

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuss)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Die Genregulation des myokardialen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Claus Christians

aus Xanten

Göttingen 2013

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**1. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. W. Schillinger

**2. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. A. El-Armouche

**3. Berichtstatter/in:** -

**Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2013**

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind publiziert worden:

Schillinger W, Christians C, Sossalla S, Teucher N, Nguyen Van P, Kögler H, Zeitz O, Hasenfuss G (2007): Alpha1-adrenergic stress induces downregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in myocardial preparations from rabbits at physiological preload. Eur J Heart Fail 9(4), 329-35.

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Grundlagen	5
1.2. Die elektromechanische Kopplung	5
1.3. Der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX)	6
1.4. Die sarkoendoplasmatische Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA)	7
1.5. Das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP)	7
1.6. Die Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GaPDH)	8
1.7. Die Myofilamentaktivierung	8
1.8. Die molekulare Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und die Rolle des NCX	10
1.9. Regulationen durch das sympathische Nervensystem bei Herzinsuffizienz	10
1.10. Fragestellung der Arbeit	11
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1. Material	12
2.2. Experimentierlösungen	12
2.3. Versuchsaufbau der Myozytenisolation	14
2.4. Versuchsaufbau der Muskelstreifenanlage	16
2.5. Der Light-cycler	18
2.6. Isolation und Kultivierung von Kardiomyozyten aus Kaninchen- und Rattenherzen	19
2.7. Präparation, Kultivierung und Registrierung von mechanischen Parametern der Herzmuskelstreifen von Kaninchen	20
2.8. Quantifizierung spezifischer messenger RNA mit der real-time Polymerasekettenreaktion	22
2.9. Datenverarbeitung und Statistik	24
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Phenylephrin und isometrischer Kraft	27
3.2. Elektrisch stimulierte rechtsventrikuläre Trabekel des Kaninchens	27
3.3. Isolierte, ungedehnte Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte in Kultur	30
<b>4. Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1. Klinische Bezüge	36
4.2. Schlussfolgerungen	37
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>37</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>39</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis	39
6.2 Abbildungsverzeichnis	40
6.3 Tabellenverzeichnis	41
<b>7. Literaturverzeichnis:</b>	<b>42</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundlagen

Die Pumpwirkung des menschlichen Herzens beruht auf der rhythmischen Aufeinanderfolge von Erschlaffung und Kontraktion, Diastole und Systole, der beiden Herzkammern. Ein wesentliches Funktionselement dieses Vorgangs sind die Herzmuskelfasern. Als Herzmuskelfasern bezeichnet man Ketten von hintereinander geschalteten Herzmuskelzellen, die gemeinsam eine funktionelle Einheit bilden. Morphologisch und funktionell werden zwei Typen von Herzmuskelfasern unterschieden. Erstens Fasern des Arbeitsmyokards von Vorhöfen und Ventrikeln, welche die Hauptmasse des Herzens ausmachen und die mechanische Pumparbeit verrichten, und zweitens die Fasern des Erregungsbildungs- und Leitungssystems, deren Aufgabe die Generierung und Weiterleitung erregender Aktionspotentiale an das Arbeitsmyokard ist. Gelangt solch ein Aktionspotential zu den Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards, so kommt es zu einer Kontraktion dieser Zellen. Treten strukturelle und funktionelle Veränderungen in diesem Ablauf auf, so kann dies zur Herzinsuffizienz führen. Sie kann als Folge chronischer Arbeitsüberlastung des Herzens, durch vermehrte Druck- bzw. Volumenarbeit auftreten. Auch Sauerstoff- und Substratmangel, wie bei der koronaren Arteriosklerose oder dem akuten Myokardinfarkt, eine Myokarditis oder bestimmte Toxine und Pharmaka können diesen komplexen Mechanismus stören und zur myokardialen Insuffizienz führen. Die Angriffspunkte solcher Einflüsse an den zellulären Grundprozessen von Erregung, elektromechanischer Kopplung und Kontraktion sind sehr vielfältig. Im Wesentlichen werden hier auf zellulärer Ebene zwei Typen der myokardialen Insuffizienz unterschieden. Erstens die Mangelinsuffizienz, bei der die Resynthese des myozytären Energiespeichers Phosphokreatin infolge mangelnder Energiezufuhr und so die Versorgung der kontraktile Fasern mit Adenosintriphosphat gestört ist. Dies geschieht z.B. bei der Koronarsklerose oder dem akuten Myokardinfarkt. Der zweite Typ ist die Utilisationsinsuffizienz, bei der der Vorrat an energiereichen Phosphaten bei ungenügender elektromechanischer Kopplung nicht ausgenutzt werden kann. Im klinischen Bild der myokardialen Herzinsuffizienz dominieren, gerade im zeitlichen Verlauf, Mischformen dieser beiden Phänomene. Die vorliegende Arbeit untersucht Vorgänge in den Zellen des Arbeitsmyokards, die als Folge eine veränderte Regulation von Genen und folgend Expression der Proteine hat, deren Funktion von eminenter Bedeutung für eine physiologische Funktion des Arbeitsmyokards ist. Diese Proteine, Natrium-Kalzium-Exchanger (NCX 1= kardiale Isoform) und sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA 2a= kardiale Isoform) haben eine wichtige Funktion bei der elektromechanischen Kopplung, die eine Kontraktion und deren Koordinierung erst ermöglicht.

