen-1, welches Fibrose induziert, wurden unverändert exprimiert. Tendenziell verringert ist die sog. Bax/Bcl2-Ratio, was auf ein anti-apoptotisches Milieu in TGiNOS-Herzen hinweist. Einzig das TGF- β -Target-Gen SMAD7, ein allerdings inhibitorisch wirkendes SMAD-Protein, wurde TGF- β -unabhängig stark erhöht exprimiert. Neben dieser kompensatorischen Veränderung innerhalb der SMAD-Signalkaskade, war bei einer nachweislich erhöhten SMAD-Bindungsaktivität, eine verringerte Aktivität der R-SMADs 2 und 3 und des Co-SMADs 4 darstellbar. Die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, der für die Ausbildung NO-/TGF- β -abhängiger Apoptose in TGiNOS-Herzen notwendig ist, ist nicht erhöht.

Die TGiNOS-Kardiomyozyten zeigten eine basal erhöhte Kontraktilität, was auf die positiv inotrope NO-Wirkung zurückzuführen ist. Zusätzliche L-Arginin-Gaben führten in den TGiNOS-Kardiomyozyten zu einer Reduktion der Kontraktilität, die jedoch signifikant besser war als bei den Wildtyp-Kardiomyozyten. Eigeneffekte des L-Arginin ließen sich durch vergleichende Messungen an WT-Kardiomyozyten ausschließen. Die basal erhöhte Kontraktilität ließ sich unter β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin-Gabe bei den TGiNOS-Kardiomyozyten kaum steigern, übertraf aber dennoch die Kontraktionsparameter der WT-Kardiomyozyten unter adrenerger Stimulation. Die verringerte β -adrenerge Stimulierbarkeit konnte nicht auf Veränderungen der β -Rezeptoren zurückgeführt werden. Diese wurde unverändert exprimiert. Die signifikant verringerte

Expression der SERCA 2A, bei unveränderter Phospholamban-Expression, scheint ein Kompensationsmechanismus gegen die positiv inotrope NO-Wirkung zu sein.

Zusätzliche Gabe von TGF- β_1 führt in TGiNOS-Kardiomyozyten zu einer ausgeprägten Verringerung der Kontraktionsparameter. Gabe von 3ng/ml TGF- β führte zum vollständigen Verlust der Kontraktilität. Dies ist ein Indiz für die immense Bedeutung eines verringerten TGF- β -Spiegels bei gleichzeitig erhöhten iNOS-abhängigen NO-Leveln in iNOS-transgenen Kardiomyozyten.

8. Summary

In study at hand the iNOS-dependent effects on the synthesis of nitric oxide, the expression of markers for apoptosis and hypertrophy, calcium handling proteins, TGF- β and SMAD proteins were analyzed in a transgenic mouse model with cardiac specific overexpression of *iNOS*. The influence of iNOS dependent nitric oxide on the contractility in isolated cardiomyocytes was shown for the first time. The tg-iNOS hearts showed no evidence of increased apoptosis or hypertrophy, despite a 1600-fold increased iNOS RNA expression. The expression of TGF- β , which is expressed during the transition from hypertrophy to apoptosis, was decreased. The expression of TGF- β target genes like DAPK-1, which induces apoptosis, as well as collagen-1, which induces fibrosis were not altered. Bax/Bcl2 ratio was decreased, which indicates an antiapoptotic milieu. Expression of TGF- β target gene SMAD7, an inhibitory SMAD protein was highly increased through TGF- β independent mechanisms. In addition to this compensatory change within SMAD signalling cascade, a decreased activity of R-SMADs 2 and 3 was displayed. Also gene and protein levels of SMAD 4 was decreased. The binding activity of AP-1, which is known as an essential transcription factor for the induction of nitric oxide/TGF- β dependent apoptosis, was not increased in hearts of tg-iNOS mice.

tg-iNOS cardiomyocytes show increased basal contractility demonstrating positive inotropic effects. Additional doses of l-arginine resulted in a further decrease of contractility in transgenic cardiomyocytes, but was still higher than in wildtype cardiomyocytes. Intrinsic effects of l-arginine could be excluded by comparative measurements on wildtype cardiomyocytes. tg-iNOS cardiomyocytes did not respond to isoprenaline, but still exceeded the contractile parameters of wildtype cardiomyocytes under adrenergic stimulation. The reduced beta-adrenergic response could not be attributed to changes in the beta-receptors. The beta-receptor expression was unchanged. Phospholamban expression was unaltered, too. So, the significantly reduced expression of SERCA 2A seems to be a compensatory mechanism against the positive inotropic effect of nitric oxide.

Additional administration of TGF- β leads to a pronounced reduction of contraction parameters in transgenic cardiomyocytes. 3ng/ml TGF- β totally abolished

contractile responses of tg-iNOS cardiomyocytes. Thus, simultaneous presence of iNOS dependent nitric oxide and physiological levels of TGF- β leads to contractile failure of cardiomyocytes. This finding shows that reduced TGF- β -levels must be seen as an essential prerequisite for cardiomyocytes to survive under the presents of high iNOS dependent nitric oxide levels.

