

**EINFLUß VON ENDOGENEM NO AUF DIE
PHOSPHORYLIERUNG DER p38 MAP-KINASE
IN ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN DER
ADULTEN RATTE UND MAUS**

SANDRA WINGERNING

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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 2008

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 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Herr Prof. Dr. M. Diener

und

dem Physiologischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Herr Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Einfluß von endogenem NO auf die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase in isolierten Kardiomyozyten der adulten Ratte und Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sandra Wingerning

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 17.10.2007

Für Oma †

*Lasse Deinen Gedanken Flügel wachsen und erlaube dem Wind,
sie emporzuheben wolkenwärts.*

(Gerd Bennen)

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Sandra Wingerning

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	TGFβ- und TNFα-Expression im Myokard von Mäusen mit und ohne genetischer eNOS-Defizienz.....	66

5	<u>DISKUSSION</u>	<u>68</u>
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>	<u>78</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>80</u>
8	<u>LITERATUR</u>	<u>82</u>
9	<u>PUBLIKATIONEN BASIEREND AUF RESULTATE DIESER ARBEIT</u>	<u>97</u>
10	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>98</u>

1. EINLEITUNG

1.1. Pathomechanismen der Myokardhypertrophie

Der Begriff Hypertrophie bezeichnet eine zelluläre Anpassungsleistung, die durch Volumenzunahme der Zellen und Vermehrung der funktionellen Substanz bei konstanter Zellzahl gekennzeichnet ist und durch eine Überbelastung des Gewebes verursacht wird. Der Zustand ist reversibel, nach Wegfall des Stimulus regeneriert sich das Gewebe zur Ausgangsform zurück. Der zugrunde liegende pathogenetische Mechanismus beruht auf einem funktionssteigernden Stimulus, der unter Vermittlung von Transkriptionsfaktoren und durch eine verstärkte Expression von Protoonkogenen die Initiation einer anabolen Stoffwechsellage hervorruft, welche mit verstärkter Proteinsynthese einhergeht. Darüber hinaus werden im Rahmen antikataboler Prozesse der Energieverbrauch und die intrazelluläre Proteolyse reduziert (RIEDE und SCHAEFER, 1999).

Die Hypertrophie des Herzens stellt als Adaptation an erhöhte Leistungsanforderungen ein sinnvolles physiologisches System dar. Dabei sind der Zunahme der funktionellen Substanz jedoch Grenzen gesetzt, nach deren Überschreiten Hypertrophie Krankheitswert gewinnt. Beim Menschen ist bei ca. 500g das kritische Herzgewicht erreicht. In diesem Stadium kann die Ausdehnung der Diffusionsstrecke durch Zunahme der Querschnittsfläche zu groß werden, als daß eine ausreichende Nährstoffversorgung des Myokards gewährleistet werden kann.

Bei Kardiomyozyten handelt es sich um terminal ausdifferenzierte, irreversibel postmitotische Zellen. Daher scheidet Zellteilung (Hyperplasie) als Reaktion auf vermehrte Arbeitsbelastung aus; es kommt zur Hypertrophie. Diese ist gekennzeichnet durch eine Reihe charakteristischer Veränderungen. Hauptmerkmale sind dabei die Volumenzunahme um den Faktor 2 bis 3 (MESSERLI et al., 1993) und der Anstieg des Proteingehalts durch Synthesesteigerung (SUGDEN und FULLER, 1991).

Die wichtigsten Ursachen für die Ausbildung einer Herzhypertrophie sind eine vermehrte Druck- oder Volumenbelastung. Durch die resultierende Überlastung wird

eine Steigerung der Herzleistung durch eine vorübergehende Überfunktion der Myozyten ausgelöst. Bei einer Druckbelastung führt die gesteigerte systolische Wandspannung zur Neubildung von Myofibrillen in paralleler Anordnung, was makroskopisch als Zunahme der Ventrikelwanddicke bei gleich bleibendem Innenvolumen imponiert; man spricht von einer *konzentrischen Hypertrophie*.

Im Falle einer Volumenbelastung hingegen kommt es zur Steigerung der initialen diastolischen Wandspannung, was in einer Verlängerung des kontraktiven Apparates durch die Synthese neuer Sarkomere resultiert. Makroskopisch nehmen Ventrikelwanddicke und Ventrikelvolumen proportional zu; man spricht von einer *exzentrischen Hypertrophie* (WOLLERT und DREXLER, 2002).

Dieser quantitative Anstieg von kontraktiven Elementen ist nicht die einzige Umgestaltung. Er ist assoziiert mit qualitativer Veränderung der Genexpression, der sich in der Induktion von fetalen Genen sowie der Genexpression von kontraktiven und Kalzium-abhängigen (*calcium handling protein*) Proteinen äußert.

Als Antwort auf persistierende hämodynamische Last spielen das neurohumorale System und Zytokine eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer pathologischen Myokardhypertrophie. Die qualitativen Veränderungen der Genexpression in hypertrophierten Myozyten führt zu einer Beeinträchtigung der kontraktiven Funktion, welche zu einer andauernden Aktivierung der Neurohormone und Zytokine führt und somit einen sich selbst verstärkenden Wirkungskreislauf entstehen läßt.

Zu den Induktoren der Myokardhypertrophie zählen heute besonders das *Endothelin-1*, ein Vasokonstriktor, und *α_1 -adrenerge Agonisten* (z. B. Phenylephrin [SUGDEN und BOGOYEVITCH, 1996; FEDIDA et al., 1993; TERZIC et al., 1993; van BILSEN, 1997]), sowie *Angiotensin II*, eine der wirksamen Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches nicht direkt, sondern über die Freisetzung parakriner Faktoren Hypertrophie-auslösend wirkt (KIM et al., 1995; ITO & HIRATA et al., 1993). Weiter sind *Wachstumsfaktoren* (z. B. Fibroblast growth factor [PARKER et al., 1990], Insulin-like growth factor [ITO & HIROE et al., 1993; LEVANDERO et al., 1998]) und *Zytokine* (z. B. Transforming growth factor β [VILLARREAL et al., 1992; BOLUYT et al., 1994], Cardiotrophin-1 [WOLLERT et al., 1996]) zu nennen. Als weitere Mechanismen konnten *Dehnung* (KOMURO et al., 1991), *Hypoxie* (ITO & ADACHI et al., 1996) und *Zell-Zell-Kontakt* (CLARK et al., 1998) identifiziert werden.

Mechanismen, die den Übergang von der kompensatorischen Überlast-Hypertrophie in die dekompensierte Herzinsuffizienz bewirken, sind jedoch noch ungeklärt und entziehen sich somit einem hypothetischen Therapieansatz.

1.2. Zellkulturmodell zur Erforschung der Myokardhypertrophie

Neben der in vivo-Methode (lat.: am Lebendigem) gibt es die in vitro-Methode (lat.: im Glas, d. h. außerhalb des lebenden Organismus), um kausale Zusammenhänge besser zu erforschen. Hierbei können die natürlichen Abläufe unter kontrollierten Bedingungen simuliert werden.

Da es in vivo schwierig ist, physiologische Vorgänge aufgrund ihrer Komplexität genau abzugrenzen, wurden in der vorliegenden Studie die Vorteile des Zellkulturmodells genutzt. Hierbei ist es möglich mit definierten Medien, gleich bleibenden Versuchsbedingungen und genau bekannten Wirkstoffkonzentrationen biochemische Faktoren unabhängig von mechanischen Effekten zu untersuchen.

Wenn die myokardiale Hypertrophie nicht angeboren ist, wird sie durch entsprechende pathogenetisch wirksame Konstellationen (z. B. Hypertonie) im Erwachsenenalter manifest. Um eine adäquate Vergleichssituation zu erreichen, wurden in dieser Studie adulte, terminal differenzierte Rattenkardiomyozyten verwendet.

1.3. p38 MAPK-Phosphorylierung als pro-hypertropher Stimulus

Als Teil der zellulären Antwort auf externe Stimuli kommt es zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Bei den mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) handelt es sich um Serin-/Threonin-Proteinkinasen, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine phosphorylieren können. Über diesen Mechanismus können sie zahlreiche zelluläre Vorgänge wie z. B. die Gentranskription regulieren. Sie sind in verschiedenen Zelltypen, wie z. B. in Kardiomyozyten, in vaskulären Endothelzellen und in vaskulären Glattmuskelzellen präsent und an Prozessen der

Gefäßpermeabilität, Zytokinproduktion und vasomotorischen Funktionen (KHAN et al., 2004) beteiligt.

Die p38 MAPK wird durch z. B. Hyperosmolarität, Lipopolysaccharid, inflammatorische Zytokine (u. a. TNF α) und UV-Licht aktiviert (HAN, et al., 1994; RAINGEAUD et al., 1995). Die doppelt-spezifischen Kinasen MKK3/4/6 setzen am Phosphorylierungsmotiv Thr-Gly-Tyr an und aktivieren p38 MAP-Kinasen, welche im Kern Transkriptionsfaktoren aktivieren und an der Regulation der Expression der beiden Protoonkogene c-jun und c-fos und somit des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt sind (Übersicht bei WHITMARSH & DAVIS, 1996).

Als weitere Aktivatoren der p38 MAPK werden in der Literatur verschiedene Radikale wie Superoxid (O₂^{•-}), Stickstoffmonoxid (NO[•]) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) genannt (BAAS & BERK, 1995; LANDER et al., 1996; WANG et al., 1998).

1.3.1. Angiotensin II-Signalkaskade zur p38 MAPK-Phosphorylierung

Die Arbeit von WENZEL (2001) zeigt sehr genau die durch Angiotensin II induzierte Signalkaskade zur Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase, welche einen großen Einfluß auf die Hypertrophieentwicklung nimmt.

Das Renin-Angiotensin-System ist auch in Kardiomyozyten ausgebildet. Seine aktive Komponente Angiotensin II (Ang II) bindet an seinen Rezeptor (AT₁-Rezeptor) und löst einen Redox-sensitiven Signalschritt aus. Hierbei werden NAD(P)H-Oxidasen vom glattmuskulären Typ aktiviert, welche aus molekularem Sauerstoff Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) bilden. Diese wiederum aktivieren eine Proteinkinase C (PKC), die kausal an der Phosphorylierung der p38 MAPK beteiligt ist. Dadurch wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 mit seinen Untereinheiten c-fos und c-jun gesteigert, wodurch im Anschluß eine vermehrte Expression an pro-hypertrophischen Zytokinen erfolgt.

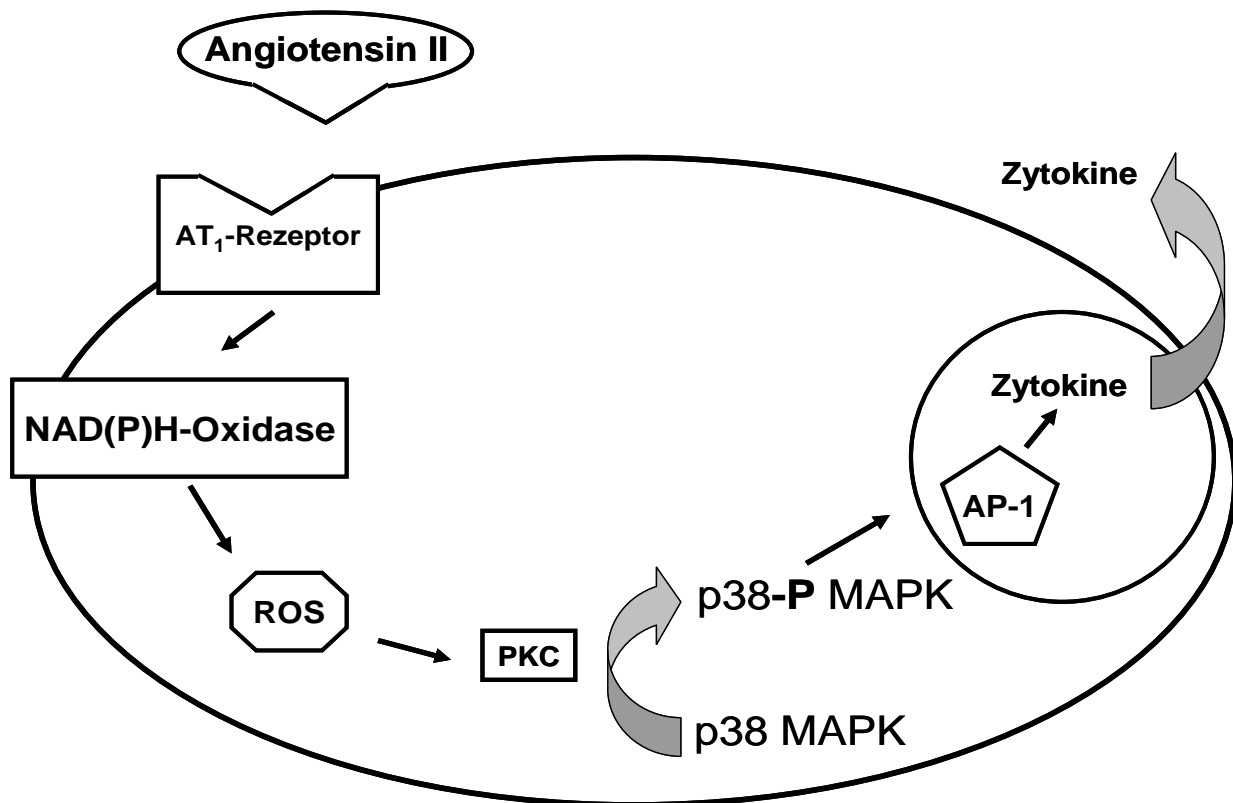


Abb. 1: Schematische Darstellung der Angiotensin II-induzierten Zytokinexpression in der Herzmuskelzelle.

Angiotensin II (Ang II) bindet an seinen Rezeptor (AT₁-Rezeptor) und aktiviert somit NAD(P)H-Oxidasen, welche daraufhin reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden. Diese aktivieren eine Proteinkinase C (PKC), welche im weiteren Verlauf für die p38 MAPK-Phosphorylierung verantwortlich ist. Im Nucleus wird dadurch der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert und vermehrt Zytokine gebildet. Diese werden von der Zelle sezerniert.

1.3.2. NO-Radikale als Induktoren der p38 MAPK-Phosphorylierung

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle in der Kreislaufphysiologie (KELLY et al., 1996). Es entsteht endogen aus Oxidation der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin (ARCHER, 1993; MARLETTA, 1993) und wird durch verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert. Es gibt drei Isoformen der NOS, die neuronale nNOS (BREDET et al., 1990), die endotheliale eNOS (MICHEL & LAMAS, 1992) und die induzierbare iNOS (ROBERTS et al., 1992). nNOS und eNOS sind beide konstitutiv und werden Ca⁺⁺-abhängig über Ca⁺⁺/Calmodulin-Bindung aktiviert, während iNOS Ca⁺⁺-unabhängig ist und nur nach Induktion, vor allem durch

Zytokine, exprimiert wird. In Kardiomyozyten sind vor allem eNOS und nNOS zu finden (BALLIGAND et al., 1993 a,b; de BELDER et al., 1993).

In vielen Studien sind bereits Zusammenhänge zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem NO-Signaling beschrieben worden. Angiotensin II ist in der Lage die NO-Produktion durch Bindung an seinen AT₂-Rezeptor und daraus folgender Erhöhung der eNOS-Expression über den Calcineurin-Nuklearfaktor-AT (NFAT)-Signalweg (RITTER et al., 2003) zu stimulieren. Die funktionelle Relevanz der AT₂-Rezeptoren in Kardiomyozyten ist aber noch immer unklar.

Des Weiteren ist durch KOJDA (1997) gezeigt worden, daß in Kardiomyozyten eine lösliche Guanylatzyklase existiert, die durch NO zur Bildung von cGMP angeregt wird. Hier findet sich auch wieder ein Schnittpunkt zur p38 MAPK-Signalkaskade, wie unter Punkt 1.3 beschrieben. INGRAM et al. (2000) beschreiben eine Abschwächung der durch Dehnung induzierten p38 MAPK-Phosphorylierung durch die Gabe von NO-Donor S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) und dem cGMP-Analogen zyklisches 8-bromo-Guanosin-3',5'-monophosphat (8-br-cGMP) in Mesangiumzellen der Ratte. Dies ist auf den Einfluß von NO auf die Aktivität von intrazellulären Proteinen durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit resultierendem cGMP-Anstieg oder der verstärkten post-translativen Modifikation von Proteinen via Nitrosylierung zurückzuführen.

1.4. Biologische Wirkung von NO

1.4.1. Wirkung von NO auf das Herz-Kreislauf-System

NO ist ein wichtiges intrazelluläres Signal- und Mediatormolekül, welches über den „second messenger“ cGMP funktioniert. Seine Funktionsweise ist sehr vielfältig aber auch sehr konträr. Zum einen werden ihm pro-apoptotische und zum anderen anti-hypertrophe Eigenschaften zugesprochen. Da neben der Erniedrigung des Gefäßtonus (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987) und der Reduktion der Thrombozytenadhäsions- und –aggregationsneigung (AZUMA et al., 1986) noch andere Prozesse von Gefäßerkrankungen beeinflusst werden, wird NO als protektives Prinzip im vaskulären System betrachtet.

Im Allgemeinen wirkt NO vasodilatatorisch, antiinfektiös, antiproliferativ (HIBBS et al., 1987) und nimmt Einfluß auf die Synthese inflammatorischer Zytokine (TIAO et al., 1994; HARBRECHT et al., 1995). Auch Zelldifferenzierung (MORBIDELLI et al., 1996) und Apoptose (ALBINA & REICHNER; 1995) werden durch NO beeinflusst.

1.4.2. Wirkung von NO auf kardiovaskulärer Ebene

ZHAN et al. (2000,1999) konnten in neonatalen Kardiomyozyten durch exogenes NO eine Abschwächung der durch Angiotensin II induzierten Hypertrophie beobachten, sowie durch endogenes und exogenes NO eine Verringerung der durch Angiotensin II induzierten Expression des Protoonkogens c-fos. Im Gegensatz zu RITTER et al. (Punkt 1.3.2) wurde von ihnen jedoch eine deutliche Verringerung der eNOS-mRNA Expression unter Angiotensin II-Wirkung in neonatalen Kardiomyozyten beschrieben. Einen anti-hypertrophischen Effekt von NO und cGMP konnten RITCHIE et al. (1998) in adulten Kardiomyozyten nachweisen. Hier konnte ein NO- und cGMP-konzentrationsabhängiger Abfall der α_1 -adrenozeptorstimulierten Proteinsynthese beobachtet werden.

Andere Studien beschreiben den Einfluß von NO auf die Kontraktilität des Myokards. Hier wird zum einen die Wirkung des NO, induziert durch β -adrenerge Stimulation, in Verbindung mit Katecholaminen negativ inotrop dokumentiert (ZIOLO et al., 2001). Andererseits konnten von BRIXIUS et al. (1994) eine positiv inotrope Wirkung von Nitraten am isolierten „working heart“ des Kaninchens, sowie eine negativ inotrope Wirkung von NOS-Inhibitoren in vivo und in vitro nachgewiesen werden, was für eine positiv inotrope Wirkung von endogenem NO spricht (KLABUNDE et al., 1992, 1991). KOJDA (1997) konnte einen positiven Einfluß auf die Kontraktilität in Verbindung mit gering erhöhten cGMP-Spiegeln, jedoch einen hemmenden Effekt durch stark erhöhte cGMP-Spiegel nachweisen.

Hierbei wird die konzentrationsabhängige biphasische Wirkung von NO deutlich, die zu verstehen für die Weiter- oder Neuentwicklung von kardial-wirkenden Pharmaka wichtig ist.

Des Weiteren induziert NO Apoptose (programmierter Zelltod) in Kardiomyozyten. Dies geschieht konzentrationsabhängig. Während niedrige NO-Konzentrationen eine vornehmlich anti-hypertrophe Wirkung haben und physiologisch keine toxische Wirkung aufweisen, werden Kaspase-Aktivierung, DNA-Fragmentation und Zelltod durch hohe NO-Konzentrationen induziert. Diese hohen Konzentrationen werden hauptsächlich durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS), deren Expression während pathologischer Zustände durch Zytokine nukleär induziert wird, gebildet. NO an sich ist nicht zytotoxisch, erreicht aber eine hohe Reaktivität und Toxizität durch Reaktion mit Superoxid zu Peroxynitrit [ONOO^\bullet (BECKMANN et al., 1999)].

Zusammenfassend aus WOLLERT & DREXLER (2002) ist NO ein Regulator der Herzhypertrophie, der Apoptose und des Remodeling. Die jeweiligen Auswirkungen sind abhängig vom Redox-Zustand der Zelle. Geringe, von eNOS synthetisierte NO-Konzentrationen zeigen eine positive anti-hypertrophe Wirkung, reduzierte Kammerdilatation und verminderte Mortalität. Dagegen wirken hohe, durch iNOS gebildet NO-Konzentrationen maladaptiv durch reduzierte Kammerkontraktionsfunktion, verstärkter Apoptose und gesteigerter Mortalität.

1.5. Fragestellung

Als Ziel der vorliegenden Arbeit galten folgende zentrale Fragen zu beantworten:

- Welche funktionelle Bedeutung hat eine myokardiale eNOS-Expression auf die Phosphorylierung stressaktivierter Kinasen (p38 MAP-Kinasen)?
- Welche Beeinflussung hat der zelluläre cGMP-Gehalt auf diese Aktivierung?
- Reicht eine durch Hemmung der endogenen NO-Bildung hervorgerufene p38 MAPK-Phosphorylierung aus, um distal der p38 MAPK angesiedelte Signalwege zu aktivieren?

Abbildung 2 illustriert die möglichen, in der folgenden Arbeit analysierten, Interaktionen von NO mit dem Angiotensin II-abhängigen Signalweg.