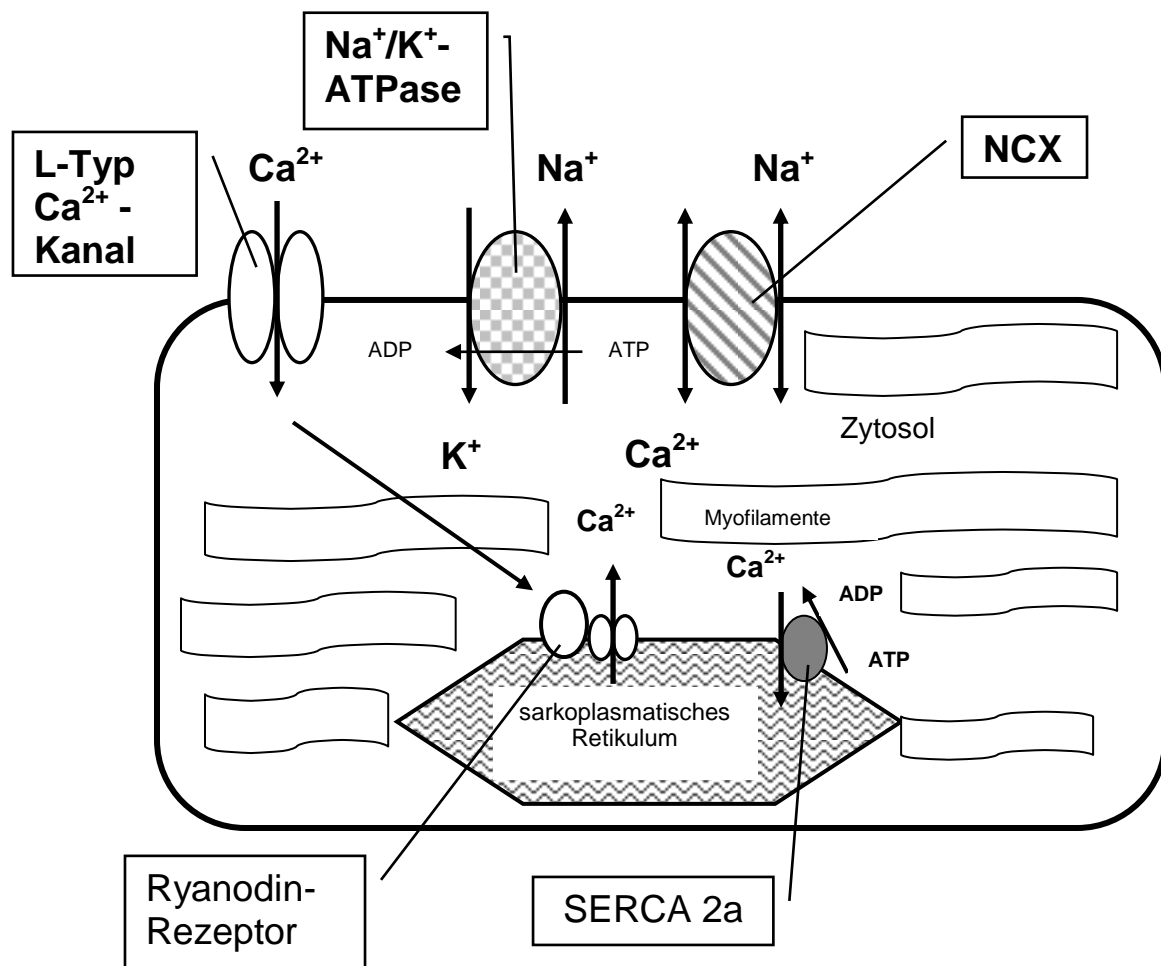
## 1.2. Die elektromechanische Kopplung

Die Kontraktionsfähigkeit des menschlichen Herzens hängt im wesentlichen Maß von der oszillierenden Veränderung der zytosolischen Kalziumionenkonzentration ab.