9. Literaturverzeichnis

A

Anwar, Schlüter, Heger, Piper, Euler; Pflugers Arch. 2008 Nov;457(2):485-91. Epub 2008 Jun 26.

Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation.

Arstall, Sawyer, Fukazawa, Kelly; Circ Res. 1999 Oct 29;85(9):829-40.

Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation

B

Balligand JL, Massion PB; The Journal of Physiology Vol. 546, Issue 1 pages 63–75, January 2003

Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice

Bascom, Wolfhohl, Coffey Jr., Madisen, Webb, Purchio, Derynck, Moses (1989) Mol. Cell. Biol. December 1989 vol. 9 no. 12 5508-5515

Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2.

Bundesärztekammer (BÄK), 2010; KBV, AWMF (Hrsg)

Nationale Versorgungsleitlinie Herzinsuffizienz

<http://www.herzinsuffizienz.versorgungsleitlinie.de/>

Bian, Murad; Front Biosci. 2003 Jan 1;8:d264-78.

Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases.

Bishopric, Andreka, Slepak, Webster; Curr Opin Pharmacol. 2001 Apr;1(2):141-50.

Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte.

Bolyut, O'Neill, Meredith; Circ Res 1994;75:23 – 32.

Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure: marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components.

Böcker, Denk, Heitz, Moch; Elsevier, München; Urban & Fischer 2008, ISBN-13:
9783437423826
Pathologie, 4., überarb. Aufl.

Böhm, 2000
Herzinsuffizienz / hersg. von Michael Böhm.
Mit Betrag von A. Bäumer... = Stuttgart ;
New York : Thieme 2000
(Referenz-Reihe-Kardiologie)

Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE.; Am J Physiol. 1993
Jul;265(1 Pt 2):H176-82.
Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction.

Brand, Schneider; J Mol Cell Cardiol 1995;27:5 – 18.
The TGF β superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and function.

C

Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC; J Gen Physiol. 1996 Oct;108(4):277-93. PMID:
8894977 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC2229328
*Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual
mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols.*

Champion, Georgakopoulos, Takimoto, Isoda, Wang, Kass, Circ Res. 2004 Mar
19;94(5):657-63. Epub 2004 Jan 29.
Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3.

Chae, Kim, Xu, Bailly-Maitre, Krajewska, Krajewski, Banares, Cui, Digicaylioglu, Ke,
Kitada, Monosov, Thomas, Kress, Babendure, Tsien, Lipton, Reed; Mol Cell. 2004 Aug
13;15(3):355-66.
BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress.

Chen Y, Traverse JH, Du R, Hou M, Bache RJ., Circulation. 2002 Jul 9;106(2):273-9.
PMID: 12105170
Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart.

Childs, Phaneuf, Dirks, Phillips and Leeuwenburgh, Cancer Res. 2002 62; 4592
*Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte
Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase
Activity, and Bcl-2:Bax Ratio*

Chomczynski , Sacchi., 1987 Apr;162(1):156-9., *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.*

Chowdhary S, Marsh AM, Coote JH, Townend JN.; Clin Sci (Lond). 2002 Apr;102(4):397-402.
Nitric oxide and cardiac parasympathetic control in human heart failure.

D

De la Bastie, Levitsky, Rappaport, Mercadier, Marotte, Wisnewsky, Brovkovich, Schwartz, Lompré *Circ Res.* 1990 Feb;66(2):554-64.
Pathophysiologie der chronischen Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat.

Dickhuth, Hipp, Niess, Röcker, Mayer, Horstmann; Jahrgang 52, Nr. 6 (2001)
DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN
Differential diagnosis of physiological cardiac hypertrophy in athletes

Dickstein, (2008), Weil, Schunkert (2006): *Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. In: Clin Res Cardiol. Suppl. 4. 95:1-17*

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM; J Exp Med. 1997 Feb 17;185(4):601-7.
Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases.

Drexler H, Kästner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G.; J Am Coll Cardiol. 1998 Oct;32(4):955-63. PMID: 9768717
Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart.

E

Eisenberg-Lerner, Kimchi; Cell Death Differ. 2007 Nov; *DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress.*, 14(11):1908-15. Epub 2007 Aug 17.,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703233>

Elfering, Sarkela, Giulivi; October 11, 2002 *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 38079-38086
Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase

Elliott and Blobe (2005); *J Clin Oncol.* 23: 2078-93.
Role of transforming growth factor Beta in human cancer.

Ellis, Yuan, Horvitz; (1991) *Annu Rev Cell Biol.*;7:663-98.
Mechanisms and functions of cell death.

ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008†

Dickstein, Cohen-Solal, Filippatos, McMurray, Ponikowski, Poole-Wilson, Stromberg, van Veldhuisen, Atar, Hoes, Keren, Mebazaa, Nieminen, Priori, Swedberg
European Heart Journal (2008) 29, 2388–2442 doi:10.1093/eurheartj/ehn309
The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)

Ertl, Gaudron, Hu; *Basic Res Cardiol.* 1993;88 Suppl 1:125-37. Review.
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies.

Euler-Taimor , Heger; *Cardiovascular Research* 69 (2006) 15 – 25 Review
The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system

F

Feng, Lu, Jones, Shen, Arnold.
Circulation. 2001 Aug 7;104(6):700-4. PMID: 11489778
Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice.

Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R.
Circ Res. 2000 Aug 4;87(3):241-7. PMID: 10926876
Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure.

Finkel, Oddis, Jacob, Watkins, Hattler, Simmons; *Science* 17 July 1992: Vol. 257 no. 5068 pp. 387-389
DOI: 10.1126/science.1631560
Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide

Fleming, Busse; J Mol Cell Cardiol. 1999 Jan;31(1):5-14.
NO: the primary EDRF.

Fleming, Fisslthaler, Dimmeler, Kemp, Busse
Circ Res. 2001 Jun 8;88(11):E68-75. PMID: 11397791
Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity.

Flesch, Schiffer, Zolk, Pinto, Rosenkranz, Hirth-Dietrich, Arnold, Paul, Böhm
Hypertension. 1997 Sep;30(3 Pt 1):383-91. PMID: 9314421
Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy.

Flögel, Merx, Godecke, Decking, Schrader.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 16;98(2):735-40. Epub 2001 Jan 2.; PMID: 11136228
Myoglobin: A scavenger of bioactive NO.

Forst; 2009 VVB Laufersweiler ISBN: 3835954911, 9783835954915
TGF-beta1 induzierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine im Tiermodell transgener eNOS+/- Mäuse

Frantz, Fraccarollo, Wagner, Behr, Jung, Angermann,
Cardiovasc Res 2003; 57:749 – 56.
Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure.

Fukuchi, Hussain, Giaid
Circulation. 1998;98:132-139 doi: 10.1161/01.CIR.98.2.132 (Circulation. 1998;98:132-139.) *Heterogeneous Expression and Activity of Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases in End-Stage Human Heart Failure Their Relation to Lesion Site and β -Adrenergic Receptor Therapy*

Funaba, Zimmerman and Mathews, 2002 The Journal of Biological Chemistry, 277, 41361-41368.
Modulation of Smad2-mediated Signaling by Extracellular Signal-regulated Kinase

Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A.; Circ Res. 2002 May 17;90(9):959-65. PMID: 12016261
Disruption of inducible nitric oxide synthase improves beta-adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy.

G

Gealekman, Abassi, Rubinstein, Winaver, Binah.
Circulation. 2002 Jan 15;105(2):236-43. PMID: 11790707
Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure.

Gebicke-Haerter, Van Calker, Nörenberg, Illes.
Neurochem Int. 1996 Jul;29(1):1-12. PMID: 8808784
Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases.

Gerbershagen, Hans-Peter
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten, 2005
Kardiale α -1-Adrenozeptor-Veränderungen im Monocrotalin- Ratten-Modell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz

Ghafourifar, Richter; FEBS Lett. 1997; 418: 291-296.
Nitric oxide synthase activity in mitochondria.

Giulivi, Poderoso, Boveris; J Biol Chem. 1998; 273: 11038-11043.
Production of nitric oxide by mitochondria.

Goldberg, MacNaughton, Clements, Minnear, Vincent; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Jan;282(1):L146-54.
p38 MAPK activation by TGF-beta1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability.

Gödecke, Molojavyi, Heger, Flögel, Ding, Jacoby, Schrader; J Biol Chem. 2003 Jun 13;278(24):21761-6. Epub 2003 Mar 28.
Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress.

Cheng, Grande
Exp. Biol. Med. 2002; 227: 943-956.
Transforming growth factor- β signal transduction and progressive renal disease.

Grande J.P
Exp. Biol. Med. 1997; 214: 27-40.

Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair.

Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U; *Circulation*. 2000 Nov 28;102(22):2758-64. PMID: 11094044 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production.

Gupta, Clarkson, Duggan and Brady; *Kidney International*, Vol. 58 (2000), pp. 1389–1399 PERSPECTIVES IN BASIC SCIENCE

Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis

H

Hakim, Sugimori, Camporesi and Anderson. In: *Physiol. Meas.* (1996) 17 267
Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin

Hao, Wang, Jones, Jassal, Dixon; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H3020 – 30.

Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro.

Hariharan, Pillai, (2008), *Jun*;71(4):1853-62.

Structure-function relationship of inhibitory Smads: Structural flexibility contributes to functional divergence

Hata, Lagna, Massagué, Hemmati-Brivanlou; 1998 Jan 15;12(2):186-97.

Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. PMID: 9436979

Hayashi, Imamura, Miyazono; 2005 Oct;63 Suppl 10:399-403.

BMP receptors and signal transduction

Haywood, Tsao, von der Leyen, Mann, Keeling, Trindade, Lewis, Byrne, Rickenbacher, Bishopric, Cooke, McKenna, Fowler.

Circulation. 1996 Mar 15;93(6):1087-94. PMID: 8653828

Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure.

Heger, Gödecke, Flögel, Merx, Molojavyi, Kühn-Velten, Schrader; *Circ Res.* 2002 Jan 11;90(1):93-9.

Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction.