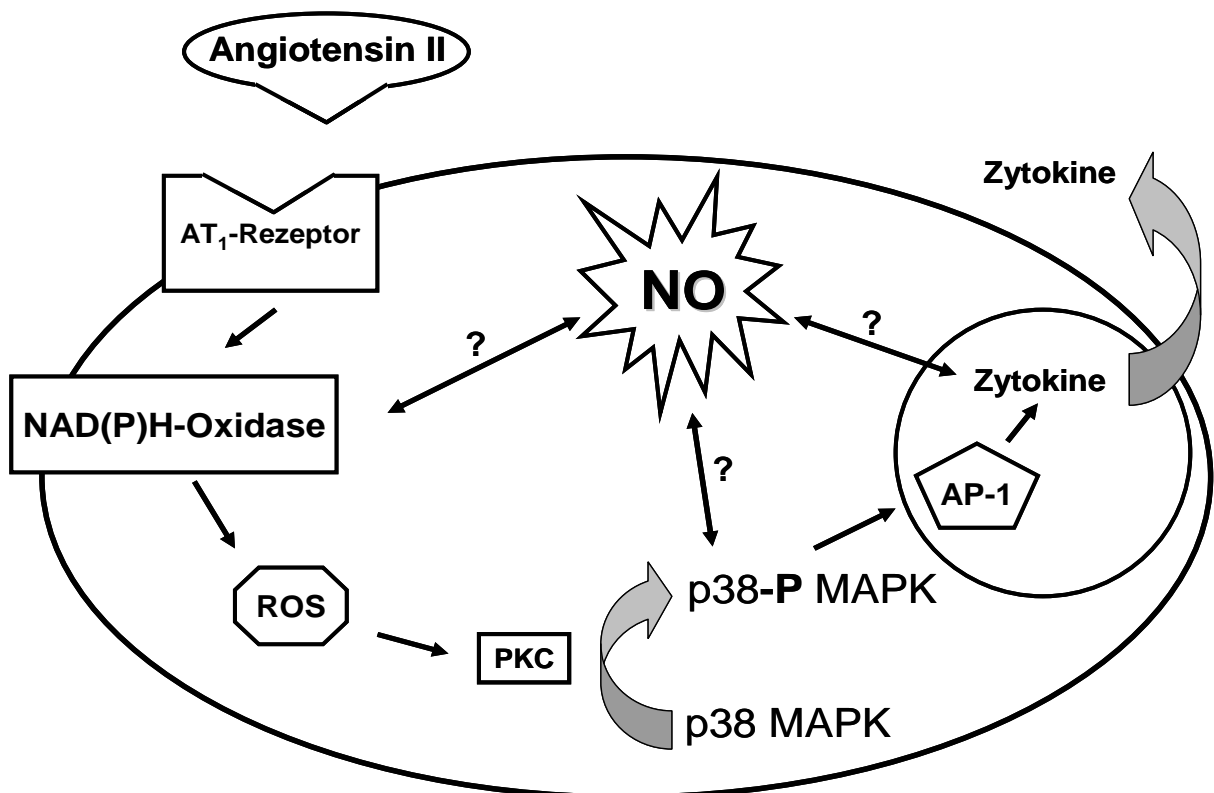


Abb. 2: Hypothetische Einwirkungen von endogenem und exogenem Stickstoffmonoxid (NO) auf die p38 MAPK-Phosphorylierung zur Zytokinexpression.

2. MATERIAL

2.1. Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	qbiogene, Heidelberg
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Angiotensin II	Bachem, Weil am Rhein
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	Applichem, Darmstadt
8-bromo-cGMP	Sigma, Taufkirchen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Chlorophorm	Roth, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cytosin- β -Arabinfuranosid	Sigma, Taufkirchen
0,1 M Dithiotreitol	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DNeasy [®] Tissue Kit (50)	Qiagen, Hilden
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen

Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Cölbe
Fluka Marker 69813	Sigma, Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Hydroxymethylfurylbenzylindazol	Merck, Darmstadt
100bp Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Laminin	Sigma, Taufkirchen
L-Nitro-Arginin	Sigma, Taufkirchen
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
MTT Tetrazolium	Sigma, Taufkirchen
dNucleotid Solution	Invitrogen, Karlsruhe
N-Acetyl-3-mercapto-D-valine	Sigma, Taufkirchen
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
Neonatales Kälberserum	PAA, Cölbe
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, Taufkirchen
Oxadiazoloquinoxalin	Merck Bioscience GmbH, Bad Soden
Ortho-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
10x PCR Buffer minus Mg	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR-Beads®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

rRNasin® Rnase Inhibitor	Promega, Mannheim
5x first Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
Saccharose	Merck, Darmstadt
S-Nitroso-N-acetylpenicillamin	Merck Bioscience GmbH, Bad Soden
Sodiumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Spermin-NONOat	Merck Bioscience GmbH, Bad Soden
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Tetramethylethylenediamin	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
W-1 (Detergenz)	Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Salze und Chemikalien wurden in der höchsten bei den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) erhältlichen Qualität bezogen und verwendet. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet, falls nichts anderes angegeben wurde.

2.1.1. Antikörper

Der TGFβ₁-Antikörper wurde von der Firma Merck (Darmstadt), alle übrigen verwendeten Antikörper von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.1.2. Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

2.2. Geräte

2.2.1. Allgemein verwendete Geräte/ Gebrauchsgegenstände

aqua bidest.-Anlage	Millipore, Eschborn
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Porzellanmörser	Fisher Scientifics, Schwerte
Techne Dri-Block [®] DB.2D (Thermoblock)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Wasserbad (Typ: Julabo U3)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau

2.2.2. Spezielle Geräte/Gebrauchsgegenstände

iCycler	BioRad, München
Thermo Cycler	Techne Cyclogen
Spectrophotometer Ultrospec [®] 2000	Pharmacia Biotech
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf

2.2.2.1. Zellkultur

Brutschrank (Typ: Cytoperm)	Kendro, Hanau
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt physiologisches Institut, Giessen
Mikroskop (Typ: TMS-F)	Nikon, Düsseldorf
Nylonnetz (Porengröße 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Primaria Kulturschalen Falcon Typ 3803	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank (Typ: Lamin Air [®] HBB 2472)	Kendro, Hanau

2.2.2.2. SDS-PAGE

Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hoefer-Elektrophoresekammer (SE 600)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Glasplatte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Plattenklemme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Profilformer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Spacer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon P	Millipore, Eschborn
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen

2.2.3. Verbrauchsmaterialien

Falcon Kulturschalen Typ 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Zellschaber Typ Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg

Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)
0,2 ml Thermo-strip (tubes + cups)
Nylon (Typ: Hybond-N 0,45 Micron)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)
Mikrotiterplatten

Sartorius, Göttingen
ABgene[®], Hamburg
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Becton Dickinson, Heidelberg

2.3. EDV

Corel Photo Paint[®]
Image Quant
Microsoft Excel 2000[®]
Microsoft Windows ME[®]
Microsoft Word 2000[®]

Corel Inc., USA
Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Corp., USA
Microsoft Corp., USA
Microsoft Corp., USA

3. Methoden

3.1. Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen

3.1.1. Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus adulten männlichen Wistar-Ratten von 250-350g Lebendgewicht isoliert. Die Tiere wurden im hauseigenen Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet und aufgezogen. In der Haltung stand ihnen Futter (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

3.1.2. Präparation isolierter Kardiomyozyten der Ratte

Die Präparation der Ratten und die Isolierung der Kardiomyozyten erfolgten wie bei PIPER et al. (1982) beschrieben. Die hierbei verwendete Langendorff-Perfusionsanlage wurde zu Beginn mit aqua bidest. gespült und luftblasenfrei mit Powell-Medium gefüllt. Während der gesamten Isolationsdauer wurde das Perfusionsmedium über einen Thermokreislauf auf 37°C erwärmt und mit Carbogen[®] begast, um einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten.

Kalzium-Stammlösung:

CaCl ₂	100 mmol/l
-------------------	------------

Powell-Medium: (Carbogen[®] begast)

NaCl	110,0 mmol/l
NaHCO ₃	25,0 mmol/l
Glucose	11,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2 mmol/l

Nach einer kurzen Diethylethernarkose bis zum Status einer tiefen Bewußtlosigkeit wurden die Ratten per Genickbruch getötet und der Thorax eröffnet, das Zwerchfell entfernt und das Herz mit samt der Lunge herauspräpariert und sofort in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung überführt. Hier wurde das Herz von anhängenden Organ- und Geweberesten frei präpariert und anschließend mit der Aorta ascendens an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt. Danach erfolgte eine Spülung mit ca. 50ml Powell-Medium, um eine Blutleere des Organs zu erreichen, sowie eine retrograde, rezirkulierende Perfusion mit 50ml Kollagenase-Puffer für 25 Minuten. Die Flußrate betrug hierbei 5ml/min/Herz.

Kollagenase-Puffer:

Powell-Medium	50,0 ml
Kollagenase	20,0 mg (chargenabhängig)
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt und die Ventrikel mittels eines Gewebhackers (Schnittabstand 0,7mm) in zwei Ebenen mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde der Gewebebrei für fünf Minuten bei 37°C mit 30ml Kollagenase-Puffer unter ständiger Carbogen®-Begasung nachverdaut. Um die Separierung der einzelnen Zellen zu unterstützen wurde die Suspension alle ein bis zwei Minuten mittels einer 5ml Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert.

Nach anschließender Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 200µm wurden durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 25 x g Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Kollagenaselösung von den intakten Herzmuskelzellen getrennt. Darauf erfolgte eine Resuspension des Sediments in Powell-Medium mit 200µmol/l CaCl₂ und eine erneute Zentrifugation bei 25 x g für zwei Minuten, um eine erhöhte Zelltrennung sowie eine langsame Gewöhnung der Kardiomyozyten an Kalzium zu erreichen. Das hierdurch gewonnene Zellpellet wurde nochmals mit Powell-Medium mit einem 400µmol/l CaCl₂-Anteil aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese Zellsuspension wurde auf eine der Ausgangszahl an Herzen entsprechenden Anzahl an Reagenzröhrchen,

welche mit einer 10cm hohen Flüssigkeitssäule des Albumingradienten gefüllt waren, aufgeteilt.

Albumingradienten-Lösung:

Powell-Medium	x	ml
Bovines Serum Albumin (BSA)	2 %	(wt/vol)
Kalzium-Stammlösung	500	µl

Nach einer abschließenden einminütigen Zentrifugation bei 15 x g erhielt man im Sediment eine Zellpopulation, welche zu ca. 40-60% aus intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.1.3. Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte

3.1.3.1. Vorplattieren der Kulturschalen

Um ein optimales Anheften der isolierten Kardiomyozyten zu gewährleisten war es notwendig, die verwendeten Kulturschalen Falcon Typ 3004 oder 3001 mit Vorplattiermedium für mindestens acht Stunden bei 37°C im Brutschrank zu inkubieren. Das Vorplattiermedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten abgesaugt.

Vorplattiermedium:

CCT-Medium (sterilfiltriert, pH 7,4)	x	ml
Fetales Kälberserum (FCS)	4 %	(vol/vol)
Penicillin	100	IE/ml
Streptomycin	100	µg/ml

3.1.3.2. Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die in 3.1.2 isolierten Kardiomyozyten wurden in 20ml des auf 37°C erwärmten CCT-Kulturmediums homogen resuspendiert und mit einer Dichte von etwa 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausplattiert.

CCT-Medium (sterilfiltriert):

M199 / HEPES gepuffert	x	ml
Creatin	5	mmol/l
Taurin	5	mmol/l
Carnitin	2	mmol/l
Cytosin- β -Arabinofuranosid	10	$\mu\text{mol/l}$
		pH 7,4

CCT-Kulturmedium (sterilfiltriert):

CCT-Medium	x	ml
Penicillin	100	IE/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$

Die Präparationsqualität wurde unmittelbar im Anschluß mikroskopisch auf intakte, stäbchenförmige, sich spontan kontrahierende Kardiomyozyten kontrolliert. Zum Anheften der Kardiomyozyten auf dem Boden der Kulturschale war es nötig, diese bei 37°C zu inkubieren.

3.1.3.3. Kurzzeitkultivierung von Kardiomyozyten

Nach mindestens zweistündiger Anheftungsphase durch Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturen bis zu zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Dadurch wurden die vom Schalenboden abgelösten abgestorbenen Zellen, welche deutlich an ihrer abgerundeten Zellform mikroskopisch zu identifizieren waren, entfernt. Die verbliebene Zellkultur wies zu ca. 90% stäbchenförmige und somit vitale Kardiomyozyten auf. Nach dem Waschvorgang und einer anschließender

zehnminütigen Ruhephase wurden die Zellkulturen je nach Versuchsprotokoll induziert. Auf die Schalen Typ Falcon 3001 wurden je 1ml, auf die Typ Falcon 3004 je 2ml Medium, als Endvolumen gegeben. Dieser Arbeitsvorgang ging allen folgenden Experimenten voraus.

3.2. Isolierung von Kardiomyozyten aus adulten Mäuseherzen

3.2.1. Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus adulten transgen veränderten Mäusen und deren nicht transgenen Wurfgeschwistern isoliert. Die Tiere wurden von Herrn Professor G. Kojda, Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um eNOS-„knock-out“-Mäuse. Diese Tiere weisen eine vollständige (homozygot, eNOS^{-/-}) oder partielle (heterozygot, eNOS^{+/-}) Deletion des eNOS-Gens auf. Zur Phänotypisierung der Mäuse siehe G. KOJDA (1997): *Vasoprotektive, inotrope und hämodynamische Wirkungen von Stickstoffmonoxid*. Die Nachzucht erfolgte im hauseigenen Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. In der Haltung stand ihnen Futter (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

3.2.2. Genotypisierung der Mäuse

3.2.2.1. DNA-Gewinnung

Für diesen Arbeitsabschnitt war es notwendig, einen Eingriff ohne Betäubung an den Tieren vorzunehmen. Dies geschah nach Kriterien des §9(2), Abs. 4b) des Tierschutzgesetzes. Zur Charakterisierung des Genotyps wurde DNA durch ein Schwanzspitzenbiopstat gewonnen. Die Schwanzspitze wurde den Mäusen per Scherenschlag ohne Betäubung amputiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben.

Anschließend wurden die Mäuse mit nummerierten Ohrclips zur späteren Identifizierung markiert. Die DNA-Gewinnung erfolgte nach dem Protokoll eines DNeasy Kit[®]. Durch die unterschiedlichen Arbeitsschritte mit dem im DNeasy Kit[®] beinhaltenen Ingredienzien erhielt man gegenüber einer herkömmlichen DNA-Isolation in kürzerer Zeit ein Produkt mit deutlich höherem Reinheitsgrad.

3.2.2.2. PCR-Analyse

Der Nachweis des Genotypus erfolgte mittels einer PCR-gestützten Analyse genomischer DNA. Dabei wurden jeweils Sequenzen amplifiziert, die entweder ausschließlich in der eNOS-defizienten „knock-out“-Maus (Neomycin-Resistenz-Gen) oder ausschließlich in der Wildtyp-Maus (Exon 12 des eNOS-Gens) vorkommen. Um eine Kontamination der genomischen DNA und daraus resultierende Fehlinterpretationen zu vermeiden, erfolgten die gesamten Arbeitsschritte unter möglichst sterilen Bedingungen. In der PCR wurden nun die DNA-Abschnitte amplifiziert. Dabei fanden PCR-Beads[®] Verwendung. Zu diesen wurden noch 23µl Primer-Mix und 2µl DNA-Template gegeben und bei einer für die Primer spezifische Zyklusanzahl und Temperatur im Thermocycler bearbeitet.

Primer:

WT-Sense	GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC
WT-Antisense	GAC CCA TAC AGA TGG TTG CC
MUF	CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC
MUB	TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC

Primer-Mix:

WT-Sense	5 µl
WT-Antisense	5 µl
MUF	5 µl
MUB	5 µl
Aqua bidest.	3 µl
DNA-Template	<u>2 µl</u>

Σ 25 µl/PCR-Bead[®]

Im Thermocycler wurden nun folgende Programme durchlaufen.

<u>Programm 1:</u> (1 Zyklus)	Denaturierung	94°C, 6 min
<u>Programm 2:</u> (35 Zyklen)	Denaturierung	94°C, 1 min
	Annealing	55°C, 1 min
	Amplifikation	72°C, 2 min

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Es wurde 75ml 1xTAE-Puffer mit 1,5g Agarose zu einer homogenen Lösung in einer Mikrowelle gekocht, anschließend mit 3,75µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Profilformer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit 1xTAE-Puffer überschichtet und mit 8µl der Proben, welchen zuvor 2µl TAE-Auftragspuffer zugesetzt wurde, beladen.

<u>10xTAE-Puffer:</u>		
Tris/HCl		40 mmol/l
EDTA		1 mmol/l

<u>Agarosegel:</u>		
1xTAE-Puffer		75 ml
Agarose		1,5 g
Ethidiumbromid		3,75 µl

<u>TAE-Auftragspuffer (farblos):</u>		
10xTAE-Puffer		x ml
Saccharose		50 % (wt/vol)

Zur Identifizierung der Fragmentgröße der zu untersuchenden Proben wurde ein 100 Basenpaarmarker mit auf die Gele gebracht. Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA pro Gel statt. Nach ausreichender Auftrennung des Markers erfolgte eine Betrachtung unter UV-Beleuchtung (312nm). Der in die DNA-Fragmente interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (MANIATIS et al., 1989) fluoreszierte violett. Die Gele wurden abfotografiert, ausgedruckt und archiviert.

3.2.2.3. Genotyp-Identifizierung

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte ergab sich immer mindestens eine Bande. Dabei stand eine 256 Basenpaar-Bande (bp) für das intakte eNOS-Gen, während eine 542 bp-Bande das Neomycin-Resistenz-Gen repräsentierte, welches anstelle des eNOS-Gens bei den Tieren transgenetisch ersetzt worden war. Heterozygote Tiere wiesen beide Banden auf. Nach erfolgreicher Genotypisierung konnten die Tiere zu Versuchen oder zur weiteren Nachzucht herangezogen werden.

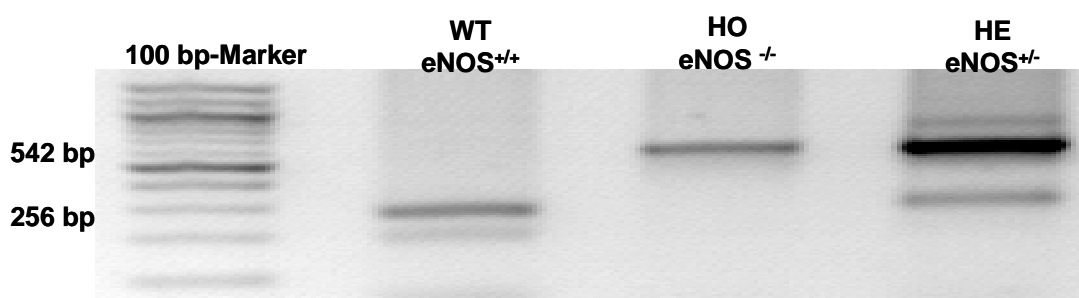


Abb. 3: Genotypisierung der eNOS-Ko-Mäuse.

2 %iges Agarose-PCR-Gel versetzt mit Ethidiumbromid und invertiert.

Von links nach rechts: 100 bp-Marker, Wildtyp (WT), homozygoter Ko-Typ (HO), heterozygoter Typ (HE).

3.2.3. Präparation isolierter Kardiomyozyten der Maus

Die Präparation der isolierten Kardiomyozyten aus Mäuseherzen erfolgte zum größten Teil nach dem Protokoll für die isolierten Kardiomyozyten aus Rattenherzen. Nachdem die Herzen an der Langendorff-Perfusionsanlage angehängt waren, erfolgte eine Reperfusion mit 45ml Kollagenase-Puffer für eine Zeit von 25 Minuten.

Kollagenase-Puffer (Mäusemyozyten):

Perfusionsmedium	45,0 ml
Kollagenase	25,0 mg (chargenabhängig!)
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

Nach dem Filtrieren und Zentrifugieren bei 25 x g erfolgte jeweils im Wechsel eine Resuspension des Zellpellets in abnehmenden Volumina an Perfusionsmedium (8ml/ 4ml/ 2ml/ 1ml) mit steigender CaCl₂-Konzentration (125µmol/l/ 250µmol/l/ 500µmol/l/ 1000µmol/l) und Zentrifugation bei 15 x g.

Perfusionsmedium (Mäusemyozyten, sterilfiltriert):

NaCl	110,0 mmol/l
HEPES	25,0 mmol/l
Glucose-Monohydrat D+	11,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mmol/l
	pH 7,4

Abschließend wurden die Zellen in das Kulturmedium aufgenommen, welches dem der Rattenmyozyten entsprach.

3.2.4. Zellkultur von Kardiomyozyten der Maus

3.2.4.1. Vorplattieren der Kulturschalen

Um auch hier ein Anheften der isolierten Kardiomyozyten zu erreichen, wurden die verwendeten Kulturschalen Falcon Typ 3004 mit 1ml Vorplattiermedium für 1-2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dem Vorplattiermedium war Laminin zugesetzt, was im Gegensatz zu fetalem Kälberserum (FCS) eine bessere Anheftung in kürzerer Zeit bewirkte.

Vorplattiermedium (Mäusemyozyten):

CCT-Medium	985 µl
Laminin	<u>15 µl</u>
	1 ml/Schale

Das Vorplattiermedium wurde kurz vor dem Ausplattieren der Zellen abgesaugt.

3.2.4.2. Ausplattieren der Kardiomyozyten

Das Ausplattieren und die Kurzzeitkultivierung erfolgten nach dem Protokoll für die Kardiomyozyten aus Rattenherzen wie in Punkt 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

3.3. Präparation isolierter mikrovaskulärer Endothelzellen aus adulten Rattenherzen

Die Präparation erfolgte nach PIPER et al. (1990). Da die Endothelzellen bei der Gewinnung der Kardiomyozyten anfielen, erfolgte der Präparationsvorgang anfangs wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben. Ab dem Arbeitsschritt nach der Filtration durch das Nylonnetz und der anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand zur Endothelzellisolation weiterverwendet. Dieser wurde mit 10mg Trypsin und 30µl des 100mmol/l CaCl_2 versetzt, unter ständiger Carbogen[®]-Begasung und bei 37°C langsam mittels eines elektrischen Rührers für 30 Minuten durchmischt und in 60ml M199/CO₂ aufgenommen.

M199/CO₂ (sterilfiltriert):

Medium 199/Earl's Salts	9,5 g
HEPES	15,0 mmol/l
NaHCO ₃	17,9 mmol/l
Carbogen [®]	min. 2 h begast
aqua bidest.	ad 1 l
	pH 7,4

Das durch eine anschließende Zentrifugation über zehn Minuten bei 60 x g gewonnene Pellet wurde in ca. 10ml auf 37°C erwärmtem Endothelzellmedium resuspendiert.

Endothelzellmedium:

M199/CO ₂	x ml
NCS/FCS (1:1)	20 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Die Zellsuspension wurde auf eine bereits 20ml Medium enthaltende Primariaschale[®] Falcon Typ 3803 verteilt und für vier Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Kulturen zur Entfernung nicht angehefteter Zellen mit Endothelzellmedium gewaschen. Bis zum Ausbilden eines konfluenten Zellrasens wurden das Medium alle zwei Tage gewechselt, wobei die Antibiotikakonzentration von 5% auf 2% reduziert wurde.