Während des Aktionspotentials des Kardiomyozyten fungieren kleine Mengen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die nach Depolarisation der Zelle über spannungsgesteuerte L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Zelle gelangen, als Trigger für weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, indem sie an den Ryanodin-Rezeptor binden. Die diastolische Relaxierung des Kardiomyozyten wird durch die Wiederaufnahme des zytosolischen Kalziums in das SR über die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ermöglicht. (Fabiato A. und Fabiato F. 1978, Bers 2001). Das Ruhepotential der Zelle wird dabei durch den

Auswärtstransport von Natriumionen bei Aufnahme von Kaliumionen durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wiederhergestellt. Während dieses Vorganges wird der Anteil des Kalziums, welcher von extrazellulär über die L-Typ-Kalziumkanäle ins Zytosol gelangt ist, über einen Austausch gegen Natrium aus dem Zytosol eliminiert und so ein konstanter intrazellulärer Nettokalziumgehalt erst ermöglicht. Diesen Vorgang erlaubt ein sarkollemmales Protein, der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) (Bers 2001, Bridge et al. 1990). Der relative Anteil der genannten Proteine an der Kalziumhomöostase des Kardiomyozyten ist dabei speziesabhängig. Das Verhältnis des Anteils an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination von SERCA2a : NCX1 beträgt bei Mensch und Kaninchen ca. 23:1, bei Maus und Ratte dagegen >10:1 (Bers 2001)

Abb. 1: Schema der elektromechanischen Kopplung



### 1.3. Der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX).

Der sarkollemmale NCX ist neben der SERCA das wichtigste Transportprotein für Kalziumionen und ist unter anderem hauptverantwortlich für das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht im Kardiomyozyten.

Der NCX ermöglicht den Transport von Kalzium durch die Zellmembran im Austausch gegen Natriumionen. Seine Aktivität wird als „vorwärts“ bezeichnet, wenn Natriumionen in die Zelle und Kalziumionen aus ihr heraus befördert werden, und dementsprechend als „rückwärts“, wenn die Ionen

in gegensätzliche Richtung transportiert werden. Die treibende Kraft dieses Transportes wird durch die Konzentration der beiden Ionen an der Innen- und Außenseite der Zellmembran und durch das Membranpotential der Zelle bestimmt. Der Transport ist dabei elektrogen, da bei dem Transport von drei Natriumionen gegen ein Kalziumion, drei positive Ladungen gegen zwei positive Ladungen ausgetauscht werden.

Die im Myokard vorherrschende Isoform wird NCX 1 genannt. Der NCX 1 besteht aus neun Transmembranhelices und einer großen zytoplasmatischen Schleife. In dieser Schleife befinden sich Bindungsstellen für Natrium- und Kalziumionen, die den Transportmodus regulieren. So sind die beiden Ionen sowohl Substrat als auch Regulator des Transportprozesses (Shigekawa et al. 2001).