Heger, Warga, Meyering, Abdallah, Schlüter, Piper, Euler; *J. Cell. Physiol.* 9999: 1–9, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

TGF β Receptor 1 Activation Enhances Cardiac Apoptosis Via SMAD Activation and Concomitant NO Release

Heger, Peters, Piper, Euler; *J Cell Physiol.* 2009 Aug;220(2):515-23. PMID: 19415695
SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes.

Heldin, Miyazono, Dijke; (1997) *Nature* 390:465–471.

TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.

Heldin; *J Cell Sci* 2001;114:4359 – 69.

Smad regulation in TGF- β signal transduction

Heineke, Molkentin; 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (8):589-600. PMID 16936699

Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways

Henning , 2009, *TGF- β induzierte Expression extrazellulärer Matrixproteine durch Herzmuskelzellen der adulten Ratte*, [http://geb.uni-](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/7319/pdf/HenningKirsten_2009_11_27.pdf)

[giessen.de/geb/volltexte/2009/7319/pdf/HenningKirsten_2009_11_27.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/7319/pdf/HenningKirsten_2009_11_27.pdf)

Henry, Lepoivre, Drapier, Ducrocq, Boucher, Guissani.

FASEB J. 1993 Sep;7(12):1124-34. PMID: 8397130

EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles.

Herpin A, Lelong C, Favrel P.; *Dev Comp Immunol.* 2004 May 3;28(5):461-85.

Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS.; *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Feb;6(2):150-66.

PMID: 15688001 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Protein S-nitrosylation: purview and parameters.

Heymes, Vanderheyden, Bronzwaer, Shah, Paulus.
Circulation. 1999 Jun 15;99(23):3009-16. PMID: 10368118
Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy.

Houser, Steven R., Circulation Research. 2010; 106: 1672-1674 doi: 10.1161/
CIRCRESAHA.110.221853
Does Protein Kinase A–Mediated Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor Play Any Role in Adrenergic Regulation of Calcium Handling in Health and Disease?

Hoyle; J. Ant. (1996) 188, pp, 633-644
Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves

Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E; Circ Res. 1997 Nov;81(5):742-52.
PMID: 9351448
Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors.

Hunt, Dr Margaret; <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
University of South Carolina School of Medicine
„Microbiology and Immunology On-line“

Huntgeburth, Tiemann, Shahverdyan, Schlüter, Schreckenberger, Gross, Mödersheim, Caglayan, Müller-Ehmsen, Ghanem, Vantler, Zimmermann, Böhm, Rosenkranz; PLoS One. 2011;6(11):e26628. Epub 2011 Nov 17.
Transforming growth factor β oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to β -adrenergic stimulation in the heart.

Huntgeburth, Tiemann, Shahverdyan, Schlüter, Gross, Caglayan, Ghanem, Vantler, Zimmermann, Böhm, Rosenkranz; Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009
P146 - *Die Regulation von Uncoupling Proteinen durch Transforming Growth-Factor β 1 beeinflusst den mitochondrialen Energiemetabolismus und die kardiale Funktion*

I

Imamura, Takase, Nishihara, Oeda, Hanai, Kawabata, Miyazono; Nature. 1997 Oct 9;389(6651):622-6.
Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.

Itoh, Itoh, Goumans, Dijke; Eur. J. Biochem. 267 (2000) 6954-6967
Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.

J

Jackson, Gibbs, Davies, Lip ; BMJ. 2000 January 15; 320(7228): 167–170.

PMCID: PMC1128747

ABC of heart failure

Pathophysiology

Jahns, Boivin, Lohse

Trends Cardiovasc. Med.. 16, Nr. 1, Januar 2006, S. 20–24.

β₁-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy.

Jessa, Jones and Kern, (2000) *Functional mapping of the MHI DNA-binding domain of DPC4/SMAD4*, Nucl. Acids Res. (2000) 28 (12): 2363-2368.

doi: 10.1093/nar/28.12.2363, Oxford JournalsLife Sciences Nucleic Acids Research

Volume28, Issue12Pp. 2363-2368

Jessup, Brozena; N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):2007-18.

Heart failure

Jiang, Lokuta, Farrell, Wolff, Haworth, Valdivia, Circ Res. 2002 Nov 29;91(11):1015-22.

Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure.

Joe, Schussheim, Longrois, Mäki, Kelly, Smith, Balligand; J Mol Cell Cardiol. 1998 Feb;30(2):303-15.

Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide.

Jones, Greer, Ware, Yang, Walsh, Lefer.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jan;288(1):H365-70. Epub 2004 Aug 19. PMID: 15319210

Deficiency of iNOS does not attenuate severe congestive heart failure in mice.

Jung, Kubo, Wilson, Houser, Margulies

Am J Physiol Heart Circ Physiol 290:H1756-H1762, 2006. First published 3 December 2005; doi:10.1152/ajpheart.01104.2005

Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline

myocardium

K

Kamenzin, S ; 2000 urn:nbn:de:bsz:25-opus-607

Kontraktilität des isolierten menschlichen Kardiomyozyten. Einfluß von Calcium, Isoproterenol, Stimulationsfrequenz, Stimulationspause und Thapsigargin.

Keira, Tatsumi, Matoba, Shiraishi, Yamanaka, Akashi, Kobara, Asayama, Fushiki, Fliss, Nakagawa; J Mol Cell Cardiol. 2002 May;34(5):583-96.