3.3.1. Passage von mikrovaskulären Endothelzellen

Nach mikroskopischer Wachstumskontrolle wurden die Endothelzellkulturen zwei- bis dreimal mit EDTA-Puffer gewaschen. Als Ca⁺⁺-Chelator bewirkte EDTA eine Spaltung der intrazellulären Kalziumbrücken und somit eine Lösung des Zellverbandes sowie ein Abbinden des restlichen Kalziums aus dem Medium. Da hierbei auch tote Zellen, sonstige Zellbestandteile und Stoffwechselprodukte ausgewaschen wurden, wurde damit die Wirkungsfläche für das Trypsin erhöht.

EDTA-Puffer (sterilfiltriert) :

NaCl	125,0 mmol/l
HEPES	10,0 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mmol/l
EDTA-Na ₂	0,5 mmol/l
	pH 7,4

Zum Auflösen der Zell-Zell-Verbindungen des Endothelzellrasens wurde der Kulturschale 5ml Trypsin zugegeben und diese für zehn Minuten im Brutschrank

inkubiert. Durch Zugabe von Endothelzellmedium wurde diese Verdauungsreaktion wieder gestoppt und die Zellsuspension auf eine je nach Versuchsprotokoll benötigte Anzahl an Falcon Typ 3001 Schalen ausplattiert. Je nach Wachstumsrate konnten die Zellen der ersten Passage nach ein bis zwei Tagen für die jeweiligen Versuche verwendet werden.

3.4. Zellinduktion

Die Zellinduktion erfolgte jeweils mit 1:100 konzentrierteren Stocklösungen, um die gewünschte Konzentration auf der Schale mit 1ml Kulturmedium zu erreichen. Die Inhibitoren wurden dabei für 30 Minuten vor Gabe der eingesetzten Induktoren verabreicht. Die Versuchsdauer richtete sich nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll.

3.5. Zellernte

Zum Abstoppen der intrazellulären Reaktionen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Schalen vom Falcon Typ 3001 mit 1ml kaltem 1x PBS gewaschen.

10x PBS:

NaCl	15,0	mmol/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,6	mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4	mmol/l
	pH 7,3	

Danach erfolgte der Zusatz von 200µl Lysis-Puffer pro Schale, welcher für zehn Minuten auf dem Rüttelbrett bei Raumtemperatur inkubierte. Für Mäusemyozyten wurden nur 100µl Lysis-Puffer aufgrund der geringeren Myozytenzahl zugesetzt. Die einzelnen Ingredienzen des Puffers bewirkten eine Zellmembranlyse. Natrium-ortho-Vanadat hemmte die Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturierte die Proteine und umhüllte sie, was zu einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung des Komplexes führte und somit wichtig bei

der späteren Gelelektrophorese war, bei der nur noch die molare Masse des Proteins als Trennkriterium galt. Die Quartärstruktur wurde durch Aufspaltung von Disulfidbrückenbindungen durch die reduzierende Thiolverbindung Mercaptopropandiol aufgelöst.

Lysis-Puffer (SDS-PAGE):

Tris/HCl	50 mmol/l
SDS	2 % (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2 % (wt/vol)
Natrium-ortho-Vanadat	1 mmol/l
	pH 6,7

Zur Lyse von Nukleinsäuren wurden den Schalen Benzonase (50 IE/ml) für weitere fünf Minuten hinzugefügt. Daraufhin konnten die aufgelösten Zellen abgeschabt und mittels einer Mikropipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden. Diese Suspension wurde je mit 30µl 2xLaemmli-Puffer versetzt und zur endgültigen Proteindenaturierung (Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen) für fünf Minuten auf 95°C im Thermoblock erhitzt.

2xLaemmli-Puffer:

Tris/HCl	0,5 mol/l	(pH 6,8)
Glycerin	25 % (vol/vol)	
SDS (10 %)	4 % (wt/vol)	
Mercaptopropandiol	1 % (vol/vol)	
Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)	

Das Glycerin des Laemmli-Puffers wirkte beschwerend auf die Probe, was wichtig beim Beladen des SDS-PAGE-Gels war. Bromphenolblau interagiert nicht mit den Proteinen, sondern besaß nur eine Markerfunktion, um den späteren Verlauf der Lauffront zu kontrollieren, denn er wanderte vergleichbar mit Proteinen von 5kD Molekulargewicht. Die Proben waren dadurch für eine sofortige Weiterverarbeitung bereit oder konnten bei -80°C tief gefroren und gelagert werden.

3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Gesamtproteinextrakt der Kardiomyozyten wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) abhängig von der Proteingröße im elektrischen Feld aufgetrennt.

3.6.1. Aufbau der Kammer und Durchführung der Gelelektrophorese

Der Aufbau der in den Versuchen verwendeten Gelkammer gestaltete sich wie folgt: Man entfettete gründlich zwei Glasplatten mit 100%igem Alkohol und legte sie aufeinander, wobei zwei Spacer (Dicke 1,5mm) als Abstandshalter und als seitliche Begrenzung dienten. Zur Fixierung wurden zwei Schraubklammern auf die Spacerseiten aufgesetzt. Nun wurde dieses Glasplattenmodul in einen Ständer gespannt und in den entstandenen Zwischenraum das Trenngel (12,5%ig) gegossen. Da dieses unter Luftausschluß auspolymerisiert, wurde das Trenngel mit aqua bidest. überschichtet. Nach ca. einer Stunde war die Polymerisation bei Raumtemperatur abgeschlossen, und nach Dekantieren des Wassers wurde der Zwischenraum mit Sammelgel (5%ig) bis zur vollen Höhe aufgefüllt. Der Profilformer für die Proben wurde sofort im Anschluß in die noch flüssige Lösung eingesetzt. Nach ca. 20 Minuten war auch das Sammelgel auspolymerisiert, und der Laufpufferaufsatz der Kammer konnte nach Entfernen des Profilformers aufgeklemmt werden. Das Glasplatten-Gel-Element wurde in die Kammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt, so daß das Gel mit der unteren und oberen Kante in Kontakt zum Laufpuffer stand. Die Beladung des Gels erfolgte mit jeweils 30µl der nach Punkt 3.2.5 gewonnenen Proben pro Slot. Zur Orientierung wurde noch ein Molekulargewichtsmarker mit einem Spektrum zwischen 250kD und 10kD eingesetzt. Die SDS-Gelelektrophorese fand bei einer Stromstärke von 200V über bis zu vier Stunden bei Raumtemperatur statt.

4x Trenngelpuffer:

Tris/HCl	1,5 mol/l
	pH 8,6

Trenngel (12,5 %):

AA/BAA (Acrylamid/Bisacrylamid, 30:1)	11,25 ml
Trenngelpuffer	6,7 ml
Aqua bidest.	9,0 ml
SDS (10 %)	270 µl
Temed	22,5 µl
APS (Ammoniumpersulfat, 10 %)	180 µl

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl	0,5 mol/l
	pH 6,8

Laufpuffer (SDS-PAGE):

Glycin	1,44 % (wt/vol)
Tris/HCl	0,3 % (wt/vol)
SDS	0,1 % (wt/vol)

Sammelgel (5 %):

AA/BAA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest.	6,4 ml
SDS (10 %)	50 µl
Temed	12 µl
APS (10 %)	100 µl

Die Angaben für das Trenn- bzw. Sammelgel beziehen sich auf die für ein Gel benötigten Mengen.

3.6.2. Western-Blot-Verfahren

Die durch die durchgeführte Gelelektrophorese (Punkt 3.3.1) nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden im „semi-dry-blotting-Verfahren“ elektrophoretisch nach KYHSE-ANDERSEN (1984) auf Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membranen

transferiert. Dadurch wurde das den Proteinen angelagerte SDS wieder ausgewaschen und die Proteine konnten wieder renaturieren. Hierfür wurden zwischen Anode und Kathode der Blotkammer jeweils drei mit konzentriertem, drei mit nicht konzentriertem Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die in 100%igem Methanol getränkte PVDF-Membran und darauf das PAGE-Gel luftblasenfrei in „sandwich“-Form aufgeschichtet. Dem Gel wurden abschließend mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte mit konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (entspricht 90mA bei einem Gel) über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.

Konzentrierter Anodenpuffer:

Tris/HCl	300 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 10,4

Anodenpuffer:

Tris/HCl	30 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 10,4

Kathodenpuffer:

Tris/HCl	25 mmol/l
6-Aminohexansäure	40 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
	pH 9,4

3.6.3. Immunologischer Nachweis von p38 und p38-P MAP-Kinase

Da der Nachweis der p38 MAP-Kinase und ihrer phosphorylierten Form nur mit zwei verschiedenen Antikörpern möglich war, war es vonnöten, zwei gleich beladene Gele für einen Versuch laufen zu lassen. Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Blotmembran wurden zunächst die noch freien Bindungsstellen auf dieser geblockt. Diese Absättigung geschah mittels eines nicht für die Antikörper

erkennbaren Proteins, dem BSA (bovines Serumalbumin) in 2%iger Konzentration in 1x TBS für eine Stunde auf einem Schüttler.

10x TBS-Puffer:

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
	pH 7,4

Danach erfolgten eine zehnminütige Waschung mit TBS und die zweistündige Inkubation mit dem ersten Antikörper.

Antikörperlösung:

Tris/HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tween 20	0,05 % (vol/vol)
BSA	2 % (wt/vol)
	pH 7,4

Die Membran wurde danach mit TBS, welches mit 0,1% (vol/vol) Triton X-100 versetzt war, für zehn Minuten zur Entfernung ungebundener Antikörper gewaschen. Es folgte die zweistündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper zur Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe. Danach wurde eine letzte Waschung mit TBS, versetzt mit 0,5% (vol/vol) Triton X-100 durchgeführt und die Blotmembranen für weitere zehn Minuten in Alkalische Phosphatase-Puffer aquilibriert.

Alkalische Phosphatase-Puffer:

Tris/HCl	100 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
	pH 9,5

Durch Zugabe von Entwicklerlösung wurden die von dem ersten Antikörper detektierten Proteine sichtbar gemacht. Die Alkalische Phosphatase, die an dem zweiten Antikörper gekoppelt war, katalysierte die Dephosphorylierung des 5-Brom-

4-Chloro-3-Indolyl-Phosphats (BCIP) unter Reduktion des Nitro Blue Tetrazoliums (NBT). Hierdurch entstand ein schwerlösliches blauviolettes Präzipitat an den antigengebundenen Zweitantikörper. Die Entwicklerreaktion wurde durch aqua bidest. nach deutlicher Farbausprägung abgestoppt und die Membranen getrocknet.

Entwicklerlösung:

Alkalische Phosphatase-Puffer	50 ml
NBT	15 mg
BCIP	7 mg

Für den Nachweis von p38 MAP-Kinase und deren phosphorylierter Form wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der spezifische Erstantikörper gegen p38 MAP-Kinase war ein polyklonaler, in Kaninchen hergestellter Antikörper gegen ein synthetisiertes Peptid vom C-Terminus der Maus p38 MAP-Kinase, welches die Aminosäuren 343-360 mit N-terminal gebundenem Lysin beinhaltet. Dagegen war der für die aktivierte, also diphosphorylierte Form der p38 MAP-Kinase (p38-P) von monoklonalem Charakter. Dieser Antikörper Klon P38-TY wurde aus Mäusezellen gewonnen und erkannte spezifisch die Diphosphorylierung der Aminosäuren Threonin und Tyrosin der p38 MAP-Kinase (Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸²). Als Zweitantikörper fungierten jeweils Anti-IgG gegen das spezifische Wirtsserum des gewonnenen Antikörpers, also Anti-Kaninchen gegen p38 MAPK und Anti-Maus gegen p38-P-MAPK-Antikörper, jeweils konjugiert an Alkalischer Phosphatase. Alle Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung mit Antikörperlösung eingesetzt.

Antikörper:

Antikörperlösung	45 ml
Antikörper	45 µl

3.6.4. Immunologischer Nachweis von eNOS

Der immunologische Nachweis der endothelialen NO-Synthase erfolgte sinngemäß wie in Punkt 3.6.3 für die p38 MAP-Kinase beschrieben. Der spezifische Erstantikörper gegen eNOS war ein in Kaninchen hergestellter Antikörper gegen ein

synthetisiertes Peptid bovinen endothelialen Ursprungs. Dieses enthielt die Aminosäuren 1185-1205 mit N-terminal gebundenem Lysin. Der Zweitantikörper richtete sich wieder gegen IgG des Kaninchens und war derselbe, der unter Punkt 3.6.3 beschrieben wurde.

3.6.5. Immunologischer Nachweis von TGF β ₁

Zum immunologischen Nachweis von TGF β ₁ wurde ein monoklonaler IgG₁-Antikörper verwendet. Dieser Klon 9016.2 wurde aus Mäusezellen gewonnen, wogegen sich auch wieder der Zweitantikörper richtete.

3.6.6. Auswertung

Nach dem Trocknen wurden die Western-Blots über einen Scanner eingelesen und mittels des Computerprogramms „Image Quant“ bearbeitet. Die jeweilige Signalstärke wurde densitometrisch ermittelt. Zur Ermittlung der p38 MAPK-Phosphorylierung wurde die unphosphorylierte Form, bei der eNOS- und TGF β -Expression jeweils die Proteinbeladung in Form von Aktin oder den schweren Myosinketten (MHC) als direkter Bezug herangezogen.

Die Meßwerte wurden als Mittelwerte + der Standardabweichung (SD) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Ebenso wurde der Median ermittelt. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden mittels T-Test berechnet und das Signifikanzniveau ermittelt. Differenzen mit $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant.

3.7. Real-time PCR im iCycler®

3.7.1. Präparative RNA-Isolierung aus adulten Mäuseherzen

Vorbereitend auf die RNA-Isolation wurden tiefgefrorene (-80°C) Mäuseherzen in toto mit ca. 10ml flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser möglichst fein zerrieben. Das so aufbereitete Gewebe wurde in einen Glasmörser überführt und mit 3ml TRIzol®-Reagenz homogenisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde zu je 1ml in drei Eppendorfgefäße überführt, jeweils mit 100µl Chloroform versetzt und auf einem Schüttler durchmischt. Danach erfolgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g. Es wurden 450µl vom klaren Überstand abpipettiert. Diese obere Phase enthielt die RNA, während die untere DNA-haltig war. In der mittleren dünnen Schicht waren die Proteine gelöst. Die RNA-haltige Fraktion wurde mit 450µl Isopropanol versetzt und zum Fällen der RNA für 20 Minuten bei -20°C gelagert. Durch eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12.000 x g konnte die gefällte RNA nach Absaugen des Überstandes als Pellet gewonnen werden. Dieser wurde durch Resuspension in 300µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation wurde das Ethanol abpipettiert und das Pellet getrocknet. Es folgte eine Resuspension in 12µl sterilem aqua bidest. Um eine hohe Ausbeute an reiner RNA zu erhalten, war es nötig, alle Arbeitsschritte auf Eis und mit sterilen, UV-bestrahlten Eppendorfgefäßen durchzuführen. Ebenso maßgeblich war das Tragen von Handschuhen, um einer Kontaminationsgefahr der Proben vorzubeugen.

3.7.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Im Anschluß an die RNA-Isolation aus ganzen Mäuseherzen erfolgte die quantitative Bestimmung im Spectrophotometer Ultrospec®. Dazu wurden 3µl des RNA-Extraktes in 1ml aqua bidest. gelöst und bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm photometrisch gemessen. Das automatisch errechnete Verhältnis der beiden Extinktionswerte (ratio) lag im optimalen Fall einer möglichst reinen RNA-Suspension

zwischen 1,8 und 2,1. Der Ausdruck des Photometers gab somit den RNA-Gehalt in 3µl an. Zur weiteren cDNA-Synthese wurden jedoch 1µg RNA benötigt. Das hierfür benötigte Probenvolumen wurde über die Formel

$$3/\text{Konzentration der RNA} = 1\mu\text{g}/x\mu\text{l}$$

berechnet.

3.7.3. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription wurde mRNA als Matrize für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Hierfür wurde 1µg mRNA in aqua bidest. gelöst, bis ein Gesamtvolumen von 5µl pro Probenansatz erreicht war.

$$\text{berechnete Probenmenge mit } 1\mu\text{g mRNA} + \text{aqua bidest.} = 5\mu\text{l}$$

Diese Suspension wurde bei 60°C für 15 Minuten im Thermocycler denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 5µl Reaktionsmix zu jeder Probe pipettiert.

Reaktionsmix/Probe:

5x RT-Buffer	2 µl
Oligo dt	1 µl (0,1 mg/ml)
dNTP's	1 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
DTT	0,5 µl (0,1 mol/l)
RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
M-MLV-Reverse Transkriptase	0,3 µl (200 U/µl)

Die Reverse Transkription fand bei 37°C für eine Stunde im Thermocycler statt. Anschließend erfolgte eine Denaturierung der gebildeten cDNA bei 95°C für fünf Minuten. Danach wurden die Proben gleich weiterverwendet oder bei -20°C tiefgefroren.

3.7.4. Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time PCR)

3.7.4.1. Einführung in die Methode

Die real-time PCR oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der 1983 von KARY MULLIS bei der Cetus Corporation erfundenen PCR-Methode dar. Sie ist die zur Zeit modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Verfahren, bei denen eine Messung bzw. Bestimmung von Endprodukten im besten Falle semiquantitativ stattfindet, ist es durch die real-time PCR möglich, Fluoreszenzsignale während oder nach jedem Zyklus zu messen und damit auch Aussagen über die anfängliche DNA-Menge zu treffen. Diese Möglichkeit ergibt sich aus der gleichzeitigen Kombination des Reaktionsablaufs mit der Datenanalyse.

HIGUCHI und Mitarbeiter legten 1992 die Grundlage für die heutzutage angewandte real-time PCR, indem sie einen Thermocycler mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausstatteten und dem PCR-Ansatz direkt Ethidiumbromid zufügten, welches nach dem Einbau in doppelsträngige DNA durch Anregung mit UV-Licht fluoreszierte (HIGUCHI et al., 1992; HIGUCHI et al., 1993).

Die größten Vorteile dieser Methode liegen in ihrer hohen Sensitivität, Spezifität, Nachweisgeschwindigkeit und Reproduzierbarkeit, die eine absolute und korrekte Quantifizierung erlauben. Dazu tragen der Reaktionsablauf im geschlossenen Gefäß, der eine gewisse Kontaminationsfreiheit sichert, sowie der Wegfall von post-PCR processing in Form von Gelaufftrennung der Amplifikate bei. Aufgrund der gegebenen Technik ist auch ein hoher Probendurchsatz in kürzerer Zeit möglich.

Heutzutage finden andere interkalierende Farbstoffe anstelle von Ethidiumbromid Verwendung, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern.

In dieser Arbeit wurde SYBR[®] Green I, das in doppelsträngige DNA interkaliert, verwendet. Dieser Farbstoff war relativ unspezifisch und hatte den Vorteil der universellen Verwendbarkeit. Gleichzeitig war er preiswerter als andere Alternativen. In gelöster Form zeigte SYBR[®] Green I eine schwächere Signalstärke, die sich jedoch in gebundener Form drastisch erhöhte, da jedes DNA-Molekül in den so genannten „minor grooves“ (= kleine Furchen) mehrere Fluoreszenzmoleküle einbaute. Diese Bindung verstärkte die emittierte Fluoreszenz bei gleicher

Anregungsintensität um ein Vielfaches und war direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge. Die Extinktion betrug bei diesem Farbstoff 490nm und die Emission 530nm.

Ebenso wie bei den Farbstoffen hat sich bei den verwendeten Geräten die technische Ausstattung geändert, während das Prinzip der PCR-Methode nach HIGUCHI und Mitarbeiter beibehalten wurde. Der verwendete iCycler® der Firma Bio-Rad war mit einer ventilatorgekühlten 50W Wolfram-Halogen-Lampe sowie mit verschiedenen Anregungs- und Emissionsfiltern und einer CCD-Kamera ausgestattet. Die Quantifizierung der PCR basierte auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem Threshold cycle oder auch C_T -Wert genannt. Zu Beginn der Reaktion wurde nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Farbstofffluoreszenz aufgrund der geringen Template-Konzentration während der ersten Zyklen nicht detektierbar war. Als C_T -Wert galt jener PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Farbstoffs die des Hintergrunds signifikant überstieg.

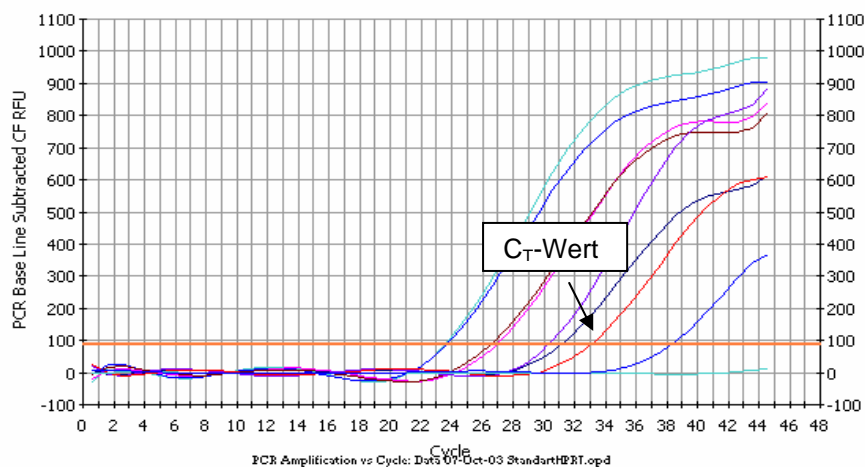
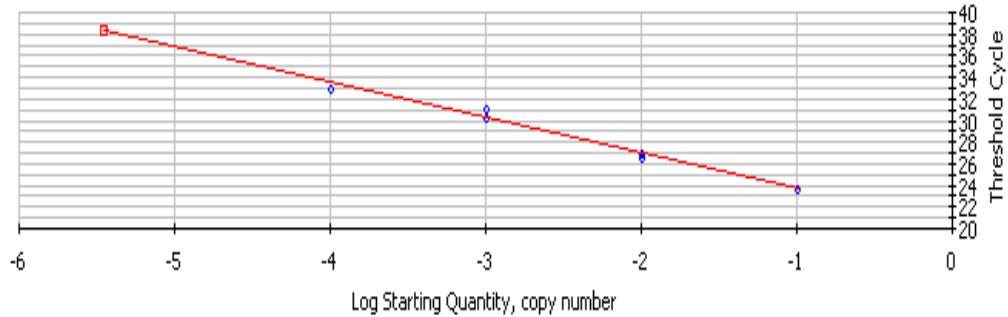


Abb. 4: Beispiel für den Verlauf von real-time PCR (Threshold cycle).

Die Quantifizierung der DNA-Menge beruhte nicht auf der absoluten Menge an PCR-Produkten, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Als Richtlinie galt der C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell war und es in dieser Phase keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition durch bestimmte Produkte gab. Durch Vergleich mit einer erstellten Standardkurve, bei der bekannte Template-Mengen amplifiziert wurden, konnte man aus einem C_T -Wert auf eine Template-Konzentration schließen.