#### **1.4. Die sarkoendoplasmatische Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA).**

Die sarkoendoplasmatische Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA), für die drei verschiedene Gene codieren und von denen bisher 5 verschiedene Isoformen beschrieben wurden, ist für die Sequestrierung des Kalziums in die intrazellulären Speicher verantwortlich. Dies geschieht unter ATP-Verbrauch und ist spannungsabhängig, so dass vom Membranpotential getriggert ein Transport erfolgt, was koordinierte Kalziumverschiebungen im Myozyten ermöglicht. Die im Myokard vorherrschende Isoform ist SERCA 2a, ein 997 Aminosäuren umfassendes Protein, das unter ATP-Verbrauch zyklisch  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoendoplasmatische Retikulum pumpt, wo es für den nächsten Kontraktionsablauf zur Verfügung steht. Da wie unten beschrieben, die Myofilamentaktivierung maßgeblich von der aus dem SR (sarkoplasmatischen Retikulum) ausgeschütteten Menge an Kalziumionen abhängt, kommen der Funktion und der Expression der SERCA eine entscheidende Rolle in der molekularen Genese der Herzinsuffizienz zu (Hasenfuss et al. 1994). Des Weiteren ist für die Herzinsuffizienz des Menschen typischerweise eine erhöhte NCX/SERCA-Ratio beschrieben. Bisher noch nicht grundlegend geklärte Mechanismen führen hier zu einer verminderten SERCA-Expression bei erhöhter NCX-Expression, welches funktionell zu einem Verlust von Kalziumionen aus dem SR und dem Zytosol führt, welches wiederum eine verminderte elektromechanische Kopplung zur Folge hat, die in der Herzinsuffizienz mündet.

Neben der Kalziumhomöostase hängt die korrekte posttranslationale Proteinmodifikation eminent von der endoplasmatischen Kalziumkonzentration ab, so dass auch hier der SERCA eine wichtige Rolle zukommt (Højmann Larsen et al. 2001).

Deshalb ist es für die vorliegende Arbeit auch von großem Interesse, neben der NCX-Transkriptionsrate auch die SERCA-Transkription unter den folgenden Bedingungen zu untersuchen, da die beiden Proteine in engem funktionellem Zusammenhang stehen

#### **1.5. Das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP)**

Die drei Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP (Brain natriuretic oder auch b-type natriuretic peptide) und CNP (C-type natriuretic peptide) bilden die Familie der natriuretischen Hormone. BNP wurde primär in Homogenaten von Gehirnen entdeckt, wird aber auch im Plasma nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen kommen jedoch im Myokard vor. BNP besteht aus 17 Aminosäuren und bildet einen Ring durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinmolekülen.

Außerhalb des Rings sind N-terminal neun und C-terminal 6 Aminosäuren. Es gibt insgesamt 3 natriuretische Peptidrezeptoren (NPR). Der NPR-Rezeptor ist eine wandständige Guanylatcyclase, die aus einer extrazellulären Andockungsstelle, einer transmembranösen Region sowie einem intrazellulären Anteil besteht, der die Umwandlung von GTP in cGMP, einem *second messenger*, katalysiert. Ebenso wie das atriale natriuretische Peptid (ANP) hat das BNP natriuretische und diuretische Wirkungen. Es erhöht durch Steigerung der glomerulären Filtration und eine Verminderung der tubulären Rückresorption von Natrium die Diurese. BNP und ANP vermindern zudem die Aldosteron/ Renin- Sekretion und setzen damit den Blutdruck herab. Es besteht also ein wesentlicher Zusammenhang zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Brockhoff et al. 2000).

Die Plasmaspiegel von ANP und BNP steigen bei Volumenexpansion sowie Drucksteigerungen in Vorhof und Ventrikel an. Eine Erhöhung der Myokard- und Plasmakonzentration von BNP kann schon im frühen Verlauf der Herzinsuffizienz nachgewiesen werden und korreliert sehr gut mit dem Ausmaß der Ischämie, der Ausdehnung des akuten Myokardinfarkts und der klinischen Ausprägung der Herzinsuffizienz (Davis et al. 1994). BNP ist ein Neurohormon welches ganz überwiegend im ventrikulären Myokard gebildet und sezerniert wird. Bei akuten transmuralen Myokardinfarkten zeigen hohe zirkulierende Spiegel (über 80 pg/ml) als unabhängiger prognostischer Faktor eine ungünstige Prognose für das erste Postinfarktjahr an (De Lemos et al. 2001). Aus dem Gesagten ist ersichtlich, dass BNP als ein sehr sensitiver Marker für kardiale Dysfunktion gilt, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit es als sinnvoll erachtet wurde, auch die Transkriptionsmenge dieses Proteins zu bestimmen, um den durch die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation entstehenden kardiomyozytären Stress auf molekularer Ebene zu dokumentieren.

### **1.6. Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GaPDH)**

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GaPDH) ist ein zytosolisches, weit verbreitetes Enzym, und spielt eine Schlüsselrolle bei der Glykolyse. Es katalysiert die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Biphosphoglycerat.

