

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>5</u>
1.1	Pathomechanismen der Myokardhypertrophie.....	5
1.2	Zellkulturmodell zur Erforschung der Myokardhypertrophie.....	7
1.3	p38 MAPK-Phosphorylierung als pro-hypertropher Stimulus.....	7
1.3.1	Angiotensin II-Signalkaskade zur p38 MAPK-Phosphorylierung.....	8
1.3.2	NO-Radikale als Induktoren der p38 MAPK-Phosphorylierung.....	9
1.4	Biologische Wirkung von NO.....	11
1.4.1	Wirkung von NO auf das Herz-Kreislauf-System.....	11
1.4.2	Wirkung von NO auf kardiovaskulärer Ebene.....	11
1.5	Fragestellung.....	13
2	<u>MATERIAL</u>	<u>14</u>
2.1	Chemikalien.....	14
2.1.1	Antikörper.....	16
2.1.2	Primer.....	17
2.2	Geräte.....	17
2.2.1	Allgemein verwendete Geräte/Gebrauchsgegenstände.....	17
2.2.2	Spezielle Geräte/Gebrauchsgegenstände.....	17
2.2.2.1	Zellkultur.....	18
2.2.2.2	SDS-PAGE.....	18
2.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3	EDV.....	19
3	<u>METHODEN</u>	<u>20</u>
3.1	Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten	
	Rattenherzen.....	20
3.1.1	Versuchstiere.....	20
3.1.2	Präparation isolierter Kardiomyozyten der Ratte.....	20
3.1.3	Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte.....	22
3.1.3.1	Vorplattieren der Kulturschalen.....	22
3.1.3.2	Ausplattieren der Kardiomyozyten.....	23
3.1.3.3	Kurzzeitkultivierung von Kardiomyozyten.....	23
3.2	Isolierung von Kardiomyozyten aus adulten Mäuseherzen.....	24

3.2.1 Versuchstiere.....	24
3.2.2 Genotypisierung der Mäuse.....	24
3.2.2.1 DNA-Gewinnung.....	24
3.2.2.2 PCR-Analyse.....	25
3.2.2.3 Genotyp-Identifizierung.....	27
3.2.3 Präparation isolierter Kardiomyozyten der Maus.....	27
3.2.4 Zellkultur von Kardiomyozyten der Maus.....	28
3.2.4.1 Vorplattieren der Kulturschalen.....	28
3.2.4.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten.....	29
3.3 Präparation isolierter mikrovaskulärer Endothelzellen aus adulten Rattenherzen.....	29
3.3.1 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen.....	30
3.4 Zellinduktion.....	31
3.5 Zellernte.....	31
3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
3.6.1 Aufbau der Kammer und Durchführung der Gelelektrophorese.....	33
3.6.2 Western-Blot-Verfahren.....	34
3.6.3 Immunologischer Nachweis von p38 und p38-P MAP-Kinase.....	35
3.6.4 Immunologischer Nachweis von eNOS.....	37
3.6.5 Immunologischer Nachweis von TGF β ₁	38
3.6.6 Auswertung.....	38
3.7 Real-time PCR im iCycler®.....	39
3.7.1 Präparative RNA-Isolierung aus adulten Mäuseherzen.....	39
3.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	39
3.7.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	40
3.7.4 Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time PCR).....	41
3.7.4.1 Einführung in die Methode.....	41
3.7.4.2 Durchführung der Methode.....	44
3.7.4.2.1 Primerauswahl.....	44
3.7.4.2.2 Real-time PCR-Ansatz.....	45
3.7.4.2.3 PCR-Laufprogramme.....	45
3.7.4.2.4 Real-time PCR-Auswertung.....	47
3.8 TNFα-Bestimmung.....	47
3.8.1 TNF α -Bioassay.....	47

3.8.2	Proteinbestimmung.....	49
3.8.2.1	Probenvorbereitung.....	49
3.8.2.2	Bestimmung des Proteingehaltes (BRADFORD, 1976).....	49
3.9	Statistik.....	50
4	<u>ERGEBNISSE</u>	51
4.1	Nachweis der eNOS-Expression in Rattenkardiomyozyten.....	51
4.1.1	Einfluß der Hemmung der endogenen NO-Produktion auf die p38 MAPK der Ratte.....	52
4.1.2	Zeitabhängige Induktion mit L-NA in Kardiomyozyten der Ratte.....	52
4.1.3	Vergleich des Einflusses der Inhibition durch L-NA in Endothel- und Herzmuskelzellen der Ratte.....	53
4.2	Einfluß von hochdosiertem NO auf die p38 MAPK in adulten Herzmuskelzellen der Ratte.....	55
4.2.1	Einfluß von SNAP und Spermin-NONO.....	55
4.2.2	Interaktion mit Angiotensin II.....	56
4.3	Einfluß einer Aktivierung des cGMP-Signalweges auf die L-NA induzierte p38 MAPK-Phosphorylierung.....	57
4.4	Einfluß einer Hemmung der löslichen Guanylatzyklase auf die p38 MAPK-Aktivierung.....	58
4.5	Einfluß von L-NA auf die Zytokinbildung.....	59
4.5.1	TNF α -Freisetzung.....	59
4.5.2	TGF β -Expression in Kardiomyozyten der Ratte.....	60
4.6	Einfluß von eNOS-Defizienz auf die p38 MAPK Phosphorylierung in adulten Herzmuskelzellen der Maus.....	62
4.6.1	Basalphosphorylierung.....	62
4.6.2	Einfluß von L-NA auf die p38 MAPK-Aktivierung in Herzmuskelzellen der Maus mit und ohne eNOS-Defizienz.....	64
4.6.3	Zeitkinetik der p38-Phosphorylierung mittels L-NA in Kardiomyozyten der Maus.....	65
4.7	TGF β - und TNF α -Expression im Myokard von Mäusen mit und ohne genetischer eNOS-Defizienz.....	66

5	<u>DISKUSSION</u>	68
5.1	Einfluß von Radikalen auf die p38-Phosphorylierung.....	68
5.2	Rolle der endogenen NO-Synthese.....	69
5.2.1	Rolle von eNOS.....	69
5.2.2	Rolle von iNOS.....	70
5.3	Rolle von L-NA.....	70
5.4	Einfluß von hohen NO-Konzentrationen auf p38-Phosphorylierung.....	72
5.5	Rolle von cGMP auf p38-Phosphorylierung.....	72
5.6	Einfluß von p38 MAPK auf Zytokinexpression (TNF α , TGF β).....	74
5.6.1	Bedeutung der Zytokine für die Herzmuskelzelle.....	74
5.7	Studienergebnisse von Kardiomyozyten der Ratte im Kontext zu anderen Zellarten.....	75
5.8	Limitierung der Arbeit.....	76
5.9	Zukunftsausblick.....	77
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	78
7	<u>SUMMARY</u>	80
8	<u>LITERATUR</u>	82
9	<u>PUBLIKATIONEN BASIEREND AUF RESULTATE DIESER ARBEIT</u>	97
10	<u>DANKSAGUNG</u>	98