Correlation Coefficient: 0,993 Slope: -3,288 Intercept: 20,387 $Y = -3,288 X + 20,387$
 PCR Efficiency: 101,4 %



PCR Standard Curve: Data 07-Oct-03 StandartHPRT.opd

Abb. 5: Beispiel einer Standardkurve (HPRT-Primer).

Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I wurde unspezifisch in die PCR-Reaktion eingebaut, da ihm eine Spezifität an die zu amplifizierende Ziel-DNA fehlte. Somit war es nicht möglich, zwischen Produkt und Artefakt (z.B. Primer-Dimere) zu unterscheiden, welche auch einen Fluoreszenzanstieg hätten verursachen können. Eine solche Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren war im Anschluß an die PCR-Reaktion mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei kam es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperatur konnte man zwischen Produkt und Artefakt unterscheiden, da Primer-Dimere bei geringeren Temperaturen schmolzen als die spezifischen größeren PCR-Produkte.

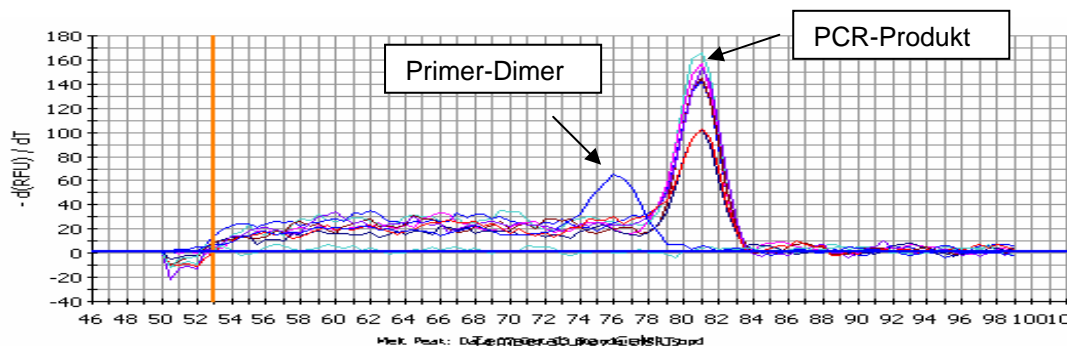


Abb. 6: Beispiel einer Schmelzkurve. Es ist deutlich die Kurve des Primer-Dimers zu erkennen, die bei einer niedrigeren Temperatur liegt, als die spezifischen Produkte.

3.7.4.2. Durchführung der Methode

Die durch die in Punkt 3.7.3 beschriebene Reverse Transkription hergestellte cDNA diente nun als Template für die PCR-Primer. Sie wurde für die Untersuchung 1:10 mit aqua bidest. verdünnt. Um auf einen Standard Bezug nehmen zu können, wurde HPRT als Housekeeping-Gen gewählt, da es keinerlei Regulierung auf die Induktion zeigte.

3.7.4.2.1. Primerauswahl

Es waren verschiedene Faktoren zur Primerauswahl notwendig. Zum einen mußte überprüft werden, ob die Primersequenz komplementär zu dem Genom des Versuchstieres (Ratte) war. Dies wurde über das Internetprogramm BLAST verglichen. Zum anderen sollte das entstehende Produkt nicht größer als 200bp sein. Des Weiteren sollten die eingesetzten Primer eine Länge zwischen 18 bis 30 Basen und einen G/C-Gehalt von 20-80% haben, sowie eine Schmelztemperatur von ca. 60°C besitzen.

Primer:

HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	(fw-Primer)
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	(rev-Primer)
TGFβ ₁	AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA	(fw-Primer)
	GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT	(rev-Primer)
TNFα	CCG ATG GGT TGT ACC TTG TC	(fw-Primer)
	GGG CTG GGT AGA GAA TGG AT	(rev-Primer)

Die Fragmentgröße des Primers für TGFβ₁ lag bei 315 Basenpaaren; dazu wurde der Bereich zwischen den Basen 818-1111 amplifiziert (QIAN et al., 1990). Die

Größe des HPRT-Primers umfasste 131 Basenpaare und die des TNF α -Primers 456 Basenpaare.

3.7.4.2.2. Real-time PCR-Ansatz

Um Pipettierfehler und Kontaminationsgefahren zu vermeiden und den Arbeitsaufwand gering zu halten wurde bei der real-time PCR ein Supermix der Firma Bio-Rad verwendet, welcher bereits alle wichtigen Ingredienzien in der richtigen Konzentration enthielt.

PCR-Reaktionsansatz/Probe:

iQ™ SYBR® Green Supermix	25 μ l
fw-Primer	0,3 μ l (100 μ mol/l)
rev-Primer	0,3 μ l (100 μ mol/l)
aqua bidest.	6,4 μ l
DNA-Template (1:10)	<u>3 μl</u>
	Σ 20 μ l/Probe

Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Laufkontrolle galt der Ansatzmix ohne Template. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad bei 0° bis 4°C.

3.7.4.2.3. PCR-Laufprogramme

Die DNA-Synthese erfolgte im Wesentlichen in drei Schritten. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden und einem Syntheseschritt, während dessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mit Hilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wurde. Während jedes PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-

Abschnitte verdoppeln. Theoretisch würde somit die Menge der Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen.

Es erfolgte eine Programmierung des iCyclers[®], bei der die verschiedenen Schritte der PCR mit den unterschiedlichen Temperaturen festgelegt wurden.

Zyklus 1: (1x)

Step 1:	95°C	für 3,0 min
---------	------	-------------

Zyklus 2: (45x)

Step 1: (Denaturierung)	95°C	für 30 sek
-------------------------	------	------------

Step 2: (Annealing)	63°C	für 30 sek
---------------------	------	------------

Step 3: (Amplifikation)	72°C	für 30 sek
-------------------------	------	------------

Zyklus 3: (100x)

Step 1:	50°C	für 10 sek
---------	------	------------

Nach Zyklus 2 Temperatursteigerung in 0,5°C-Schritten bis 100°C

Die unterschiedlichen Primer benötigten jeweils eine spezifische Annealingtemperatur, die es bei der Programmierung zu berücksichtigen galt.

Annealingtemperaturen:

HPRT	63°C
------	------

TGFβ ₁	53°C
-------------------	------

TNFα	63°C
------	------

Die Zyklenzahl zur Amplifikation veränderte sich bei der real-time PCR nicht spezifisch für die Primer, da die Reaktion mit einer Schmelzkurve endete, in der eventuelle Primer-Dimere etc. anhand der Schmelztemperatur identifiziert werden konnten.

3.7.4.2.4. Real-time PCR-Auswertung

Die Auswertung fand über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (PFAFFL et al., 2000) statt. Diese kalkulierte die relative Expression eines Gens im Vergleich zu einem Referenz-Gen, dem Housekeeping-Gen HPRT. Da von jeder Probe in jedem PCR-Lauf eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, wurden jeweils die Mittelwerte der C_T -Werte bestimmt. Anschließend wurde der ΔC_T -Wert aus der Differenz zwischen der Probe und dem Standard berechnet.

$$\Delta C_T\text{-Wert} = C_T\text{-Wert (Gen)} - C_T\text{-Wert (Standard)}$$

Bei den Untersuchungen wurden jeweils Kontrollgruppen (WT-Mäuse, unbehandelte Kulturen) berücksichtigt. Von deren ΔC_T -Werten wurden die der Untersuchungsgruppe subtrahiert.

$$\Delta\Delta C_T = \text{Mittelwert } \Delta C_T(\text{C}) - \text{Mittelwert } \Delta C_T(\text{Gen})$$

Zur Berechnung der relativen Expression wurden die Ergebnisse in die Formel

$$\text{relative Expression} = 2^{-[\Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{C})]}$$

eingesetzt.

3.8. TNF α -Bestimmung

3.8.1. TNF α -Bioassay

Die Untersuchungen der TNF α -Aktivität wurden in Kooperation mit dem Institut für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Professor Dr. Joachim Roth durchgeführt.

Das Prinzip, das dem TNF α -Bioassay zugrunde liegt, ist der zytotoxische Effekt von TNF α auf bestimmte Zelltypen. In dem Bioassay kommt die Zelllinie WEHI (**W**alter

and Elizabeth Hall Institute) zum Einsatz. Diese reagiert schon auf geringste Mengen an biologisch aktivem TNF α sehr sensibel (GEARING et al. 1994). Je nach der in der Probe vorhandenen Menge an TNF α wird im Testansatz eine bestimmte Anzahl an Zellen getötet. Nach einer gewissen Inkubationszeit (24 Stunden) wird dem Testansatz der gelbe Farbstoff 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) hinzugegeben. Dieser Farbstoff wird in den Mitochondrien der nicht von TNF α abgetöteten Zellen durch Succinyl-Dehydrogenasen zu einem blauen Farbstoff (MTT-Formazan-Kristalle) umgewandelt (weitere Inkubation für 4 Stunden; IBELGAUFTS 1995, MOSMANN 1983).

Durch diese Farbreaktion kann anschließend die optische Dichte in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte photometrisch bestimmt werden. Aus verschiedenen Verdünnungsreihen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die anhand einer Standardreihe quantifiziert werden kann.

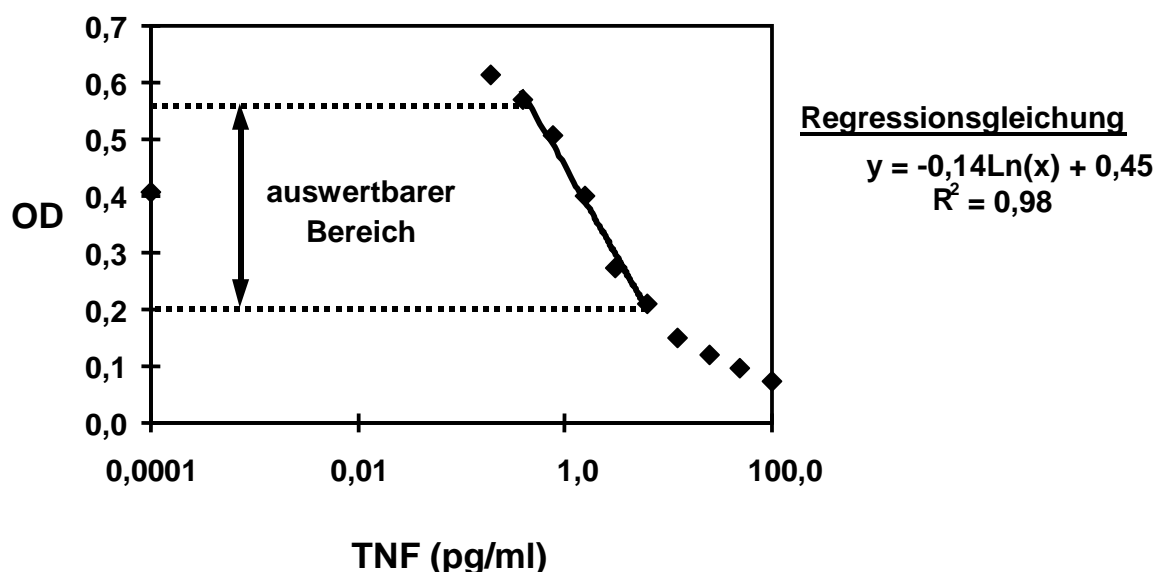


Abb. 7: Beispielhafte Eichkurve für das TNF α -Bioassay mit Angabe des auswertbaren Bereiches. Nur Ergebnisse, die innerhalb des Bereiches lagen, wurden erfaßt.

Durch die Verwendung internationaler Standards ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Labors möglich (MEAGER und GAINES-DAS 1994). Je geringer die TNF α -Aktivität in der Probe war, desto mehr Zellen überlebten und konnten in ihren Mitochondrien MTT Tetrazolium zu MTT Formazan-Kristallen verstoffwechseln, und desto mehr Farbstoff befand sich daher nach dem Auflösen der Kristalle in der

Vertiefung. Die Probe hatte dadurch eine größere optische Dichte. Bei hoher TNF α -Aktivität ist dieses Verhältnis aufgrund der Zytotoxizität von TNF α genau umgekehrt. Abbildung 7 zeigt eine beispielhafte Eichkurve eines Bioassays.

3.8.2. Proteinbestimmung

3.8.2.1. Probenvorbereitung

Die Inkubation der Zellen erfolgte nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll. Zur Proteinfällung auf der Schale vom Falcon Typ 3001 wurde das Kulturmedium abgesaugt und mit 1ml 1x PBS (s. Punkt 3.6) gewaschen. Danach wurden die Schalen mit 1ml 10%iger Trichloressigsäure (TCA) zur Erreichung einer Proteinfällung versetzt und über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am folgendem Tag wurde der Überstand verworfen und die Zellen erneut vorsichtig mit 1ml 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurden 1ml 1N NaOH, versetzt mit 0,01% SDS, zur Aufhebung der Proteinfällung zu den Schalen gegeben und bis zu ihrer Lyse für eine weitere Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde das Zelllysate in Reaktionsgefäße nach Eppendorf überführt.

3.8.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes (BRADFORD, 1976)

Die Bestimmung Gesamtproteinmenge erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Dieser Farbstoff bindet sich an die Proteine und verschiebt somit das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm. Dafür wurden 10 μ l des Zelllysats (s. 1.8.2.1) mit 200 μ l Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte vermengt und die Extinktion bei 595nm per Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes diente BSA, welches in 1N NaOH, versetzt mit 0,01% (wt/vol) SDS, gelöst wurde, als Standard in folgenden Konzentrationen:

0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; und 1,0 mg/ml.

Bradford-Reagenz: (vor Gebrauch filtrieren)

Coomassie Brillant Blue G-250	0,1% (wt/vol)
Methanol, 96%ig	5% (vol/vol)
ortho-Phosphorsäure, 85%ig	10% (vol/vol)
aqua bidest.	ad 1 l

3.9. Statistik

Die Meßwerte wurden als Mittelwerte + der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) unter Nutzung des Student–Newmann–Keuls–Testes durchgeführt und das Signifikanzniveau ermittelt (GODFREY et al., 1985; SAS/STAT., 1992). Differenzen mit $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant.

4. ERGEBNISSE

4.1. Nachweis der eNOS-Expression in Rattenkardiomyozyten

NO wird durch endogene NO-Synthasen gebildet, wovon die endotheliale NO-Synthase (eNOS) den Hauptanteil bestimmt. Aufbauend für die folgenden Versuche wurde als erstes die eNOS-Expression ermittelt. Dafür wurden die isolierten Kulturen der jeweiligen Zelltypen der Ratte (mikrovaskuläre koronare Endothelzellen, ventrikuläre Kardiomyozyten) herangezogen und die eNOS-Expression mittels Western-Blot quantifiziert.

Als Beladungskontrolle und Normierung wurde das Protein Aktin herangezogen. Die Expression von eNOS und Aktin wurde densitometrisch quantifiziert und die Ergebnisse im Verhältnis zueinander gestellt.

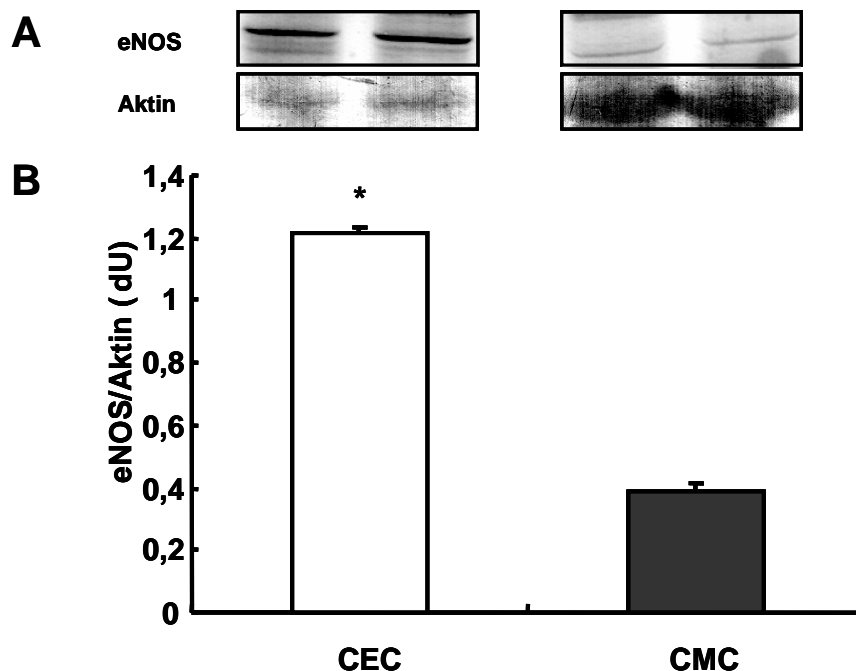


Abb. 8: eNOS-Expression in mikrovaskulären koronaren Endothelzellen (CEC) und ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte (CMC) normiert auf Aktin als Beladungskontrolle.

A: Repräsentative Western-Blots von eNOS und Aktin in den jeweiligen Zellkulturen.

B: Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus n=4. Bei Signifikanz (*) gilt $p < 0,05$ versus CMC.

Die Ergebnisse zeigten eine dreifach höhere eNOS-Expression in Endothelzellen der Ratte als in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte (Abb. 8).

4.1.1. Einfluß der Hemmung der endogenen NO-Produktion auf die p38 MAPK der Ratte

In den folgenden Versuchen wurde der Zusammenhang zwischen endogen gebildetem NO und der Aktivierung der p38 MAPK näher untersucht. L-Nitro-Arginin (L-NA), ein schlecht metabolisierbares Analogon der Aminosäure Arginin, ist ein irreversibler und unspezifischer Inhibitor der konstitutiven NO-Synthasen (eNOS, nNOS) und wurde in einer Konzentration von 100µmol/l zur Induktion eingesetzt.

4.1.2. Zeitabhängige Induktion mit L-NA in Kardiomyozyten der Ratte

Zellkulturen von isolierten Kardiomyozyten der Ratte wurden mit L-NA für 15, 30 und 45 Minuten inkubiert und nach dem Protokoll, in Punkt 3.5 beschrieben, geerntet. Die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase wurde densitometrisch durch das Verhältnis der phosphorylierten zur nicht-phosphorylierten MAP-Kinase mittels Western-Blot bestimmt.

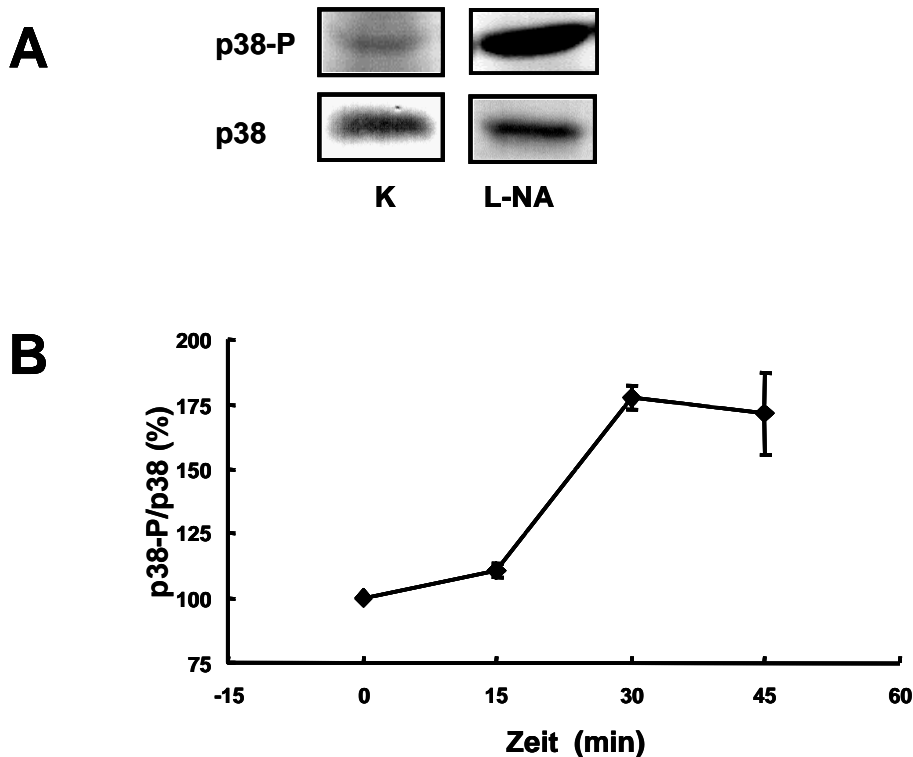


Abb. 9: Zeitkinetik des Effektes von L-NA auf die p38-Phosphorylierung in Kardiomyozyten der Ratte.

- A:** Repräsentative Banden von phosphorylierter p38 MAP-Kinase (p38-P) und nicht-phosphorylierter p38 MAP-Kinase (p38).
- B:** Inkubation der Kardiomyozyten für max. 45 min mit L-NA (100 μ mol/l). Darstellung der p38-Phosphorylierung durch das Verhältnis zwischen phosphorylierter p38 und nicht-phosphorylierter p38 MAP-Kinase in %. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 aufgeführt.

Es zeigte sich ein Maximum der p38-Phosphorylierung nach 30 minütiger Inkubation mit L-NA um $71,4 \pm 15,8\%$, welches in der Abhängigkeit von der Zeit zu beobachten war (Abb. 9).

4.1.3. Vergleich des Einflusses der Inhibition durch L-NA in Endothel- und Herzmuskelzellen der Ratte

In den isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen (CMC) und den mikrovaskulären Endothelzellen (CEC) der Ratte wurde die endogene NO-Bildung durch L-Nitro-Arginin (L-NA) gehemmt. Dazu wurden die Zellkulturen mit 100 μ mol/l L-NA inkubiert, nach 45 Minuten geerntet und die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase bestimmt.