GaPDH existiert als Tetramer aus vier gleichen Untereinheiten, die aus jeweils 335 AS bestehen. Der N-Terminus ist für die Bindung von NAD<sup>+</sup> wichtig, der C-Terminus spielt bei der Bindung des Substrats eine wichtige Rolle. GaPDH wird schon sehr lange als sogenanntes *Housekeeping-Gene* betrachtet, dessen Expression als wenig reguliert gilt, daher wird es sehr oft als interner Standard bei der Quantifizierung von mRNA verwendet. So wurde auch in der vorliegenden Arbeit die mRNA zu diesem Zweck bestimmt.

### **1.7. Die Myofilamentaktivierung**

Die Kontraktion des Herzmuskels, d.h. eigentlich die Verkürzung der unzähligen Muskelfasern läuft über ein Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente, kleineren Untereinheiten in den Muskelfasern ab. „Motor“ dieser Bewegung ist eine ruderartige Bewegung von Myosinquerbrücken unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch. Diese kann natürlich nur unter immer wiederkehrender periodischer Verbindung dieser Querbrücken mit den Aktinfasern geschehen, dem sogenannten Querbrückenzyklus.



Die oben beschriebenen oszillierenden Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ermöglichen erst eine Kontraktion und deren Koordination, da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen während des Kontraktionszyklus an das Troponin des kontraktile Apparats binden und so die Bindungsstelle für die Myosinköpfchen am Aktin freigeben, wodurch eine Kontraktion der Myofibrillen erst möglich wird. Troponin besteht aus drei Untereinheiten: TnC (kalziumbindend), TnI (inhibitorisch) und TnT (tropomyosinbindend). Diese Untereinheiten interagieren Kalzium-abhängig miteinander.

Abb.2a: Wirkungsweise der Kalziumionen bei der Myofilamentaktivierung. Aktin- und Myosinfilament im Längsschnitt.

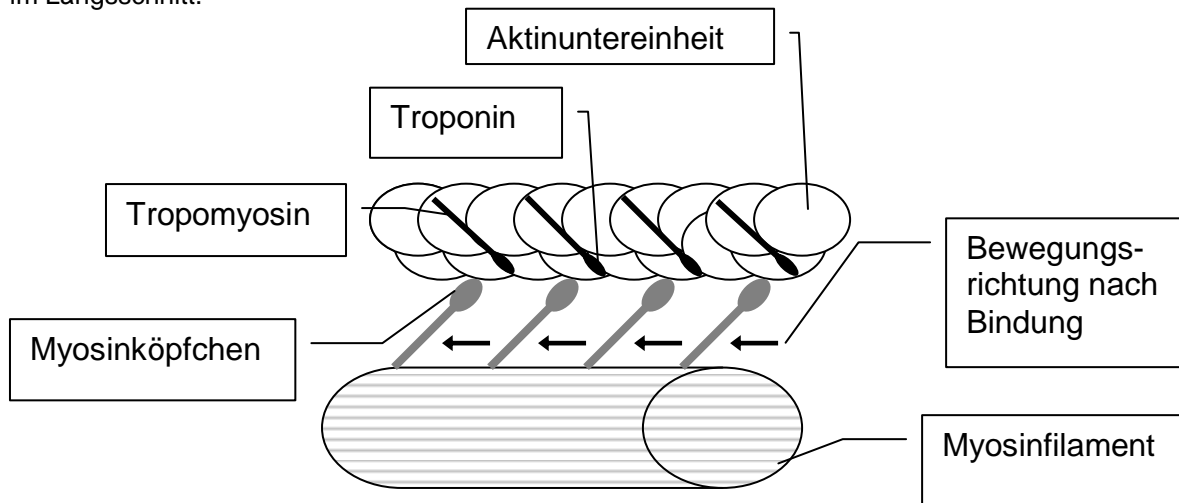
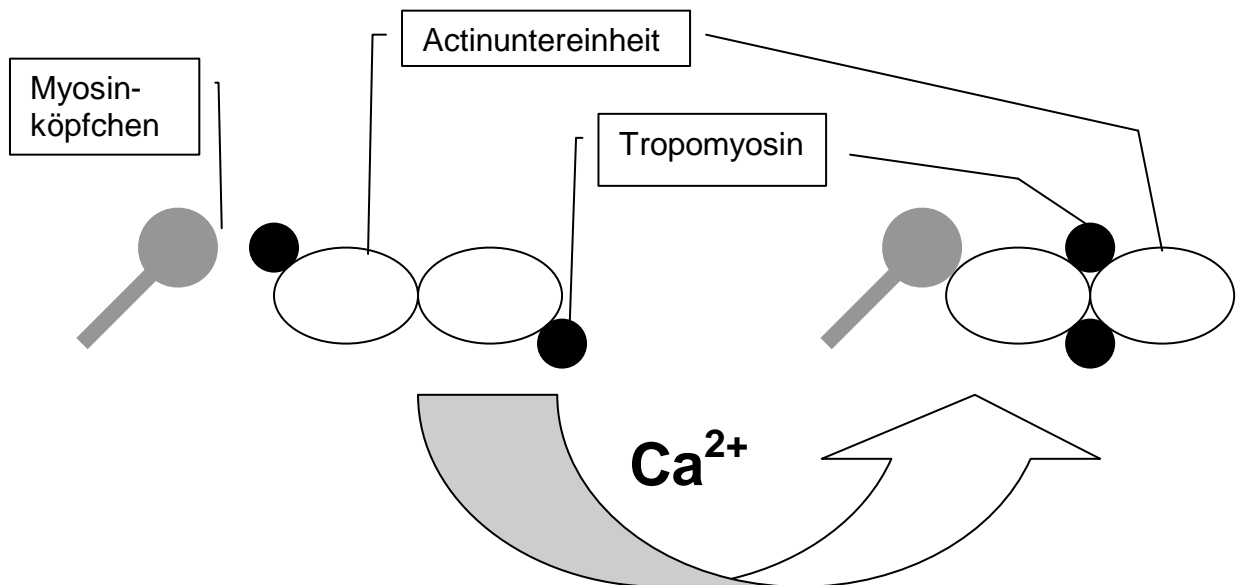