Lethal effect of cytokine-induced nitric oxide and peroxynitrite on cultured rat cardiac myocytes.

Kerr, Wyllie, Currie; (1972) Br J Cancer. (4):239-57.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Kim, Yoshiyama, Izumi; Circulation 2001;103:148 – 54.

Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure.

Kaye et al., Circ Res. 1996 Feb;78(2):217-24.

PMID: 8575064 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes.

Kimura and Ogihara

THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

Vol. 291, No. 1999 JPET 291:171–180, 1999

Stimulation by Transforming Growth Factor- β of DNA Synthesis and Proliferation of Adult Rat Hepatocytes in Primary Cultures: Modulation by - and -Adrenoceptor Agonists

Kinugawa, Kohmoto, Yao, Serizawa, Takahashi; Am J Physiol. 1997 Jan;272(1 Pt 2):H35-47.

Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes.

Kleinert, Schwarz, Förstermann

Biol Chem. 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64. PMID: 14669979

Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.

Konzett; Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1940; 197: 27-40
Neue broncholytisch hochwirksame Körper der Adrenalinreihe.

Kojda, Kottenberg, Stasch, Schrör, Noack; Br J Pharmacol. 1997 Nov;122(5):813-20.
Positive inotropic effect of exogenous and endogenous NO in hypertrophic rat hearts.

König, Kögel, Rami, Prehn; J Cell Biol. 2005 Mar 28;168(7):1077-86. Epub 2005 Mar 21.
A novel TGF-beta-induced pathway: ALK1 activates the neuroprotective transcription factor NF-kappaB

Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE; Am J Physiol. 1999 Jan;276(1 Pt 2):R265-76.
Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility.

L

Langenickel, Pagel, Höhnel, Dietz, Willenbrock; Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 May;278(5):H1500-6.
Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure.

Levy, Kenchaiah, Larson, Benjamin, Kupka, Ho, Murabito, Vasan
N Engl J Med. 2002 Oct 31;347(18):1397-402.
Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.

Lijnen, Petrov, Fagard; (2000) Mol Genet Metab. 71 418-35.
Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).

Lim, Zhu; Cell Mol Life Sci. 2006 Nov;63(22):2584-96.
Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure.

Liu, Carretero, Cingolani, Liao, Sun, Xu, Li, Pagano, Yang, Yang.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Dec;289(6):H2616-23. Epub 2005 Jul 29.
PMID: 16055518
Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction.

Liu, Hausladen, Zeng, Que, Heitman, Stamle; Nature 410, 490-494 (22 March 2001) | doi:10.1038/35068596; Received 7 December 2000; Accepted 5 January 2001
A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans

Liu, Yan, Zeng, Zhang, Hanes, Ahearn, McMahon, Dickfeld, Marshall, Que, Stamler.; Cell. 2004 Feb 20;116(4):617-28. PMID: 14980227
Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock.

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T; Circ Res. 2003 Nov 14;93(10):896-906.
What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?

Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, Haworth RA. Circulation. 2005 Mar 1;111(8):988-95. Epub 2005 Feb 14. PMID: 15710754
Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure.

Luo, Grupp, Harrer, Ponniah, Grupp; Circulation Research. 1994;75:401-409
Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation

Luss, Li, Shapiro, Tzeng, McGowan, Yoneyama, Hatakeyama, Geller, Mickle, Simmons, Billiar
J Mol Cell Cardiol. 1997 Apr;29(4):1153-65. PMID: 9160867
Dedifferentiated human ventricular cardiac myocytes express inducible nitric oxide synthase mRNA but not protein in response to IL-1, TNF, IFNgamma, and LPS.

Lowry, Rosebrough, Farr, Randall; (1951) J. Biol. Chem. 193:265-275.
Protein measurement with the Folin reagent.

M

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS ;Science 23 April 1999: Vol. 284 no. 5414 pp. 651-654
DOI: 10.1126/science.284.5414.651
Fas-Induced Caspase Denitrosylation

Mannick JB, Schonhoff CM; (2002) 6Physiology and Molecular Biology of Plants (2008)
Volume: 14, Issue: 1-2, Pages: 119-130 ISSN: 09715894 DOI: 10.1007/s12298-008-0011-5
Nitrosylation: the next phosphorylation?

Martínez-Ruiz, Lamas. ; *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):43-52.
S-nitrosylation- a potential new paradigm in signal transduction

Massague J (1998); *Annu Rev Biochem.* 67: 753-791.
TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL; *Circ Res.* 2003 Sep 5;93(5):388-98.
Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing.

Mercadier, Lompré, Duc, Boheler, Fraysse, Wisnewsky, Allen, Komajda, Schwartz; *J Clin Invest.* 1990 Jan;85(1):305-9. PMID: 2136864
Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure.

Michel, Feron; *J Clin Invest.* 1997 Nov 1;100(9):2146-52.
Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?

Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA; 2001 *Cardiovasc Res* 49-798–807
Peroxy-nitrite induced nitration and inactivation of myofibillar creatine kinase in experimental heart failure.