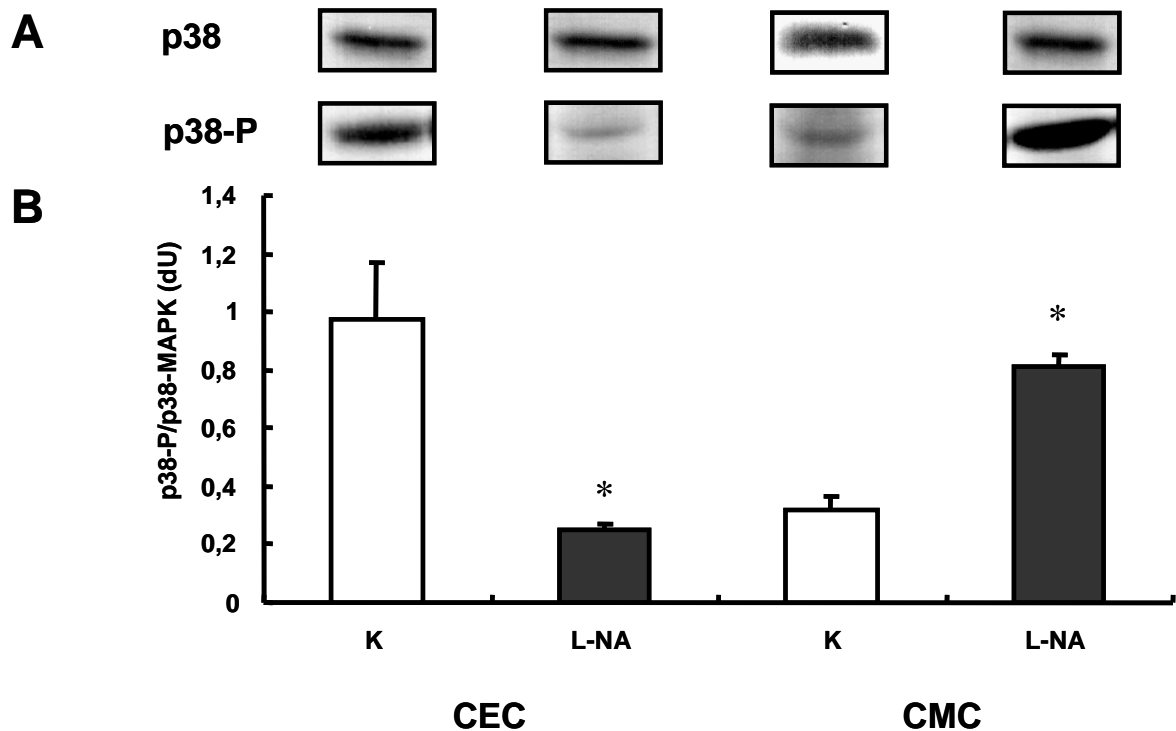


Abb. 10: Darstellung der p38 MAPK-Phosphorylierung der kardiovaskulären Endothelzellen (CEC) und Rattenkardiomyozyten (CMC) unter L-NA Induktion (100 μ mol/l) anhand des Verhältnisses von p38-P/p38 MAPK.

A: Repräsentative Western-Blots von p38 und p38-P der jeweiligen Zellkultur.

B: Es sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus n=5 dargestellt. Bei Signifikanzen (*) gilt $p < 0,05$ versus Kontrolle. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen der gleichen Präparation, welche nach demselben Versuchsprotokoll geerntet wurden.

Endothelzellen, mit einer relativ hohen eNOS-Expression (Abb. 8), zeigten in den Kontrollen eine hohe p38-Phosphorylierung. Unter Einfluß von L-NA sank diese jedoch bei den Endothelzellen um ca. 80%.

Die Kardiomyozyten zeigten in den Kontrollen eine vergleichsweise geringe Phosphorylierung bei einer niedrigen eNOS-Expression, welche jedoch unter L-NA um 50% gesteigert wurde (Abb. 10).

4.2. Einfluß von hochdosiertem NO auf die p38 MAPK in adulten Herzmuskelzellen der Ratte

4.2.1. Einfluß von SNAP und Spermin-NONO

Um die Wirkung von hochkonzentriertem NO auf die p38-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten mit den NO-Donoren S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP, 1µmol/l) und Spermin-NONOat (Spermin-NONO, 100nmol/l) durchgeführt und Kontrollen mit N-acetyl-D,L-penicillamin (NAP, 1µmol/l), einem Analogon von SNAP, welcher jedoch kein NO abspaltet, durchgeführt.

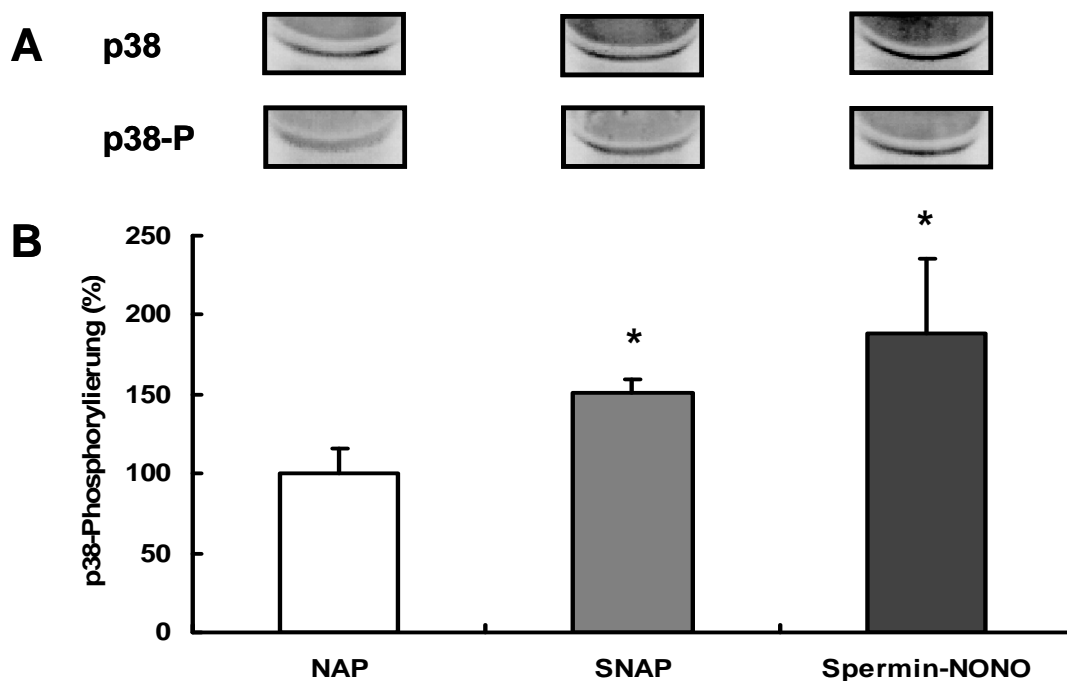


Abb. 11: Induktion mit hochpotenten NO-Donoren SNAP (1µmol/l) und Spermin-NONO (100nmol/l) sowie dem nichtreaktiven SNAP-Analogon NAP (1µmol/l) als Kontrolle.

A: Repräsentative Western-Blots von p38 und p38-P.

B: Darstellung der p38-Phosphorylierung in Kardiomyozyten der Ratte in % anhand des Verhältnisses p38-P/p38 durch Mittelwerte + Standardabweichung aus n=4. Bei Signifikanz (*) gilt $p < 0,05$ versus NAP (Kontrolle).

Durch die Induktion mit SNAP konnte eine 50%ige Phosphorylierungszunahme der p38 MAP-Kinase gegenüber der Kontrolle (NAP) beobachtet werden. Mit Spermin-NONO wurde diese um 90% erhöht (Abb. 11).

4.2.2. Interaktion mit Angiotensin II

Radikale sind ein Stimulator der p38 MAPK-Phosphorylierung. Als Positivkontrolle wurde die Wirkung von Angiotensin II (100nmol/l), welches über AT₁-Rezeptoren via NAD(P)H-Oxidase und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die p38 MAPK-Phosphorylierung induziert, untersucht. Im Folgenden wurde zusätzlich der Einfluß des NO-Donors SNAP (1µmol/l) auf die p38 MAPK-Phosphorylierung beobachtet.

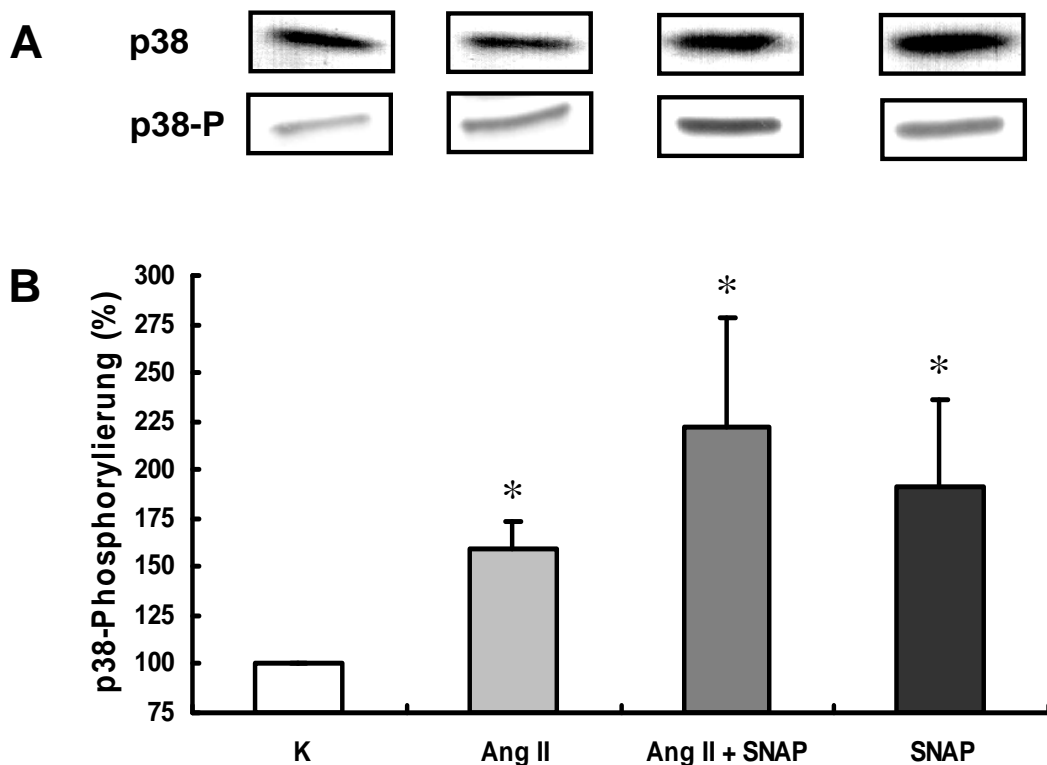


Abb. 12: Einfluß von unterschiedlichen Radikalen induziert durch Ang II (100nmol/l, ROS) und SNAP (1µmol/l, NO) auf die p38-Phosphorylierung.

A: Repräsentative Western-Blots von p38 und p38-P.

B: Darstellung der p38-Phosphorylierung in Kardiomyozyten der Ratte in % anhand des Verhältnis p38-P/p38 durch Mittelwerte + Standardabweichung aus n=5. Bei Signifikanz (*) gilt $p < 0,05$ versus Kontrolle. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen gleicher Präparation.

Durch Angiotensin II konnte eine Steigerung der Phosphorylierung um über 50%, durch SNAP eine um ca. 75% erreicht werden. Bei der Kombination beider Induktoren wurde ein Trend zur weiteren Steigerung ersichtlich, jedoch keine Addition beider Einzelresultate erreicht (Abb. 12).

4.3. Einfluß einer Aktivierung des cGMP-Signalweges auf die L-NA induzierte p38 MAPK-Phosphorylierung

Zyklisches GMP (cGMP) ist ein intrazellulärer Mediator von NO. Die bisherigen Experimente legen nahe, daß die basale endogene NO-Produktion ventrikulärer Herzmuskelzellen eine konstitutive p38 MAPK-Phosphorylierung unterdrückt. Um nun zu untersuchen, ob dies cGMP-abhängig erfolgt, wurden Kardiomyozyten der Ratte mit 100µmol/l 8-bromo-cGMP (8-br-cGMP), einem synthetischem cGMP-Analogon und Proteinkinase G-Stimulator oder 30µmol/l YC-1, einem NO-unabhängigen Stimulator der löslichen Guanylatzyklase jeweils in Verbindung mit L-NA induziert. Die Zellen wurden nach 45 Minuten geerntet.

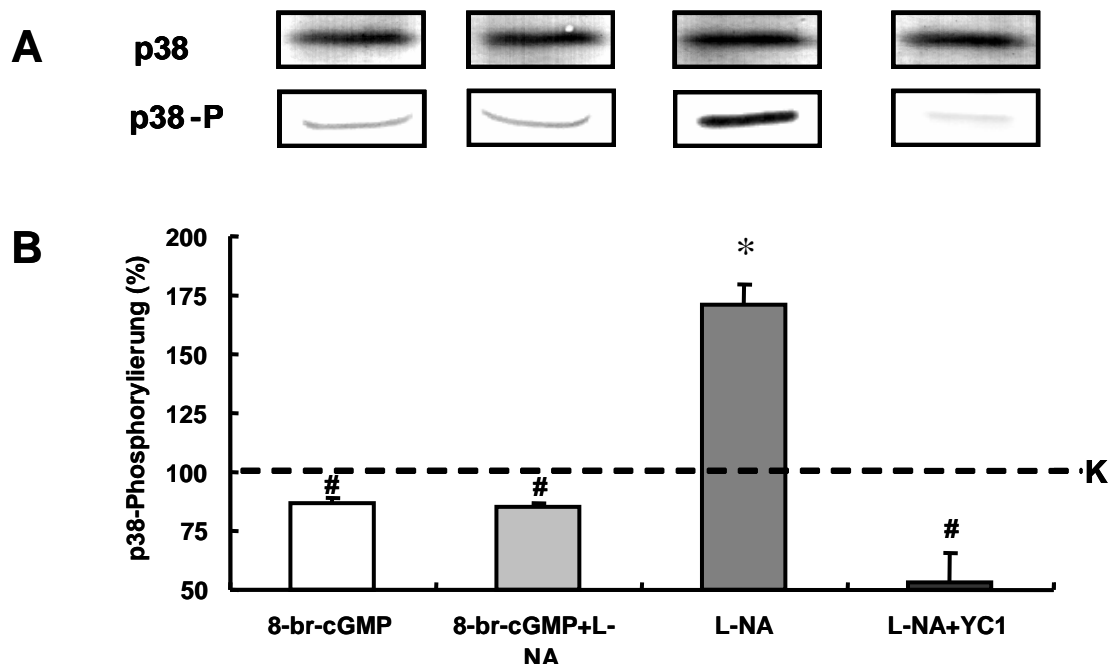


Abb. 13: Darstellung der p38-Phosphorylierung nach Induktion mit cGMP-Stimulatoren 8-br-cGMP (100µmol/l) und YC-1 (30µmol/l) in Verbindung mit eNOS-Inhibitor L-NA (100µmol/l).

A: Repräsentative Western-Blots von p38 und p38-P.

B: Es ist die p38-Phosphorylierung in % aus dem Verhältnis p38-P/p38 dargestellt. Die Werte zeigen die Mittelwerte + der Standardabweichung bei einer Signifikanz (*) von $p < 0,05$ versus Kontrolle (K), sowie (#) von $p < 0,05$ versus L-NA aus $n=4$. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen, welche hier nicht direkt aufgeführt, sondern nur durch den Strich bei 100% repräsentiert werden.

Nach Aktivierung der Guanylatzyklase durch die zwei Stimulatoren 8-br-cGMP und YC-1 wurde die durch L-NA induzierte p38-Phosphorylierung unter Kontrollniveau

verringert. Die stärkste Hemmung wurde mit YC-1, fast annähernd 50% unter den Kontrollwerten, erreicht (Abb. 13).

4.4. Einfluß einer Hemmung der löslichen Guanylatzyklase auf die p38 MAPK-Aktivierung

Um den Einfluß der endogenen NO-Bildung auf die Guanylatzyklase zu bestätigen, wurden Versuche mit 10µmol/l Oxadiazoloquinoxalin (ODQ) durchgeführt. ODQ ist ein potenter, reversibler und selektiver Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase. Die Zellernte erfolgte nach 45 Minuten.

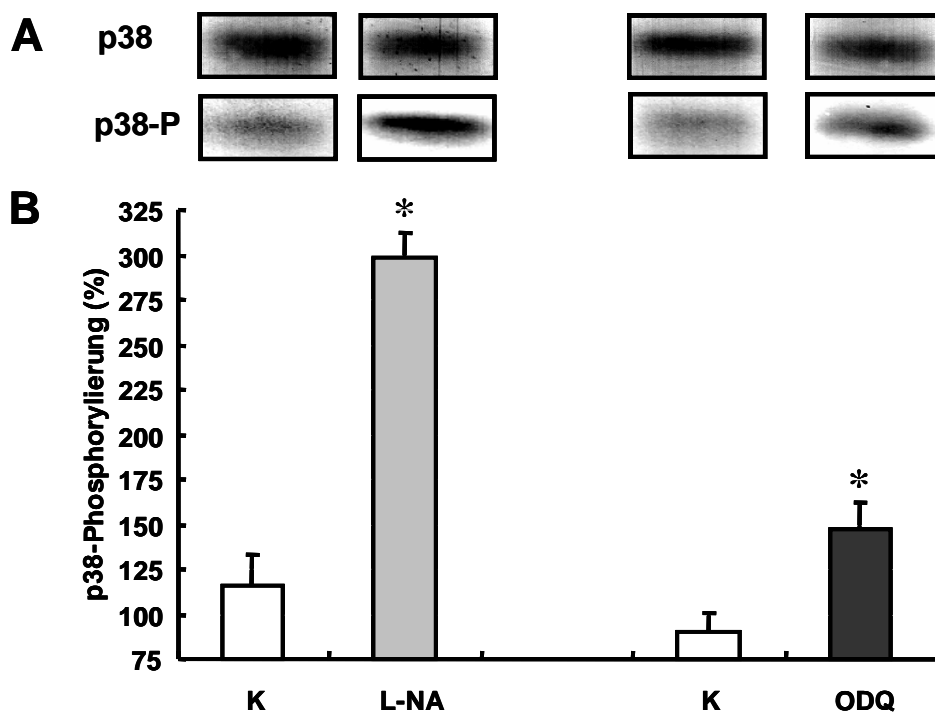


Abb. 14: Gegenüberstellung der p38-Phosphorylierung unter Induktion mit eNOS-Inhibitor L-NA (100µmol/l) und cGMP-Inhibitor ODQ (10µmol/l).

A: Repräsentative Western-Blots von p38 und p38-P.

B: Es ist das Verhältnis von p38-P/p38 in % durch Mittelwerte + Standardabweichung aus n=4 bei Signifikanz (*) $p < 0,05$ versus Kontrolle dargestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen gleicher Präparation.

Nach Inhibition der Guanylatzyklase durch ODQ wurde erneut eine 50% gesteigerte Phosphorylierung der p38 MAPK gemessen (Abb. 14).

4.5. Einfluß von L-NA auf die Zytokinbildung

Zytokine sind hormonähnliche Signalstoffe, die von Zellen zur Steuerung der Zellkooperation sezerniert werden. Hierunter fallen verschiedene Mediatoren, wovon in dieser Arbeit das Augenmerk auf Transforming growth factor β_1 (TGF β), dessen funktionelle Wirkung bei Ratten auf die Hypertrophie nachgewiesen wurde, sowie auf Tumor necrosis factor α (TNF α) gerichtet war. Zytokine werden auf p38 MAPK-abhängiger Weise distal der p38-Phosphorylierung in ihrer Expression reguliert.

4.5.1. TNF α -Freisetzung

In Abbildung 10 wurde gezeigt, daß eine Hemmung der endogenen NO-Synthese durch L-NA eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK bewirkt. Jetzt wurden nach Induktion mit 100 μ mol/l L-NA über 24 Stunden die Expression von freigesetztem aktiven TNF α im Zellkulturüberstand mittels eines Aktivitätstests bestimmt.

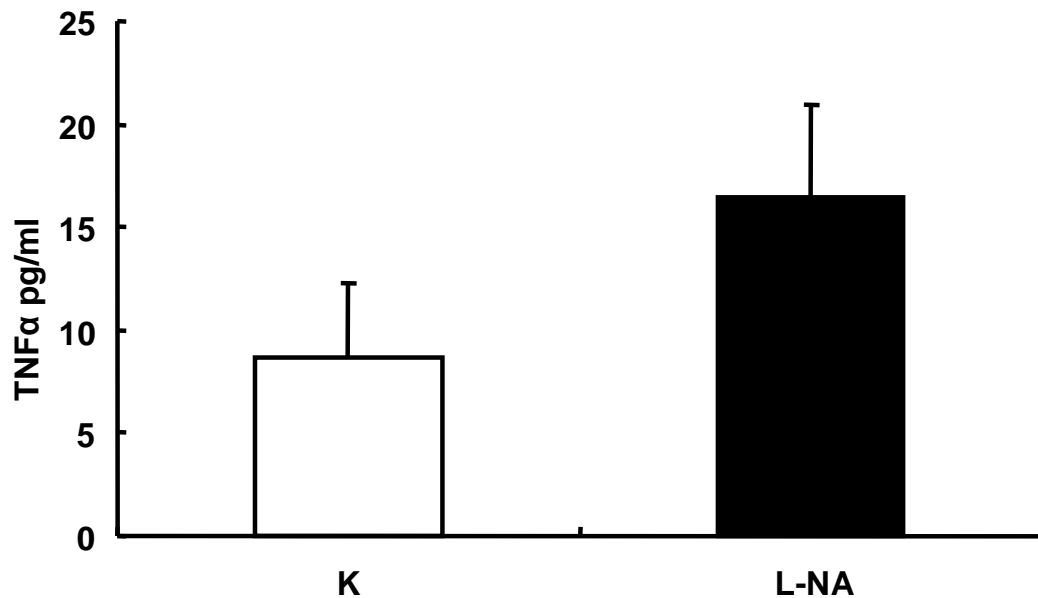


Abb. 15: TNF α -Freisetzung in Kardiomyozyten der Ratte nach L-NA Induktion (100 μ mol/l) über 24 Stunden. Darstellung der Mittelwerte + Standardabweichung, nicht signifikant bei n=8. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen gleicher Präparation.

Im Zellkulturüberstand war nach 24 Stunden fast eine Verdoppelung der TNF α -Aktivität im Vergleich zu den Kontrollproben zu sehen (Abb. 15), die aber aufgrund der starken Streuung kein Signifikanzniveau erreichte.

4.5.2. TGF β -Expression in Kardiomyozyten der Ratte

Die TGF β -Expression wird durch phosphorylierte p38 MAP-Kinase stimuliert. Es galt den Zusammenhang durch Hemmung der p38-Phosphorylierung mittels L-NA zu untersuchen. Dies geschah auf Protein-Ebene mittels Western-Blot-Verfahren und auf Gen-Ebene mittels real-time PCR, bezogen auf das Housekeeping-Gen HPRT. Kardiomyozyten der Ratte wurden mit L-NA (100 μ mol/l) für 24 Stunden inkubiert, geerntet und nach Protokoll 3.7.4.1 die real-time PCR durchgeführt.