Abb.2b: Im Querschnitt:  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen werden von Troponin gebunden, worauf Tropomyosin in die Rinne zwischen den beiden Actinsträngen des Filaments gleitet und die Bindung des Myosinköpfchens an das Actinfilament ermöglicht.



### **1.8. Die molekulare Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und die Rolle des NCX**

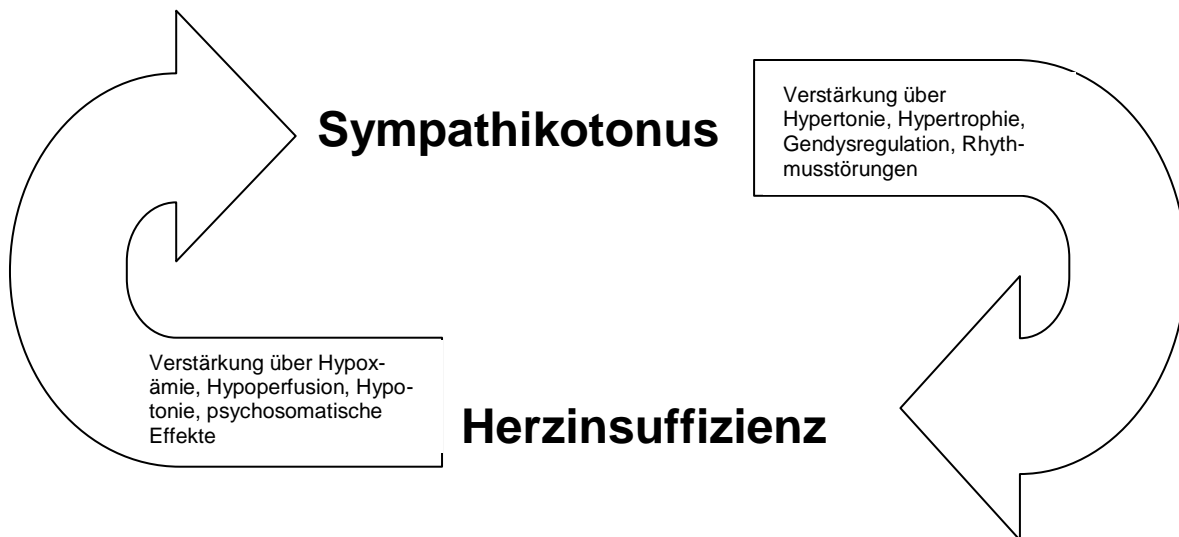
Es gibt zahlreiche Anhalte dafür, dass die Regulationsmechanismen der Kalziumhomöostase in der menschlichen Herzinsuffizienz nicht mehr adäquat agieren und somit Hypertrophie, Arrhythmie und Pumpleistungsverlust bedingen. Es ist bereits deutlich geworden, dass als Ursache einer gestörten elektromechanischen Kopplung eine veränderte Kalziumakkumulation des sarkoplasmatischen Retikulums einen signifikanten Anteil an der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz hat (Schillinger et al. 2003). Drei wesentliche Faktoren scheinen ursächlich für den verringerte Kalziumgehalt des SR: 1. Ein erhöhter Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  durch ein molekulares Leck im Ryanodinerezeptor. 2. Eine reduzierte Aktivität der SERCA. 3. Eine erhöhte transsarkolemmale Elimination von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den NCX. Die Kalziumakkumulation im SR hängt von der Aktivität der SERCA, relativ zur transsarkolemmalen Kalziumelimination durch den NCX ab. Studien die Proteinexpression von NCX und SERCA im Endstadium der Herzinsuffizienz untersuchten, kamen zu einem dreifach höheren NCX/SERCA Quotienten als bei gesunden Herzen, was eine relative Dominanz der NCX Transportleistung gegenüber der der SERCA nahe legt (Hasenfuss et al. 1999). Die funktionellen Konsequenzen dieser Beobachtungen werden kontrovers diskutiert und hängen auch von weiteren Faktoren wie Aktionspotentialdauer, Sensitivität der Myofilamente, pH-Wert, Metabolismus und dem transmembranen Gradienten für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  ab (Bers 2001). Als mögliche Folge einer veränderten NCX-Expression wird ein erhöhter Verlust intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär über den NCX und in Folge eine verbesserte diastolische, bei Verschlechterung der systolischen Funktion angenommen. Andere Autoren wiederum berichten über eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme von extrazellulär über den NCX, als Kompensationsmechanismus für eine verminderte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR über die SERCA. Nicht zuletzt wurde auch eine