Minamisawa S.; *Clin Calcium.* 2001 Jun;11(6):763-6.
Genetic complementation studies using genetically engineered mice have revealed the impact of phospholamban on progression of cardiomyopathy

Moens, Champion, Claeys, Tavazzi, Kaminski, Wolin, Borgonjon, Van Nassauw, Haile, Zviman, Bedja, Wuyts, Elsaesser, Cos, Gabrielson, Lazzarino, Paolocci, Timmermans, Vrints, Kass.
Circulation. 2008 Apr 8;117(14):1810-9. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362233
High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury.

Mollnau, Wendt, Szöcs, Lassègue, Schulz, Oelze, Li, Bodenschatz, August, Kleschyov, Tsilimingas, Walter, Förstermann, Meinertz, Griendling, Münzel.
Circ Res. 2002 Mar 8;90(4):E58-65. PMID: 11884382
Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling.

Moriguchi, Matsubara, Mori; *Circ Res* 1999;84: 1073 – 84.
Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibro- nectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcrip- tional and posttranscriptional mechanisms.

Mount, Kemp, Power; *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Feb;42(2):271-9. Epub 2006 Jul 12.
 Review.
Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation.

Mufti, Wenzel, Euler, Piper, Schlüter; *J Cell Physiol.* 2008 Oct;217(1):242-9.
Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect.

Mullis, Faloona, Scharf, Saiki, Horn, Ehrlich; 1986,
 Cold Spring Harb. *Smyp. Quant. Biol.* 51, 263-273
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

Mungrue, Gros, You, Pirani, Azad, Csont, Schulz, Butany, Stewart, Husain; *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):735-43. PMID: 11901182
Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death.

Murad, *Can J Ophthalmol.* 2008 Jun;43(3):291-4.
Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling in the eye.

Müller-Strahl, Kottenberg, Zimmer, Noack, Kojda; *J Physiol.* 2000 Jan 15;522 Pt 2:311-20.
Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart.

N

Nakamura, Yoshiyama, Omura; *Cardio- vasc Res* 2003;57:48–54.
Beneficial effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin II type 1 receptor blocker on cardiac remodeling in rat myocardial infarction.

Nakao, Afrakhte, Morén, Nakayama, Christian, Heuchel, Itoh, Kawabata, Heldin, Heldin, Dijke, *Nature.* 1997 Oct 9;389(6651):631-5.
Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA.; (1996) *N Engl J Med.* 1996, 335(16), S.1182-9
Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.

Nathan C (1997), *J Clin Invest* 100-2417–2423
Inducible nitric oxide synthase- what difference does it make?

Nathan; *FASEB J.* 1992; 6: 3051-3064
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.

Nikitovic D, Holmgren A, Spyrou G; *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jan 6;242(1):109-12.
Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos.

Nosratola D. Vaziri, Zhenmin Ni, Fariba Oveisi, Kaihui Liang, Raj Pandian;
Hypertension 2002; 39: 135-141 doi: 10.1161/hy0102.100540
Enhanced Nitric Oxide Inactivation and Protein Nitration by Reactive Oxygen Species in Renal Insufficiency

Núñez; *Cardiovascular Research* 72 (2006) 80–89
Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism.

O

P

Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabó C.
Trends Pharmacol Sci. 2005 Jun;26(6):302-10. PMID: 15925705
Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure.

Park, Huh, Kim, Lee, Choi; October 2, 2000 (received for review August 23, 2000)
Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinase by means of s-nitrosylation

Park HS, Yu JW, Cho JH, Kim MS, Huh SH, Ryoo K, Choi EJ.; Received for publication, April 22, 2003, and in revised form, December 1, 2003 Published, *JBC Papers in Press*, December 9, 2003, DOI 10.1074/jbc.M304183200
Inhibition of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 by Nitric Oxide through a Thiol Redox Mechanism

Partsch, 2009; DISSERTATION, Universität Gießen
Einfluss einer adenoviralen Überexpression des SMAD Inhibitors YB-1 auf die Hypertrophie- und Apoptose-Entwicklung in isolierten adulten Herzmuskelzellen der Ratte

Pieper, Roza; Free Radic Biol Med. 2008 April 15; 44(8): 1536–1552.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.020.
The Complex Role of iNOS in Acutely-Rejecting Cardiac Transplants

Pierreux, Nicolás, Hill; Mol Cell Biol. 2000 Dec;20(23):9041-54.
Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus.

Pfaffl; 2001, Nucleic Acids Res; 29.(9)00.
New mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR.

Pfeffer, Braunwald; Circulation. 1990 Apr;81(4):1161-72. Review. PMID: 2138525
[PubMed - indexed for MEDLINE]
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.

R

Raju; Lancet. 2000 Jul 22;356(9226):346.
The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936).

Rao ; J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2000 Jan-Mar;3(1):27-58. PMID: 10711324
Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types.

Reinartz, Molojavyi, Moellendorf, Hohlfeld, Heger, Gödecke; 2011 Jun 30;25(1):11-21.
β-Adrenergic signaling and response to pressure overload in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of inducible NO synthase.

Remme, Swedberg ; Eur Heart J 2001;22:1527-60.
Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the ESC. Guidelines for the diagnosis and treatment of CHD.