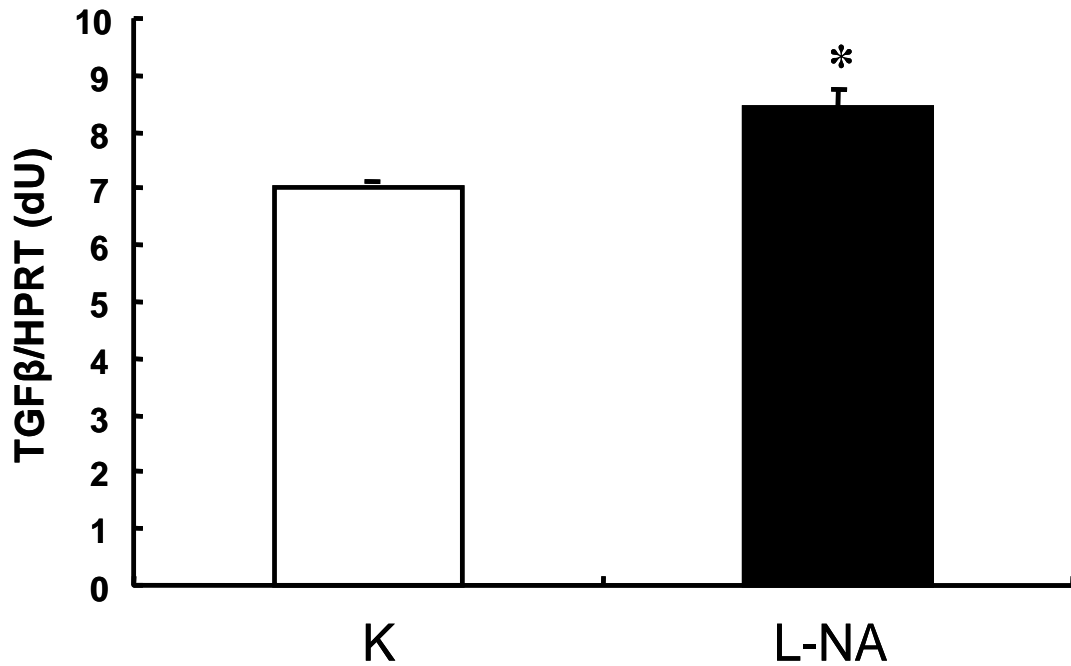


Abb. 16: TGFβ-Expression in Kardiomyozyten der Ratte nach L-NA Induktion (100µmol/l) über 24 Stunden gemessen mittels real-time PCR und Bezug nehmend auf das Housekeeping-Gen HPRT. Darstellung der Mittelwerte + Standardabweichung, bei Signifikanz (*) $p < 0,05$ versus Kontrolle bei $n=4$. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen gleicher Präparation.

Nach erfolgter Hemmung der p38-Phosphorylierung durch L-NA im proximalen Signalweg konnte nur eine Steigerung der TGFβ-Expression gegenüber den Kontrollen quantifiziert werden (Abb. 16). Die Ergebnisse zur Steigerung der TGFβ mRNA-Expression wurden auf Proteinebene verifiziert (Abb. 17). Wieder zeigte sich ein erhöhter Gehalt an TGFβ, auch wenn das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht ganz erreicht wurde.

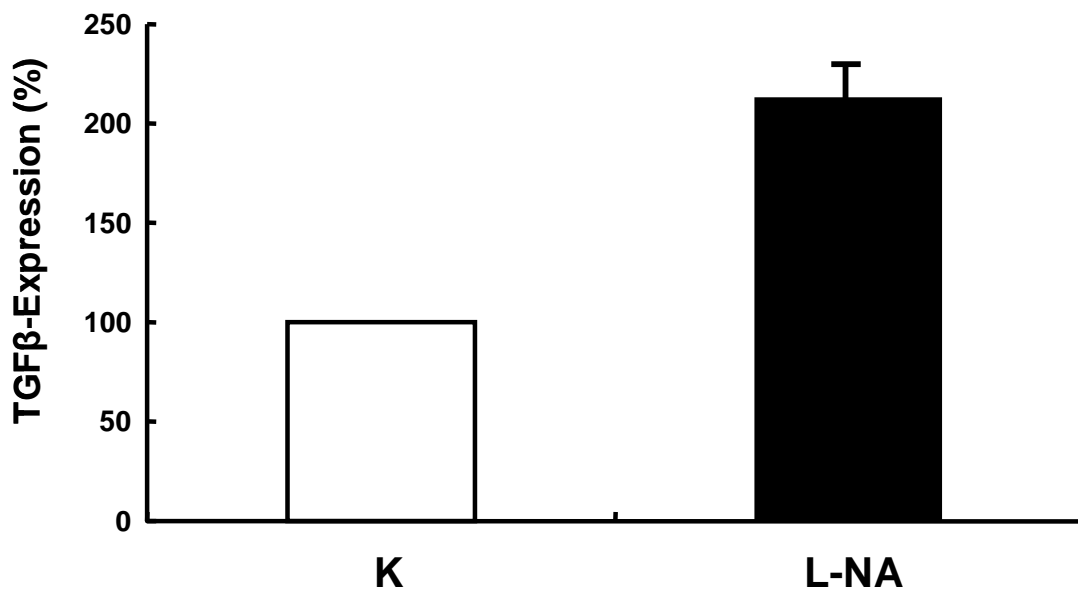


Abb. 17: Quantifizierung der TGFβ-Expression in Kardiomyozyten der Ratte nach L-NA Induktion (100μmol/l) über 24 Stunden mittels Western-Blot. Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes bei n=5 ohne Signifikanz aufgrund zu starker Streuung. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen gleicher Präparation.

4.6. Einfluß von eNOS-Defizienz auf die p38 MAPK Phosphorylierung in adulten Herzmuskelzellen der Maus

4.6.1. Basalphosphorylierung

Zur Messung der basalen p38-Phosphorylierung durch die konstitutive eNOS der transgenetisch veränderten eNOS-defizienten Mäuse und deren Wildtypen, wurden isolierte Kardiomyozyten (s. 3.2.3) ausplattiert und nach 45 Minuten geerntet.

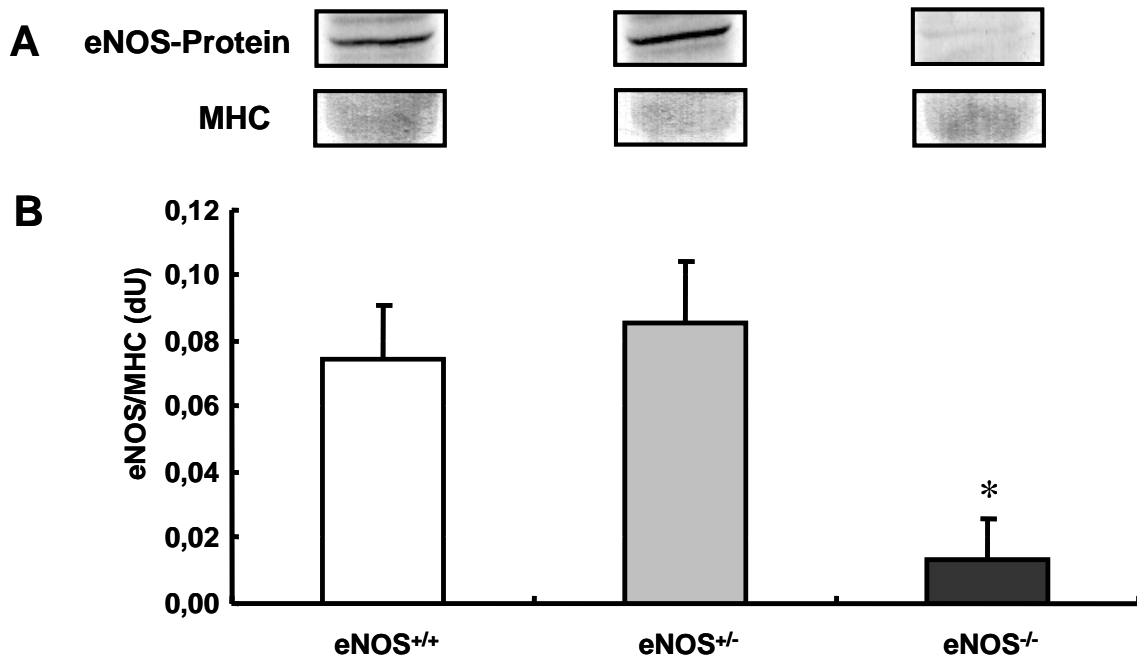


Abb. 18: Darstellung der eNOS-Expression in Kardiomyozyten der Wildtyp-Maus (eNOS^{+/+}), heterozygoten (eNOS^{+/-}) und eNOS-defizienten Maus (eNOS^{-/-}).

A: Repräsentative Western-Blots zeigen eNOS-Protein und schwere Myosinketten (MHC), welche densitometrisch miteinander verglichen wurden.

B: Quantitative Auswertung der eNOS-Expression normiert auf MHC. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung mit Signifikanz (*) = $p < 0,05$ versus Wildtyp (^{+/+}) bei $n=3$.

Die Spezifität des verwendeten Antikörpers konnte auch in Versuchen gezeigt werden, in denen vergleichend zu den Kardiomyozyten der Ratte (Abb. 8) die eNOS-Expression in Kardiomyozyten von eNOS-defizienten Mäusen untersucht wurde. Die Mäuse wurden durch Schwanzbiopsie charakterisiert und als Wildtyp (^{+/+}), heterozygot exprimierende Mäuse (^{+/-}) oder eNOS-defiziente Mäuse (^{-/-}) bezeichnet (s. 3.2.2.3). In den isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen der Wildtypen (^{+/+}) und heterozygoten Mäuse (^{+/-}) fanden sich annähernd die gleiche eNOS-Expression. In den Proben der homozygoten „knock-out“ Mäuse (^{-/-}) fand sich dagegen nur eine marginale Bande von geringer Expression (Abb. 18).

4.6.2. Einfluß von L-NA auf die p38 MAPK-Aktivierung in Herzmuskelzellen der Maus mit und ohne eNOS-Defizienz

Im vorliegenden Versuch wurde der Einfluß des eNOS-Inhibitors L-NA bei Kardiomyozyten der Wildtypmäuse vergleichend zu den eNOS-defizienten Mäusen untersucht. Dabei liegt bei letzterer Gruppe bereits gentechnisch diese Versuchsbedingung in vivo vor (Abb. 18).

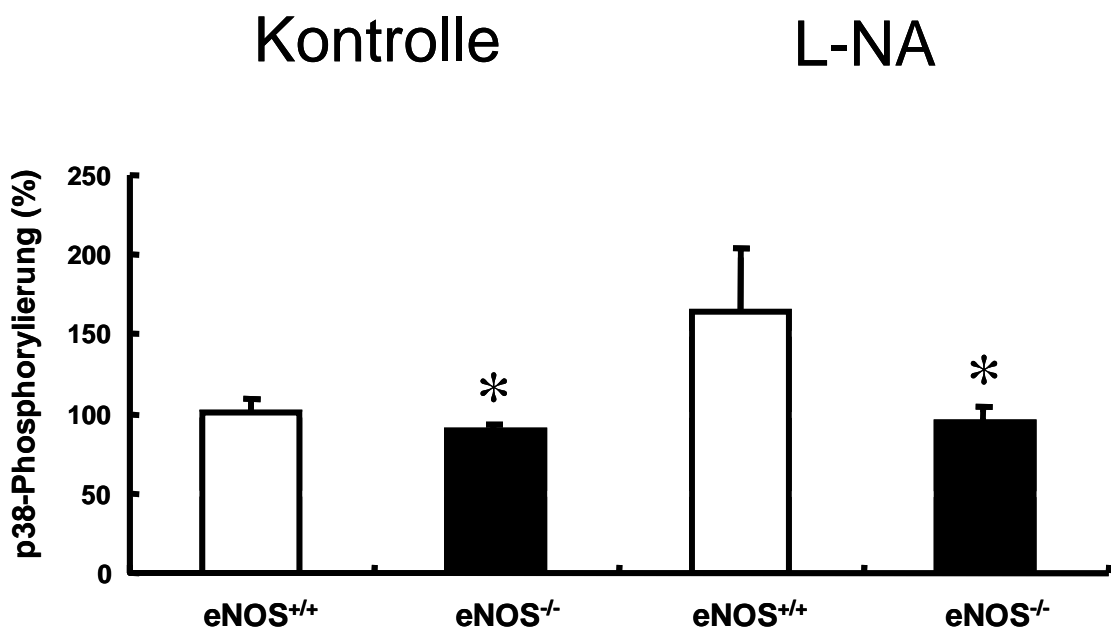


Abb. 19: Darstellung der p38-Phosphorylierung in % bei transgenetisch veränderten eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) und deren Wildtypen (eNOS^{+/+}) unter Kontrollbedingung und nach Induktion mit eNOS-Inhibitor L-NA (100µmol/l). Die Zellernte erfolgte nach 45 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung mit Signifikanz (*) = p<0,05 versus Wildtyp (eNOS^{+/+}) bei n=3.

In den Kardiomyozyten der Wildtyp-Mäuse ließ sich die p38 MAPK-Phosphorylierung durch Hemmung der endogenen NO-Bildung mittels L-NA steigern. Dies war in Kardiomyozyten aus eNOS-defizienten Mäusen nicht möglich (Abb. 19), sie verblieb annähernd auf Kontrollniveau.

4.6.3. Zeitkinetik der p38-Phosphorylierung mittels L-NA in Kardiomyozyten der Maus

Zellkulturen von isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp- und transgenen Mäusen wurden mit 100µmol/l L-NA inkubiert und nach 15, 30, 45 und 60 Minuten geerntet. Die Phosphorylierung der p38 MAPK wurde densitometrisch mittels Western-Blot im Verhältnis zur nicht-phosphorylierten Form (p38-P/p38) quantifiziert.

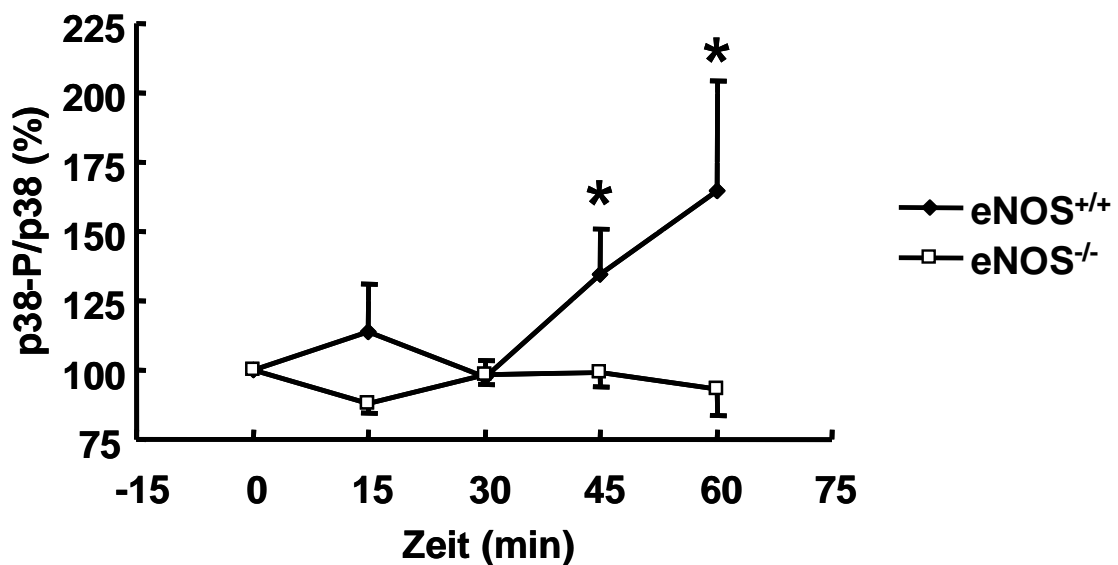


Abb. 20: Zeitkinetik der p38-Phosphorylierung unter Induktion von L-NA (100µmol/l) in Kardiomyozyten von Wildtyp- (eNOS^{+/+}) und eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}). Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung aus n=5 (eNOS^{+/+}) und n=3 (eNOS^{-/-}) bei 15, 30, 45 und 60 Minuten. Bei Signifikanz (*) = p<0,05 versus eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}).

Bei der Inkubation der Wildtyp-Kardiomyozyten zeigte sich ein Maximum nach 60 Minuten (Steigerung um ca. 60%), wobei die Phosphorylierung kontinuierlich ab 30 Minuten anstieg. Bei den eNOS-defizienten Kardiomyozyten war dagegen bei den verschiedenen Messungen keine Zunahme der Phosphorylierung durch L-NA zu erkennen (Abb. 20).

4.7. TGF β - und TNF α -Expression im Myokard von Mäusen mit und ohne genetischer eNOS-Defizienz

Analog zu den Experimenten an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte (Abb. 15) wurde die TNF α -Expression in Ganzherzproben eNOS-defizienter Mäuse untersucht. Aufgrund des fehlenden endogenen NO liegt eine hohe basale p38-Phosphorylierung (Abb. 18) vor. Es wurde daraufhin die Expression durch real-time PCR untersucht. Aufgrund der geringen Zellzahl isolierter Kardiomyozyten der Maus basierend auf das geringe Gesamtherzvolumen, wurden für diesen Versuch Ganzherzproben verwendet.

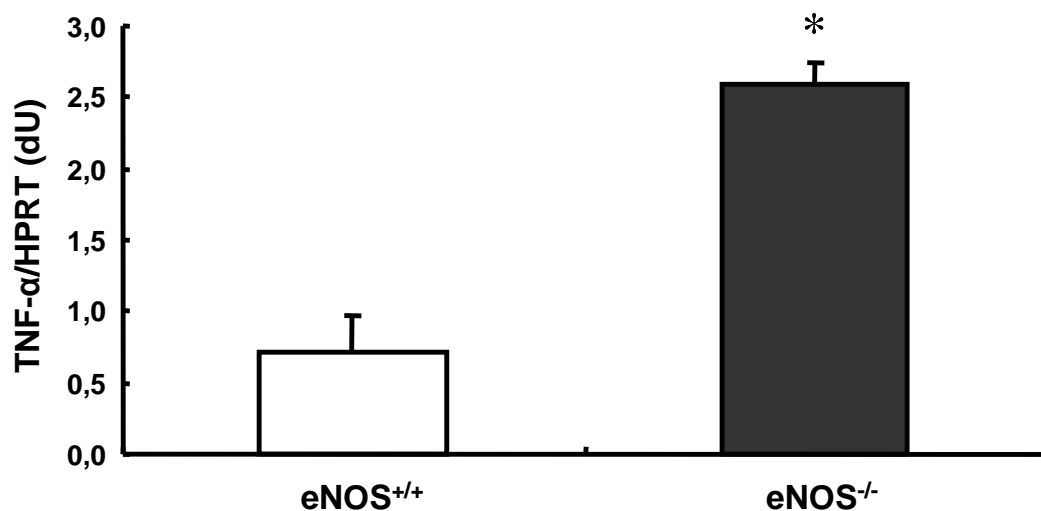


Abb. 21: TNF α -Expression in Ganzherzproben der Maus. Darstellung der Mittelwerte + Standardabweichung im Bezug auf das Housekeeping-Gen HPRT. Bei Signifikanz (*) $p < 0,05$ versus Kontrolle (Wildtyp^{+/+}) in $n=3$.

Parallel zur erhöhten basalen Phosphorylierung der p38 MAPK (Abb. 18) kommt es zu einer fast fünffachen Erhöhung der TNF α -Expression in transgenen eNOS-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abb. 21).

Die Untersuchungen der TGF β -Expression erfolgten auf Protein-Ebene an isolierten Kardiomyozyten im Western-Blot-Verfahren und auf Gen-Ebene durch real-time PCR mit Ganzherzproben.

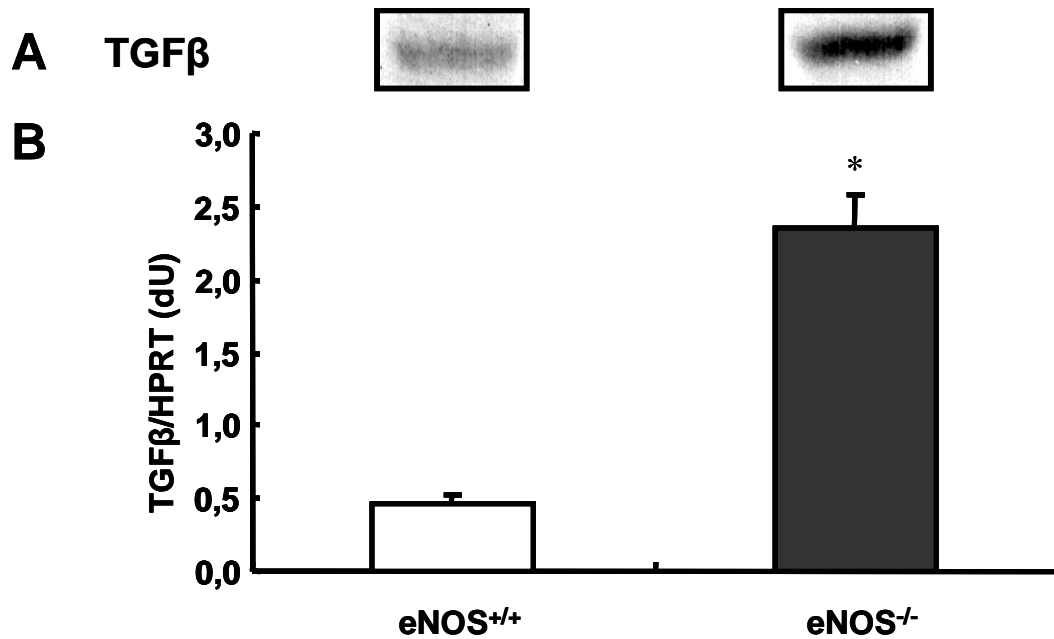


Abb. 22: TGF β -Expression in Ganzherzproben der transgenen Maus (Wildtyp, eNOS-defizient).

A: Repräsentative Western-Blots der TGF β -Expression in Ganzherzproben der transgenen Maus.

B: Darstellung der Mittelwerte + Standardabweichung im Bezug auf das Housekeeping-Gen HPRT mittels realtime-PCR. Bei Signifikanz (*) $p < 0,05$ versus Kontrolle (Wildtyp^{+/+}) bei $n=3$.

Es zeigte sich wie bei der TNF α -Expression (Abb. 21) eine fast um das fünffache gesteigerte TGF β -Expression, sowohl auf Protein- (Western-Blot, Abb. 22A) als auch auf Gen-Ebene (real time PCR, Abb. 22B).

5. DISKUSSION

5.1. Einfluß von Radikalen auf die p38-Phosphorylierung

WENZEL zeigte bereits 2001 den kausalen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Angiotensin II auf die Aktivierung der p38 MAPK. Angiotensin II induziert durch Bindung an AT₁-Rezeptoren über Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche des Weiteren die Phosphorylierung der p38 MAPK auslösen (Abb. 1). Angiotensin II stimuliert jedoch auch die eNOS-Expression und somit die NO-Bildung über Bindung an AT₂-Rezeptoren durch Calcineurin-nuclear factor-AT (NF-AT) Aktivierung (RITTER et al., 2003).