nicht unerhebliche Mitverantwortung dieser Phänomene an der Entstehung von Arrhythmien postuliert (Schillinger et al. 2003). Interessanterweise konnten hier zwei Phänotypen unterschieden werden. Einerseits Herzen im Endstadium der Insuffizienz mit dominierendem Anstieg der NCX-Expression, und andererseits Herzen mit dominierender Verminderung der SERCA-Expression. In der ersten Gruppe ist die diastolische Funktion erhalten, da die zelluläre Gesamtkapazität zur zytosolischen Kalziumelimination relativ hoch ist, wobei die systolische Funktion gestört ist, da Kalzium Zell auswärts eliminiert wird und der SR Kalziumgehalt sinkt. In der zweiten Gruppe ist die Kalziumaufnahme in das SR als auch die Kalziumelimination Zell auswärts vermindert, so dass sowohl systolische als auch die diastolische Funktion stark beeinträchtigt sind. Der in diesem Zusammenhang zu beobachtende vermehrte Transport im Vorwärtsmodus des NCX ist dabei arrhythmogen, da durch den vermehrten Einwärtstransport von Natriumionen eine Frühdepolarisation der Zelle begünstigt wird. Außerdem wurde im Rahmen der Überexpression von NCX eine höhere Sensibilität gegenüber Digitalispräparaten und den schädigenden Einflüssen von freien Sauerstoffradikalen beobachtet, die gerade im Rahmen der Koronarenherzkrankheit entstehen (Schillinger et al. 2003).

### **1.9. Regulationen durch das sympathische Nervensystem bei Herzinsuffizienz**

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems ist eine charakteristische Beobachtung im Krankheitsverlauf einer Herzinsuffizienz und kann vermutlich teilweise die veränderte Aktivität von

Proteinen des Metabolismus und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes kompensieren, so dass die Kontraktilität in gewissen Maßen aufrechterhalten werden kann. Allerdings vermindert sich im Endstadium der Herzinsuffizienz die zelluläre Antwort auf  $\beta$ -Rezeptoragonisten, da die Rezeptoranzahl an der Zelloberfläche vermindert ist, was eine chronische Erhöhung der endogenen Katecholaminausschüttung zur Folge hat (Bristow et al. 1982). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Stimulation myokardialer  $\alpha_1$ -Rezeptoren, eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Folge hat wie sie üblicherweise bei der menschlichen Herzinsuffizienz zu beobachten ist. Dieser Effekt wird über die Induktion von Wachstumshormonen und Veränderungen in der Proteinexpression vermittelt und führt im schlimmsten Fall zur letalen Herzinsuffizienz (Morgan und Baker 1991, Molkentin und Dorn 2001).