Rickenbacher, *Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathologie*, Swiss Medical Forum Nr. 1/2 10. Januar 2001

Rosenkranz, 2004: *Cardiovasc. Res*, 2004; 63:423-432
TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling.

Ross, Kranias, Giles, Chien; 1999 Oct 29;99(3):313-22.
Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy.

S

Sam, Sawyer, Xie, Chang, Ngoy, Brenner, Siwik, Singh, Apstein, Colucci; *Circ Res*. 2001 Aug 17;89(4):351-6. PMID: 11509452
Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction.

Saran M, Bors W.
Radiat Res. 1997 Jan;147(1):70-7.
Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated: evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity.

Sarkar, Vallance, Amirmansour, Harding
Cardiovasc Res. 2000 Dec;48(3):430-9. PMID: 11090838
Positive inotropic effects of NO donors in isolated guinea-pig and human cardiomyocytes independent of NO species and cyclic nucleotides.

Saura et al.; *Circ Res*. 2005;97:1115-1123; originally published online October 20, 2005; doi: 10.1161/01.RES.0000191538.76771.66
Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling in Endothelial Cells

Schlüter, Zhou, Piper; *Am J Physiol* 1995;269:C1311 – 6.
Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF- β in adult rat cardiomyocytes

Schultz, Witt, Glascock; *J Clin Invest* 2002;109:787–96.
TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.

Schlüter, Frischkopf, Flesch, Rosenkranz, Taimor, Piper; *Cardiovasc Res*. 2000 Jan 14;45(2):410-7.

Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy.

Schmidt, Pollock, Nakane, Förstermann, Murad.
Cell Calcium. 1992 Jun-Jul;13(6-7):427-34. PMID: 1380405
Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases.

Schmierer, Tournier, Bates, Hill; Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 6;105(18):6608-13. Epub 2008 Apr 28.
Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system.

Schnee & Hsueh; Cardiovasc Res 2000;46:264–8.
Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis.

Schneiders, Heger, Best, Michael, Taimor; (2005). Cardiovasc. Res. 67, 87-96.
SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes.

Schneiders ; 2005 Laufersweiler Verlag, ISBN 978-3-89687-493-1
SMAD als Vermittler der Apoptose in ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte

Schröder, Heger, Piper, Euler; J Mol Med (Berl). 2006 Nov;84(11):975-83. Epub 2006 Aug 19.
Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat.

Schulman, Becker, Kass, Champion, Terrin, Forman, Ernst, Kelemen, Townsend, Capriotti, Hare, Gerstenblith; JAMA, January 4, 2006—Vol 295, No. 1
The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) Randomized Clinical Trial

Schunkert, Weil; Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005, ISBN-10 3-540-23-762-3
Springer Medizin Verlag Heidelberg
Rationelle Diagnostik und Therapie bei Herzinsuffizienz

Shi and Massague (2003); Cell. 113: 685-700.
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.

Shi, Massagué; Cell. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.; 1998, Mol Cell. 1998 Jun;1(7):949-57
Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization.

Statistisches Bundesamt 2008;
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.psml>

Stein, Frank, Schmitz, Scholz, Thoenes; J Mol Cell Cardiol. 1996 Aug;28(8):1631-9. PMID: 8877773 [PubMed - indexed for MEDLINE]
Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase.

Stein, Eschenhagen, Rüdiger, Scholz, Förstermann, Gath.
J Am Coll Cardiol. 1998 Nov;32(5):1179-86. PMID: 9809923
Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure.

Stuehr, Cho, Kwon, Weise and Nathan; In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991), pp. 7773–7777.
Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein (L-arginine/endothelium-derived relaxing factor/interferony)

Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E.
Circ Res. 2006 Feb 17;98(3):403-11. Epub 2006 Jan 5. PMID: 16397145
Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury.

Sun Y, Zhou J, Liao X, Lü Y, Deng C, Huang P, Chen Q, Yang X.; *Cell Res.* 306: 85-93. (2005)
Disruption of SMAD5 gene induces mitochondria-dependent apoptosis in cardiomyocytes.

Swanton E, Savory P, Cosulich S, Clarke P, Woodman P.; *Oncogene.* 1999 Mar 11;18(10):1781-7.
Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts.

Szabó C., *Toxicol Lett.* 2003 Apr 11;140-141:105-12. PMID: 12676456
Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity.

T

Taimor, Rakow, Piper; The FASEB Journal; Vol. 15 November 2001
Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes

Taimor-Euler, Heger; 2005 Cardiovascular Research 69 15 – 25
The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system

Taimor, Hofstaetter, Piper; Cardiovasc. Res. 2000; 45(3): 588-594.
Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia.

Takimoto, Champion, Li, Ren, Rodriguez, Tavazzi, Lazzarino, Paolocci, Gabrielson, Wang, Kass
 J Clin Invest. 2005 May;115(5):1221-31. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15841206
Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load.

Tanigawa, Jarcho, Kass, Solomon, Vosberg, Seidman, Seidman; (Oct 1990). Cell 62 (5): 991–8. DOI:10.1016/0092-8674(90)90273-H. PMID 2144212
A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: an alpha/beta cardiac myosin heavy chain hybrid gene.