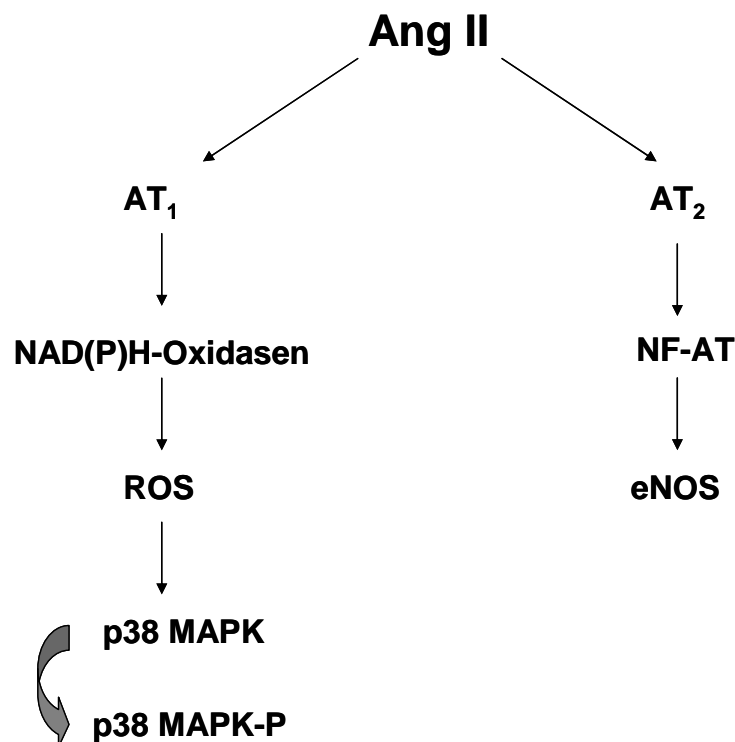


Abb. 23: Wirkungsweise von Ang II durch unterschiedliche Rezeptorbindung (AT₁ und AT₂) auf die Bildung von Radikalen.

5.2. Rolle der endogenen NO-Synthese

Unter physiologischen Bedingungen entsteht NO enzymatisch unter Katalyse der NO-Synthase (NOS), einem autarken P450 Enzym-Komplex, aus dem endständigen Stickstoff des Guanidin-Anteils der Aminosäure L-Arginin. Dabei wird L-Arginin zu L-Citrullin abgebaut, welches in den Harnstoffzyklus eingeschleust wird. Das hochreaktive Radikal NO wird im biologischen Milieu innerhalb weniger Sekunden zu den stabilen Endprodukten Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) weiteroxidiert oder an Reaktionspartner, wie Häm- oder Thiolgruppen, gebunden (MARLETTA, 1993; MONCADA et al., 1991; NATHAN et al., 1994). Es kann ebenso durch Hämoglobin oder Myoglobin neutralisiert werden (GÖDECKE et al., 2003). Endogenes NO gehört zum intrazellulären Redox-System.

5.2.1. Rolle von eNOS

In unterschiedlichen Zellformen wie Makrophagen, Endothelzellen, Myozyten und Thrombozyten etc. sind zwei Isoformen der NO-Synthase konstitutiv exprimiert. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS 3) ist ein Enzym, welches membranständig am Sarkolemm lokalisiert ist. Sie reagiert direkt auf stimulierende oder hemmende Liganden im Extrazellularraum, zum Beispiel durch Interaktion mit β -adrenergen Rezeptoren (FERON et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1997). Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS 1) ist am sarkoplasmatischen Retikulum exprimiert und reagiert somit auf intrazelluläre Mediatoren durch Ca^{++} abhängige Proteine (SEARS et al., 2003). Beide Isoformen sind für die Bildung eines basalen NO-Spiegels in der Zelle verantwortlich.

In adulten Kardiomyozyten der Ratte wird im Vergleich zu koronaren Endothelzellen nur ein Drittel der Menge an eNOS exprimiert. Die Expression der iNOS verhält sich in den zwei verglichenen Zellformen gleich (Ergebnisse hier nicht gezeigt). In Kardiomyozyten liegt im Vergleich zu mikrovaskulären Endothelzellen eine geringe NO-Synthase-Konzentration vor (Abb. 8).

5.2.2. Rolle von iNOS

Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS, NOS 2) erfolgt erst durch inflammatorische Einflüsse wie Zytokine (TGF β , TNF α etc.) und Endotoxine (z. B. LPS = Lipopolysaccharid der gram⁻ Bakterien) und setzt die 1000fache Menge NO frei als die konstitutiven NO-Synthasen und die Produktion wird über Stunden aufrechterhalten. Bei der untersuchten Fragestellung wird aufgrund der nötigen Induktion der Expression der iNOS die weitere Untersuchung der daraus folgenden endogenen NO-Bildung vernachlässigt.

5.3. Rolle von L-NA

Nitro-L-Arginin (L-NA) ist ein unspezifischer, irreversibler Inhibitor der NO-Synthasen. Somit werden gleichsam eNOS und nNOS gehemmt und jegliche endogene NO-Synthese unterbunden. Unter physiologischen Umständen erfolgt aufgrund der basalen NO-Bildung eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Form der Phosphorylierung. In Endothelzellen der Ratte mit einer hohen eNOS-Expriemierung ist die p38-Phosphorylierung folglich höher, als in Kardiomyozyten der Ratte mit geringerer eNOS-Expriemierung (Abb. 10, Kontrollen).

Nach Hemmung der endogenen NO-Bildung durch den Inhibitor L-NA reduziert sich die Phosphorylierung der p38 MAPK in den Endothelzellen deutlich um 80%, während sie in den Kardiomyozyten um fast 50% steigt (Abb. 10).

Diese Steigerung der Phosphorylierung ist zeitabhängig. In den Kardiomyozyten der Ratte ist ein Maximum der Phosphorylierung unter L-NA Induktion nach 30 Minuten erreicht, welches im weiteren Verlauf dieses Niveau nicht hält sondern weiter absinkt (Abb. 9).

Diese in vitro Beobachtungen können auch in vivo anhand der eNOS-defizienten Mäuse abgeleitet werden. Nach Induktion mit L-NA läßt sich die Phosphorylierung bei den Wildtypen, wie bei den Kardiomyozyten der Ratte deutlich steigern. Während die „knock-out“ Mäuse durch ihre genetische Veränderung schon basal vergleichbare Ergebnisse aufzeigen, welche durch Gabe von L-NA nicht mehr weiter beeinflussbar

sind. Basale endogene NO-Synthese unterdrückt somit die p38-Phosphorylierung in Kardiomyozyten (Abb. 19).

Auch hier ist die L-NA Wirkung zeitabhängig. Während bei den eNOS-defizienten Mäusen keinerlei zeitliche Unterschiede zur Kontrolle zu messen sind, steigt die p38-Phosphorylierung in den Kardiomyozyten der Wildtypmäuse ab 30 Minuten stetig an und es ist bis zum Versuchsende nach 60 Minuten noch keine Abschwächung zu messen (Abb. 20).

Hier unterscheiden sich die Spezies Ratte und Maus. Bei der Ratte ist nach 30 Minuten ein Maximum erreicht, während bei der Maus die Phosphorylierung ab 30 Minuten noch stetig ansteigt und kein Maximum innerhalb 60 Minuten abzusehen ist.

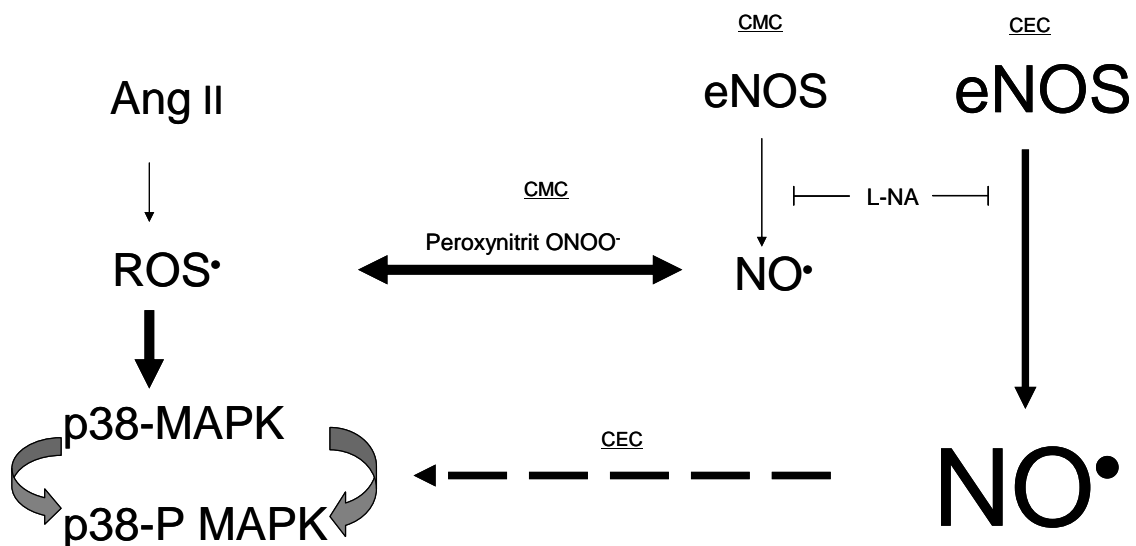


Abb. 24: Schema zur Erläuterung der Wirkung von eNOS-Inhibitor L-NA auf die p38 MAPK-Aktivierung in unterschiedlichen Zelltypen.

In Kardiomyozyten (CMC) mit geringer eNOS-Exprimierung hemmt L-NA die NO-Synthese. Es kann keine Reaktion mit den durch Ang II induzierten radikalalen Sauerstoffspezies (ROS) unter Peroxynitritbildung erfolgen. Die Phosphorylierung der p38 MAPK erfolgt somit ungehindert durch ROS.

In den vaskulären Endothelzellen (CEC) wird basal soviel NO gebildet, daß eine p38-Phosphorylierung auch trotz der Peroxynitritbildung direkt durch NO erfolgt. Nach Inkubation mit L-NA ist die p38-Phosphorylierung somit quantitativ deutlich verringert, als unter Kontrollbedingungen.

5.4. Einfluß von hohen NO-Konzentrationen auf p38-Phosphorylierung

Eine Steigerung der NO-Wirkung durch Induktion mit NO-Donor SNAP und Spermin-NONO zeigt eine deutlich verstärkte p38-Phosphorylierung (Abb. 11). Dabei wird jedoch nicht die durch Angiotensin II induzierte p38 MAPK Aktivierung abgeschwächt, wie man es bereits bei vaskulären Zellen postuliert, sondern zusätzlich gesteigert (Abb. 12). Ebenso entfällt die inhibitorische Wirkung der basalen, vergleichsweise niedrigen NO-Konzentrationen auf die p38-Phosphorylierung.

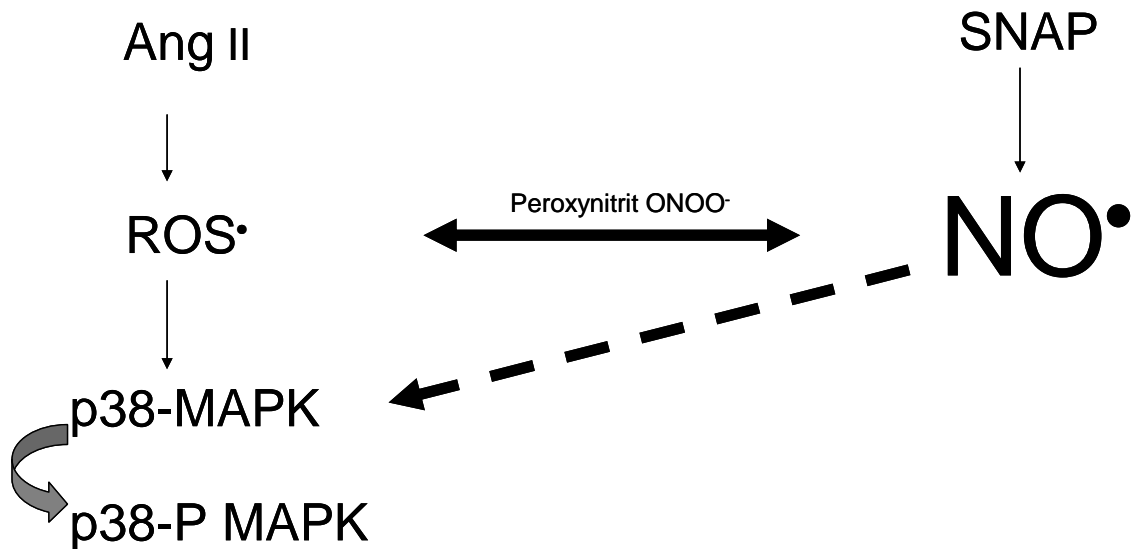


Abb. 25: Schematische Darstellung der p38 MAPK Aktivierung unter exzessiver NO-Wirkung. Ungehindert der Peroxynitritbildung mit ROS erfolgt eine direkte Phosphorylierung durch NO. Der Zusammenhang ist ähnlich dem in Zellen mit hoher eNOS-Expimierung (CEC).

5.5. Rolle von cGMP auf p38-Phosphorylierung

NO aktiviert lösliche Guanylatzyklase intrazellulär zu zyklisches GMP (cGMP). Dabei wirkt NO und cGMP über den Mediator cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PKG I) negativ inotrop, anti-hypertrophisch (CALDERONE et al., 1998; WOLLERT et al.,

2002) aber nicht pro-apoptotisch. Dieser Signalweg hemmt die durch Zytokine induzierte Hypertrophie in den Kardiomyozyten (CALDERONE et al., 1998; ISHIGAI et al., 1997) und unabhängig vom Blutdruck (MATSUOKA et al., 1996). Andererseits wird postuliert, daß NO konzentrationsabhängig für Apoptose in Kardiomyozyten verantwortlich ist. Dies geschieht durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus über die Bildung von Peroxynitrit (ARSTALL et al., 1999; BECKMANN, 1999; ING et al., 1999).

Der Zusammenhang der p38 MAPK-Aktivierung durch cGMP wird durch verschiedene Stimulatoren dargestellt. Nach der Induktion mit dem cGMP-Analogon 8-br-cGMP, einem Proteinkinase G-Aktivator und YC-1, einem NO-unabhängigen Aktivator der löslichen Guanylatzyklase ist eine Inhibition der p38-Phosphorylierung zu messen. Letztere umso deutlicher nach Hemmung der endogenen NO-Synthese (Abb. 13). Die p38 MAPK-Aktivierung wird über cGMP, welches über NO aktiviert wird, inhibiert. Dieser Effekt wird durch den selektiven Inhibitor ODQ der löslichen Guanylatzyklase aufgehoben, die p38-Phosphorylierung ist gesteigert (Abb. 14).

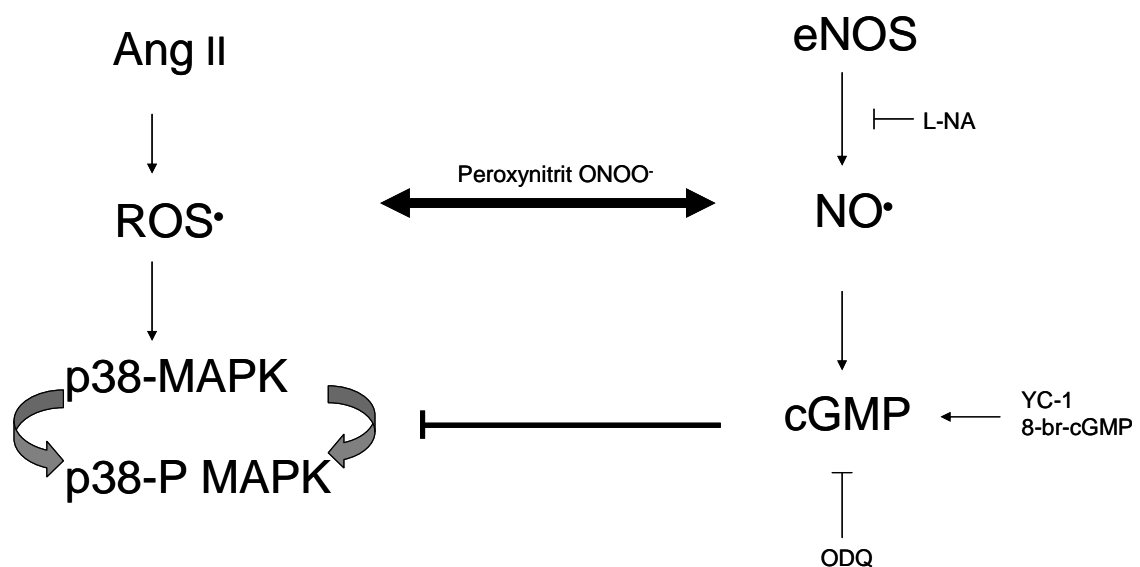


Abb. 26: Schematische Darstellung der cGMP-abhängigen Hemmung der p38-Phosphorylierung.

5.6. Einfluß von p38 MAPK auf Zytokinexpression (TNF α , TGF β)

Die Phosphorylierung der p38 MAPK reguliert die Zytokinexpression und wird wiederum durch diese auf para- oder autokrinem Weg (KYRIAKIS et al., 2001; SCHRAMEK, 2002; WENZEL et al., 2005) und Radikalen (ROS, NO) reguliert. Bei Inhibierung der NO-Synthese durch L-NA ist eine deutliche Steigerung der p38 MAPK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten zu messen. Diese in vitro-Ergebnisse (Abb. 10) stimmen mit den in vivo-Ergebnissen durch die eNOS-defizienten Mäuse überein (Abb. 19), ist jedoch mit denen der Endothelzellen nicht vergleichbar, da hier die cGMP vermittelte Hemmung der p38-Phosphorylierung fehlt.

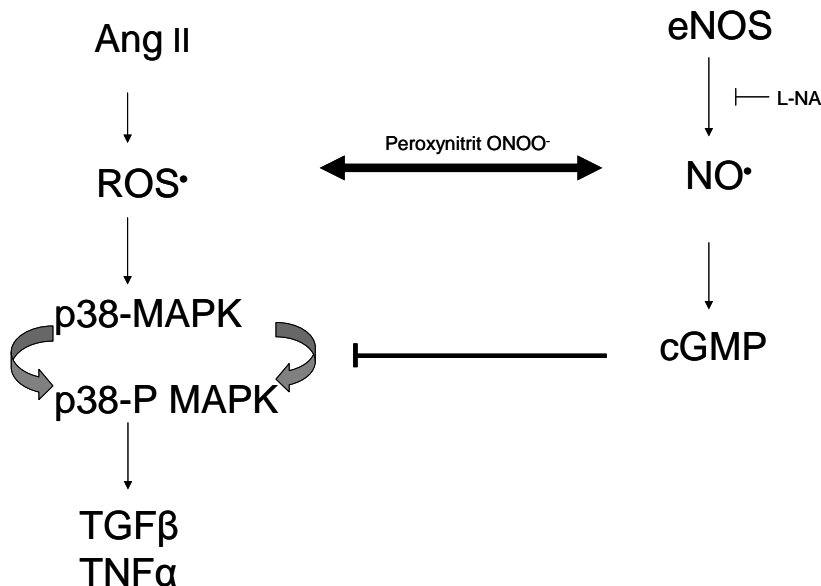


Abb. 27: Schematische Darstellung der Zytokinexpression in Abhängigkeit der p38 MAPK Phosphorylierung.

5.6.1. Bedeutung der Zytokine für die Herzmuskelzelle

Zytokine beeinflussen Kardiomyozyten auf pro-apoptotische und pro-hypertrophische Art (YOO et al., 2003). TGF β wird latent produziert, bedarf allerdings einer Aktivierung durch externe Proteasen um wirksam zu werden (TAIMOR et al., 1999). Seine Expression ist in der linken Ventrikelwand in Patienten mit idiopathischen

Herzhypertrophien und Herzdilatationen gesteigert (PAUSCHINGER et al., 1999; LI G et al., 1998; LI RK et al., 1997).

In den vorangegangenen Versuchen zeigt sich, daß eNOS-defiziente Mäuse eine hohe Zytokinexpression aufweisen (Abb. 21,22). Phänotypisch ist dagegen jedoch nur eine abgeschwächte Form der Kardiohypertrophie ausgebildet, welche sich von der Herzgewicht/Körpergewicht Relation ableitet (HUANG et al., 1995), diese ist auch Blutdruckunabhängig. Dabei zeigt sich keinerlei Beeinträchtigung der Kontraktilität im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen oder L-NA vorinkubierten Rattenkardiomyozyten (WENZEL et al., 2005). Im Allgemeinen haben die Tiere nur eine geringgradig verkürzte Lebenserwartung ohne deutliche kardiologische Dysfunktionen (BAROUCH et al., 2003). Zirkulierendes TGF β führt zu einer Stimulation der eNOS, welche durch ihre gesteigerte NO-Bildung zur Reduzierung der ROS-Wirkung führt. Diese Reduktion an Radikalen führt ihrerseits zu einer verringerten TGF β -Expression. Es erfolgt eine negative Inhibierung von TGF β auf seine eigene Expression.

Diese Ergebnisse sollten bei einer Therapieform bezüglich der Zytokinexpression und –aktivierung vor dem Hintergrund der Herzhypertrophie und –funktionsstörungen Berücksichtigung finden.

5.7. Studienergebnisse von Kardiomyozyten der Ratte im Kontext zu anderen Zellarten

In dieser Arbeit konnte auch schon der Unterschied zwischen vaskulären Endothelzellen und ventrikulären Kardiomyozyten bezüglich ihrer eNOS-Expriemierung und Reaktion auf deren Hemmung gezeigt werden (Abb. 8,10). Dies hat eine unterschiedliche Bedeutung für den NO-Signalweg, der hier nicht weiter verfolgt wurde.

Für vaskuläre Glattmuskelzellen wurde ebenso ein protektiver NO/cGMP-Signalweg postuliert, welcher die proliferierenden Prozesse der Gefäße unterdrückt (FEIL et al., 2005). NO inhibiert zum einen mit cGMP als Mediator NAD(P)H-Oxidasen in neutrophilen Granulozyten, interagiert allerdings auch auf direktem Wege mit

gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter Peroxynitritbildung (FUJII et al., 1997; RODENAS et al., 1998; ZHUANG et al., 2004).

INGRAM et al. (2000) konnten mit NO und dem cGMP-abhängigen Signalweg die belastungsinduzierte p38-Phosphorylierung in Mesangiumzellen der Niere inhibieren. Diese Ergebnisse erfolgten auch unter Verwendung des sehr potenten NO-Donors SNAP, welcher in dieser Arbeit bei Kardiomyozyten keine Inhibierung der p38-Phosphorylierung zeigte, sondern diese sogar stimulierte (Abb. 11).

Kardiomyozyten sezernieren aktives TGF β , welches die Kollagenproduktion in Fibroblasten parakrin in Anwesenheit von Angiotensin II stimuliert. Angiotensin II reguliert dabei diesen Prozess, da er durch Angiotensinrezeptor-Blocker gehemmt werden kann (SARKAR et al., 2004). In Fibroblasten fehlt die durch LPS aktivierte iNOS.

LIU et al. zeigten 2003 eine Inaktivierung von MAP-Kinasen durch NO über einen aktivierten Proteinkinase G-Signalweg und daraus folgernd eine reduzierte Hypertrophiereaktion durch Induktion von Ang II in neonatalen Kardiomyozyten. Dies ist mit den Ergebnissen von adulten Zellen vergleichbar.

5.8. Limitierung der Arbeit

Bei einer ausgeprägten Herzinsuffizienz ist die eNOS-Expriemierung und somit die endogene NO-Bildung reduziert. Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Arbeit durch eNOS-Inhibitor L-NA in vitro und den Einsatz von transgenen eNOS-defizienten Mäusen in vivo imitiert.

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß L-NA ein unselektiver Inhibitor der NO-Synthasen darstellt und somit kein Einfluß der anderen konstitutiven nNOS ersichtlich ist.

Bei der Interpretation der Ergebnisse von transgenen Tieren ist zu berücksichtigen, daß es sich hierbei um künstliche Mutanten handelt, welche in dieser Form nicht in der Natur vorkommen. Es ist fraglich, ob der phänotypische Zustand eine Kompensation der Herzfunktion darstellt, da fehlendes endogenes NO seit Geburt

besteht und nicht erst im Alter durch diverse Einflüsse erfolgt. Es sollte weiter untersucht werden, inwiefern die iNOS oder nNOS in diesen Tieren auf die Herzfunktion einwirken.

Bei dieser Arbeit wurden keine NO-Messungen auf Einzelzellebene durchgeführt. Exogenes NO wurde im Überschuss (SNAP = 1 μ mol/l) zugeführt, wobei Kardiomyozyten in einer Zeit- und Dosis-abhängiger Weise reagieren (SHIMOJO et al., 1999).

Des Weiteren ist es bei der Arbeit mit isolierten Zellkulturen nicht möglich den gesamten Kontext zu betrachten und deswegen können die Ergebnisse nicht ohne kritische Hinterfragung auf den Menschen übertragen werden.

5.9. Zukunftsausblick

Um den vielschichtigen Zusammenhang der Herzinsuffizienz, vor allem den Schritt der kompensierten zur dekompenzierten Form, genauer verstehen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen. Hierbei wäre es denkbar spezifische Enzymkaskaden auf gentechnischer Ebene anzusteuern, um deren Auswirkungen auf phänotypischer Ebene sowie in der Zellkultur zu erforschen.

Des Weiteren kommt dem cGMP-abhängigen Modeling eine zentrale Bedeutung zu, die zu beeinflussen wäre.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse gilt es in eine adäquate Therapie umzusetzen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, daß mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte einen deutlich höheren eNOS-Gehalt als adulte Kardiomyozyten der Ratte aufweisen und dadurch eine erhöhte p38 MAPK-Phosphorylierung durch endogenes NO zeigen. Diese wird bei den Endothelzellen durch Hemmung der eNOS durch L-NA stark reduziert, während bei den Kardiomyozyten unter gleichen Versuchsbedingungen eine deutliche Steigerung zu sehen ist, welche nach 30 Minuten ein Maximum erreicht und danach wieder langsam abfällt.

Des Weiteren wurde der Einfluß unterschiedlicher Radikale (ROS, NO) untersucht. Hierbei wurde ersichtlich, daß die unter Angiotensin II induzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Steigerung der Phosphorylierung bewirken. Ergebnisse von Untersuchungen mit exogenem NO in Form von SNAP und Spermin-NONO übersteigen dieses Niveau und führen zu einer massiven Erhöhung der Phosphorylierung.

Versuche zur Rolle der durch NO aktivierten Guanylatzyklase postulieren eine Hemmfunktion hinsichtlich der p38 MAPK-Phosphorylierung über einen cGMP-Signalweg.

Es konnte sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine gesteigerte Expression der Zytokine TGF β und TNF α in Abwesenheit von NO dargelegt werden.

Im *in vivo*-Modell anhand der transgenen eNOS-defizienten Mäuse und deren Wildtypen wurde unter anderem die Spezifität der eingesetzten Antikörper nachgewiesen.

Nach Induktion mit L-NA verhielten sich die Kardiomyozyten der Wildtypmäuse vergleichbar mit denen der Ratten. Nach Inhibierung der eNOS erfolgte eine deutliche Zunahme der p38-Phosphorylierung, welche ab 30 Minuten nach Induktion eine deutliche und stetige Steigerung erfuhr, die ihr Maximum noch nicht bis 60 Minuten erreichte. Diese Steigerung der p38-Phosphorylierung blieb bei den eNOS-defizienten Mäusen aus. Die Meßwerte übertrafen über eine Stunde nicht das Kontrollniveau.

Vergleichend zu den Ergebnissen der Kardiomyozyten der Ratte unter L-NA Inkubation ist in den Zellen der eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) die Zytokin-Exprimierung deutlich gegenüber ihren Wildtypen (eNOS^{+/+}) erhöht.

Es verdeutlicht sich, daß basale konstitutive NO-Konzentrationen die p38-Phosphorylierung und somit die Zytokin-Exprimierung hemmen. Ebenso führt eine Aktivierung des cGMP-Signalweges zu einer reduzierten p38-Phosphorylierung. In Abwesenheit von endogenem NO und durch exzessive exogene NO-Gabe wird die p38-Phosphorylierung und Zytokin-Exprimierung deutlich gesteigert.

7. Summary

In the present study it could be shown in vitro that microvascular endothelial cells of the rat contain a significantly higher content of eNOS than adult cardiomyocytes of rats, thus showing an increased p38 MAPK-phosphorylation by endogenous NO. By inhibiting the eNOS by means of L-NA the phosphorylation in endothelial cells is highly reduced, whereas cardiomyocytes show a significant increase under the same test conditions. This increase reaches its maximum after 30 minutes, after this period you can watch a slow decrease.

Furthermore, the influence of different radicals (ROS, NO) was examined. It became evident that the reactive oxygen species (ROS), which were induced by angiotensin II, cause an increase of phosphorylation. The application of exogenous NO in form of SNAP and Spermin-NONO causes an excess of this level and leads to a massive increase of phosphorylation.

Tests concerning the role of guanylate cyclase activated by NO postulate an inhibition with respect to p38 MAPK-phosphorylation via a cGMP-signal path.

Both on the level of genes and proteins there could be demonstrated an increased cytokine expression of TGF β and TNF α in absence of NO.

The fact that the antibodies used are specific was proved in in vivo-models by means of transgenic eNOS-deficient mice and their wild types.

After induction with L-NA the cardiomyocytes of the wild-type mice behaved comparable to those of the rats. After inhibition of eNOS a significant increase of the p38-phosphorylation showed. This increase was significantly and constantly raised from 30 minutes after induction, not reaching its maximum up to 60 minutes. The eNOS-deficient mice did not show this increase of p38-phosphorylation. This measurement did not surpass the control level for over an hour.

As compared to the results of rats' cardiomyocytes under L-NA incubation the cytokine expression is significantly increased in the cells of eNOS-deficient mice (eNOS^{-/-}) as compared to their wild types (eNOS^{+/+}).

It has become evident that basal constitutive concentrations of NO inhibit the p38-phosphorylation and consequently the cytokine expression. In addition, the activation of the cGMP-signal path leads to a reduced p38-phosphorylation. In the absence of

endogenous NO and after an excessive exogenous donation of NO the p38-phosphorylation and cytokine expression is significantly increased.

8. LITERATUR

Albina JE, Reichner JS

Nitric oxide in inflammation and immunity.

New Horiz, 1995, 3, 46-64

Archer S

Measurement of nitric oxide in biological models.

FASEB J, 1993, 7, 394-360

Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA

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

Circ Res, 1999, 85, 829-840

Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S

Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation.

Br J Pharmacol, 1986, 88, 411-415

Baas AS, Berk BC

Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells.

Circ Res, 1995, 77, 29-36

Balligand J-L, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T

Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system.

Proc Natl Acad Sci USA, 1993b, 90, 347-351

Balligand J-L, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Michel T, Smith TW

Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium.

J Clin Invest, 1993a, 91, 2314-2319

Barouch LA, Cappola TP, Harrison RW, Crone JK, Rodriguez ER, Burnett AL, Hare JM

Combined loss of neuronal and endothelial nitric oxide synthase causes premature mortality and age-related hypertrophic cardiac remodeling in mice.

J Mol Cell Cardiol, 2003, 35, 637-644

Beckmann JS

Parsing the effects of nitric oxide, S-nitrosothiols, and peroxynitrite on inducible nitric oxide synthase-dependent cardiac myocyte apoptosis.

Circ Res, 1999, 85, 870-871

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG

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

Circ Res, 1994, 75(1), 23-32

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding.

Anal Biochem, 1976, 72, 248-254

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH

Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.

Nature, 1990, 347, 768-790

Brixius K, Kojda G, Noack E

Influence of pentaerythritoltetranitrate and isosorbide mononitrate on cardiac actions of norepinephrine.

Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1994, 349 (Suppl): R26

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DLF, Colucci WS
Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts.
J Clin Invest, 1998, 101, 812-818

Clark WA, Decker ML, Behnke-Barclay M, Janes DM, Decker RS
Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture.
J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(1), 139-155

de Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S
Nitric oxide synthase activities in human myocardium.
Lancet, 1993, 341, 84-85

Fedida D, Braun AP, Giles WR
Alpha 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms.
Physiol Rev, 1993, 73(2), 469-487

Feil R, Feil S, Hofmann F
A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases.
Trends Mol Med, 2005, 11(2), 71-75

Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T
Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes: implication for the autonomic regulation of the heart rate.
J Biol Chem, 1998, 273, 30249-30254

Fujii H, Ichimori K, Hoshiai K, Nakazawa H
Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process.
J Biol Chem, 1997, 272, 32773-32778

Gearing AJH, Cartwright JE, Wadhwa M

25. Biological and immunological assays for cytokines.

Hrsg: Thomson AW: The Cytokine Handbook, 2nd edn. Academic Press Ltd., London, 1994, 507-524

Gödecke A, Molojavyi A, Heger J, Flögel U, Ding Z, Jacoby C, Schrader J

Myoglobin protects the heart from inducible nitric oxide synthase (iNOs)-mediated nitrosative stress.

J Biol Chem, 2003, 278, 21761-21766

Godfrey K

Statistics in practice. Comparing the means of several groups.

N Engl J Med, 1985, 313, 1450-1456

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ

A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.

Science, 1994, 265, 808-811

Harbrecht BG, Billiar TR

The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions.

Shock. 1995, 3, 79-87

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z

Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite.

Science. 1987, 235, 473-476

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R

Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.

Biotechnology (NY), 1992 Apr, 10(4), 413-417

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.

Biotechnology (NY), 1993 Sep, 11(9), 1026-1030

Huang PL, Huang ZH, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC

Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase.

Nature, 1995, 377, 239-242

Ibelgaufts H

Dictionary of cytokines.

VCH Verlag, Weinheim, 1995, 537-538

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G

Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84, 9265-9269

Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH

Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x.

Circ Res, 1999, 84, 21-33

Ingram AJ, James L, Thai K, Ly H, Cai L, Scholey JW

Nitric oxide modulates mechanical strain-induced activation of p38 MAPK in mesangial cells.

Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279, F243-F251

Ishigai Y, Mori T, Ikeda T, Fukuzawa A, Shibano T

Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes.

Am J Physiol, 1997, 273, H2659-H2663

Ito H, Adachi S, Tamamori M, Fujisaki H, Tanaka M, Lin M, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M

Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism.

J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(6), 1271-1277

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M

Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes.

J Clin Invest, 1993, 92(1), 398-403

Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F

Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes.

Circulation, 1993, 87(5), 1715-1721

Kelly RA, Balligand JL, Smith TW

Nitric oxide and cardiac function.

Circ Res, 1996, 79, 363-380

Khan TA, Bianchi C, Ruel M, Voisine P, Sellke FW

Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery.

J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127 (3), 806-811

Kim NN, Villarreal FJ, Printz MP, Lee AA, Dillmann WH

Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts.

Am J Physiol, 1995, 269(3 Pt 1), E426-437

Klabunde RE, Kimber ND, Kuk JE, Helgren MC, Förstermann U

N^G-Methyl-L-arginine decreases contractility, cGMP and cAMP in isoproterenol-stimulated rat hearts in vitro.

Eur J Pharmacol, 1992, 223, 1-7

Klabunde RE, Ritger RC, Helgren MC

Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs.

Eur J Pharmacol, 1991, 199, 51-59

Kojda G

Einfluss von endogenem und exogenem NO auf die myokardiale Kontraktion.

Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1997

Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y
Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation.

J Biol Chem, 1991, 266(2), 1265-1268

Kyhse-Andersen J

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J Biochem Biophys Methods, 1984 Dec, 10(3-4), 203-209

Kyriakis JM, Avruch J

Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.

Physiol Rev, 2001 Apr, 81(2), 807-869

Laemmli UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 1970, 227, 680-685

Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM

Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species.

J Biol Chem, 1996, 271, 19705-19709

Levandro S, Foncea R, Perez V, Sapag-Hagar M

Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes.

FEBS Lett, 1998, 422(2), 193-196

Li G, Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Ball WT, Christakis GT, Cusimano RJ, Williams WG

Elevated insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta 1 and their receptors in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: a possible mechanism.

Circulation, 1999, 98(Suppl. 19), II, 144-150

Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christiakis GR, Williams WG

Overexpression of transforming growth factor-beta 1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy.

Circulation, 1997, 96(3), 874-881

Liu Q, Hofmann PA

Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A₁ receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285, H97-H103

Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF

Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, second edition, Vol.1, 6, 44ff

Marletta MA

Nitric oxide synthase structure and mechanism.

J Biol Chem, 1993, 268, 12231-12234

Meager A, Gaines-Das RE

International collaborative study of the candidate international standards for human tumor necrosis factor alpha (hTNF α) and beta (hTNF β) and for murine tumor necrosis factor alpha (mTNF α).

J Immunol Meth, 1994, 170, 1-13

Messerli JM, Eppenberger-Eberhardt ME, Rutishauser BM, Schwarb P, von Arx P, Koch-Schneidemann S, Eppenberger HM, Perriard JC

Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy.

Histochemistry, 1993,100(3), 193-202

Michel T, Lamas S

Molecular cloning of constitutive endothelial nitric oxide synthase: evidence for a family of related genes.

J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20 Suppl 12, S45-9

Moncada S, Palmer RNJ, Higgs EA

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.

Pharmacol Rev, 1991, 43, 109-142

Morbideilli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M

Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium.

Am J Physiol, 1996, 270, H411-H415

Mosmann T

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J Immunol Meth, 1983, 65, 55-63

Nathan C, Xie Q-W

Regulation of biosynthesis of nitric oxide.

J Biol Chem, 1994, 269, 13725-13728

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature, 1987, 327, 524-526

Parker TG, Packer SE, Schneider MD

Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes.

J Clin Invest, 1990, 85(2), 507-514

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP

Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio.

Circulation, 1999, 99, 2750-2756

Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützfeld A, Watanabe H

Microvascular endothelial cells from heart.

In: Cell culture techniques in heart and vessels research, ed: HM Piper

Springer Verlag, Heidelberg, 1990, 158-177

Pfaffl MW

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res, 2001 May 1, 29(9):e45.

Quian SW, Kondaiah P, Roberts AB, Sporn MB

cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta-1.

Nucleic Acids Res, 1990, 18, 3059

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ

Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation in tyrosine and threonine.

J Biol Chem, 1995, 270, 7420-7426

Riede UN, Schaefer HE

Subletale Zellschädigung.

Hrsg.: Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage.

Stuttgart, New York, Thieme, 1999, 128ff

Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC, Marsh JD

Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide.

Am J Physiol, 1998, 275, H1370-H1374

Ritter O, Schuh K, Brede M, Rothlein N, Burkard N, Hein L, Neyses L

AT₂-receptor activation regulates myocardial eNOS expression via the calcineurin-NF-AT pathway.

FASEB J, 2003, 17, 283-285

Roberts AB, Vodovotz Y, Roche NS, Sporn MB, Nathan CF

Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta on the beating rate of cultured cardiac myocytes.

Mol Endocrinol, 1992, 6(11), 1921-1930

Rodenas J, Mitjavila MT, Carbonell T

Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes.

Am J Physiol Cell Physiol, 1998, 274, C827-C830

Sarkar S, Vellaichamy E, Young D, Sen S

Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287, H107-H117

SAS/STAT

User Guide, 1992, Version 6, Fourth Ed. 2, 946-947

Schramek H

MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease.

News Physiol Sci, 2002 Apr, 17, 62-67

Sears CA, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B

Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial and calcium handling.

Circ Res, 2003, 92, e52-e59

Shimojo T, Hiroe M, Ishiyama S, Ito H, Nishikawa T, Marumo F

Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway.

Exp Cell Res, 1999, 247, 38-47

Sugden PH, Bogoyevitch MA

Endothelin-1-dependent signalling pathways in the myocardium.

Trends Cardiovasc Med, 1996, 6, 87-94

Sugden PH, Fuller SJ

Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle.

Biochem J, 1991, 273(1), 21-37

Taimor G, Schlüter KD, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM

Autocrine regulation of TGF β expression in adult cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol, 1999, 31, 2127-2136

Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM

Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview.

Parmacol Rev, 1993, 45(2), 147-175

Tiao G, Rafferty J, Ogle C, Fischer JE, Hasselgren PO

Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6.

Surgery, 1994, 116, 332-337

van Bilsen M

Signal transduction revisited: recent developments in angiotensin II signaling in the cardiovascular system.

Cardiovasc Res, 1997, 36(3), 310-322

Villarreal FJ, Dillmann WH

Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen.

Am J Physiol, 1992, 262(6 Pt 2), H1861-1866

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ

The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival.

Biochem J, 1998, 333, 291-300

Wenzel S

Signaltransduktion der Angiotensin II-vermittelten Steigerung der TGF β -Expression in adulten ventrikulären Kardiomyozyten.

Hrsg: VVB Laufersweiler Verlag, 2001

Wenzel S, Müller C, Piper HM, Schlüter KD

P38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling.

Eur J Heart Fail, 2005, 7(4), 453-460

Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, Roth J, Kojda G, Schlüter KD

Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes.

Hypertension, 2007, 49, 193-200

Whitmarsh AJ, Davis RJ

Transcriptionfactor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction.

J Mol Med, 1996, 74, 589-607

Wollert KC, Drexler H

Regulation of cardiac remodelling by nitric oxide: Focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis.

Heart Fail Rev, 2002, 7, 317-325

Wollert KC, Fiedler B, Gambaryan S, Smolenski A, Heineke J, Butt E, Trautwein C, Lohmann SM, Drexler H

Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes.

Hypertension, 2002, 39(1), 87-92

Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, Vernallis AB, Heath JK, Pennica D, Wood WI, Chien KR

Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways.

J Biol Chem, 1996, 271(16), 9535-9545

Yamamoto S, Tsutsui H, Tagawa H, Saito K, Takahashi M, Yamamoto M, Katoh M, Egashira K, Takeshita A

Role of myocyte nitric oxide in β -adrenergic hyporesponsiveness in heart failure.

Circulation, 1997, 95, 1111-1114

Yoo J, Ghiassy M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ, Liebermann DA, Böttinger EP, Roberts AB

Transforming growth factor β -induced apoptosis is mediated by smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation.

J Biol Chem, 2003, 278 (44), 43001-43007

Zhan CD

The role of nitric oxide in the prevention of myocardial hypertrophic response and its mechanisms.

Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2000, 31(4), 322-324

Zhan CD, Wang TH, Pan JY

The role of nitric oxide in the angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes.

Sheng Li Xue Bao, 1999, 51(6), 660-666

Zhuang D, Ceacareanu AC, Lin Y, Ceacareanu B, Dixit M, Chapman KE, Waters CM, Rao GN, Hassid A

Nitric oxide attenuates insulin- or IGF-I-stimulated aortic smooth muscle cell motility by decreasing H₂O₂ levels: essential role of cGMP.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 268, H2103-H2112

Ziolo MT, Kato H, Bers DM

Positive and negative effects of nitric oxide on Ca²⁺ sparks: influence of β -adrenergic stimulation.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281, H2295-H2303

9. Publikationen basierend auf Resultate dieser Arbeit

Schlüter KD, Wingerning S, Wenzel S, Kojda G, Zimmermann R

The impact of low concentrations of nitric oxide on p38 MAP kinase phosphorylation in adult ventricular cardiomyocytes from rat.

Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft, Leipzig 2004

Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, Roth J, Kojda G, Schlüter KD

Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes.

Hypertension, 2007, 49, 193-200

Wingerning S, Wenzel S, Kojda G, Zimmermann R, Schlüter KD

Der Einfluss von geringen und hohen endogenen NO-Konzentrationen auf die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase in Herzmuskelzellen.

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 2004

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. K.-D. Schlüter für die Realisierung und vor allem Finanzierung dieser Arbeit sowie für seinen unerschütterlichen Optimismus und Geduld. Er lehrte mich nicht in Frustration zu verzweifeln.

Dem Leiter des physiologischen Institutes des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Professor Dr. Dr. H.-M. Piper, möchte ich für die Gelegenheit danken, die veterinärmedizinische Front in seinem Institut verstärken zu dürfen.

Ich danke Herrn Professor Dr. M. Diener für die unbürokratische Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Dem medizinisch-technischen Personal, allen voran Daniela Schreiber, Dagmar Felde und Nadine Lorenz sowie Dr. Sybille Wenzel möchte ich für die immer freundliche und fachliche Unterstützung sowie Einarbeitung danken. Humor schmälert nicht die Qualität von hervorragender Arbeit.

Für die Korrektur meiner Dissertation danke ich Sandra Schwering und Kerstin Abs, welche aus englischen Vokabeln ein sinnvolles Summary zaubern kann.

All meinen Freunden danke ich für die große moralische Unterstützung während dieser manchmal schönen, aber auch manchmal schlechten Zeit. Man kann auch lachend durch das wissenschaftliche Tal der Tränen wandeln.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mir diesen Lebensweg ermöglichten und mich diese Erfahrungen sammeln ließen.

Danke für Euer Vertrauen in mich.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5275-7



9 783835 119527 511