Tatsumi, Matoba, Kawahara, Keira, Shiraishi, Akashi, Kobara, Tanaka, Katamura, Nakagawa, Ohta, Shirayama, Takeda, Asayama, Fliss, Nakagawa; J Am Coll Cardiol. 2000 Apr;35(5):1338-46.
Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes.

Turko, Murad, Pharmacol Rev. 2002 Dec;54(4):619-34. PMID: 12429871
Protein nitration in cardiovascular diseases.

U

Umar, van der Laarse; Mol Cell Biochem (2010) 333:191–201 DOI 10.1007/s11010-009-0219-x
Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart

Ulloa, Doody, Massagué; Nature. 1999 Feb 25;397(6721):710-3.
Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway.

V

Vandecasteele, Eschenhagen, Scholz, Stein, Verde, Fischmeister; *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):331-4.

Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.

Vejlstrup, Bouloumie, Boesgaard, Andersen, Nielsen-Kudsk, Mortensen, Kent, Harrison, Busse, Aldershvile; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 30, Issue 6, June 1998, Pages 1215–1223

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in the Human Heart: Expression and Localization in Congestive Heart Failure

W

Wahler, Dollinger; *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 1):C45-54.

Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase.

Wehrens, Lehnart, Reiken, Vest, Wronska, Marks

2005, special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected on May 3, 2005.doi: 10.1073/pnas.0510113103

Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression

Wei, et al.,1998 Mar;29(1):7-10. PMID: 10683970 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Relationship between the expression level of alpha-MHC gene and cardiac contractility during heart failure.

Wells, Strom, Turka; *Curr Opin Immunol.* 2000 Oct;12(5):522-7.

The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance.

Wenzel, (2001a), URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-4806, URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/480/>

Signal-transduction of the Angiotensin II-mediated increase of the TGF- β -expression in adult ventricular cardiomyocytes

Wenzel, Taimor, Piper, Schlüter; FASEB J 2001b;15:2291 – 3.
Redox-sensitive inter- mediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-h expression in adult ventricular cardiomyocytes.

Wicks; Mol. Cell. Biol. 2000, 20(21):8103. DOI: 10.1128/MCB.20.21.8103-8111.2000.
Inactivation of Smad-Transforming Growth Factor β Signaling by Ca²⁺ -Calmodulin-Dependent Protein Kinase II

Wood and Garthwaite; (1994). Neuropharmacology 33, 1235–1244.
Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties.

Wunderlich C, Flogel U, Godecke A, Heger J, Schrader J.; Circ Res. 2003; 92: 1352
Acute inhibition of myoglobin impairs contractility and energy state of iNOS-overexpressing hearts.

Wyllie, Kerr, Currie; 1980 Int. Rev. Cytol. 68, 251-306.X
Cell death: the significance of apoptosis.

Xie, Nathan; J Leukoc Biol. 1994 Nov;56(5):576-82.
The high-output nitric oxide pathway: role and regulation.

Xu, Jerry, Meissner, Stamler; Science 9 January 1998: Vol. 279 no. 5348 pp. 234-237
DOI: 10.1126/science.279.5348.234 REPORT
Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation

Y

Yamazaki, Komuro, Yazaki; Am J Cardiol 1999;83:H53–7.
Role of the renin – angiotensin system in cardiac hypertrophy.

Yang, Letterio, Lechleider, Chen, Hayman, Gu, Roberts, Deng; Embo. J. 18 (1999) 1280-1291
Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β .

Yokoyama, Vaca, Rossen, Durante, Hazarika, Mann; J Clin Invest 1993;92-2303–2012. [PubMed- 8227345]
Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor in the adult mammalian heart.

Yoneda, Kihara, Ohkusa, Iwanaga, Inagaki, Takeuchi, Hayashida, Ueyama, Hisamatsu, Fujita, Hatac, Matsuzaki, Sasayama; Life Sci. 2001 Nov 30;70(2):143-57. [PubMed- 8227345]
Calcium handling and sarcoplasmic-reticular protein functions during heart-failure transition in ventricular myocardium from rats with hypertension.

Z

Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y.
Circ Res. 2007 Apr 13;100(7):1089-98. Epub 2007 Mar 15. PMID: 17363700
Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure.

Zhao, Zhang, Xu, Li, Wang; 07/2009 MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY Volume 322, Numbers 1-2, 135-144, DOI: 10.1007/s11010-009-0183-5
Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts

Zou, Komuro, Yamazaki; Circ Res 1998;82:337 – 45.
Cell type-specific angiotensin II- evoked signal transduction pathways: critical roles of Ghg subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum Unterschrift

10. Danksagung

Ich danke ganz herzlich Frau PD. Dr. Jacqueline Heger und Frau Prof. Dr. Gerhild Euler für die gute Betreuung während meiner Forschungstätigkeit und der Anfertigung meiner Dissertation. Weiter bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, vor allem aber bei meiner Arbeitsgruppe. Ihr habt meine Doktorandenzeit in Gießen in jeder Hinsicht sehr bereichert.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5936-1



9 17 8 3 8 3 5 19 5 9 3 6 1