Abb. 3: Der pathophysiologische Circulus vitiosus



Es wird daher vermutet, dass die Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine überschießende und schädigende Reaktion ist, die mit einer verhängnisvollen Prognose assoziiert ist (Cohn et al. 1984). Nicht zuletzt wurde bereits eine signifikante Korrelation zwischen Noradrenalin-Plasma-Spiegeln und der myokardialen Proteinmenge des NCX im Endstadium der Herzinsuffizienz (NYHA IV) beschrieben (Schillinger et al. 2002). Zusätzlich haben diverse in vitro und in vivo Studien an der Ratte eine Erhöhung von NCX mRNA- und Proteinmengen, nach kontinuierlicher Stimulation mit Katecholaminen gezeigt (Reinecke et al. 1997, Golden et al. 2000, Golden et al. 2001).

### 1.10. Fragestellung der Arbeit

Die Regulationsmechanismen der Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine der Herzmuskelzelle sind noch weitgehend unklar. Von Lastabhängigkeit über humorale Faktoren bis zu metabolischen Phänomenen werden viele Ansätze verfolgt. Da ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen neue pathophysiologische Einblicke gewähren würde und die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Strategien ermöglichen könnte, wurde in dieser Arbeit die Regulation der NCX-Expression untersucht. Gleichzeitig wurde die mRNA der Gene SERCA und BNP bestimmt, da sie wie oben bereits angesprochen in eminenten Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und NCX-Dysregulation stehen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von kontinuierlicher  $\alpha_1$ -Rezeptorstimulation mit Phenylephrin auf kultivierte

Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte untersucht. Während bei Kardiomyozyten vom Kaninchen keine Regulation der NCX-mRNA zu beobachten war, wurde in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, eine Zunahme der NCX-mRNA bei den Rattenkardiomyozyten beobachtet. Es wurde die Hypothese erstellt, dass für die Induktion der NCX mRNA-Expression im Kaninchen, Vorlast ein entscheidender Faktor sein könnte. Deshalb wurden auch rechtsventrikuläre Trabekelpräparationen aus dem Kaninchen unter elektrischer Stimulation und mit optimaler Vorlast, auf eine  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Expressionsänderung des NCX untersucht. In diesen Experimenten wurde eine signifikante Verminderung der NCX-mRNA-Expression beobachtet, die in weiteren Experimenten unter Präsenz des  $\alpha_1$ -selektiven Rezeptorblockers Prazosin beziehungsweise unter Präsenz des PKC-Inhibitors Bisindolmaleimide (GF 109203 X) oder ohne Vorlast nicht zu ermitteln war. Dies zeigt, dass die adrenerg vermittelte Veränderung der NCX-mRNA im Kaninchen über den  $\alpha_1$ -Rezeptor unter Mitbeteiligung von Vorlast und unter Aktivierung der PKC vermittelt wird.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

M 199 Zellkulturmedium, Protease XIV, Taurin, D+L-Carnitin, Kreatin, Laminin, 2,3-Butanedione Monoxime, Phenylephrin (Pe), Prazosin (Praz) und GF 109203X wurde bei Sigma erworben. Kollagenase Typ II wurde bei Biochrom erworben. Alle anderen benutzten Substanzen wurden bei kommerziellen Anbietern mit höchstem Reinheitsgrad bezogen. Die Substanzen wurden so weit möglich alle in Aqua bidestillata gelöst, mit Ausnahme des PKC-Inhibitor GF 109203 X der nur in Dimethylsulfoxid in ausreichender Konzentration lösbar war. PE, PRAZ und GF109203 wurden in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst, in kleine Mengen steril aliquotiert und bei -8°C bzw. +7°C für GF 109203 X gelagert.

### **2.2. Experimentierlösungen**

Aus den unverderblichen Substanzen wurden zehnfach höher konzentrierte Stammlösungen hergestellt, die in sterilen Gefäßen bei 4 °C gelagert wurden und am Tag des Experiments mit den inkonstanten Substanzen wie Natriumhydrogencarbonat, 2,3-Butane-Dione-Monoxime (BDM), Glukose und Kalziumchlorid ergänzt wurden und auf die benötigte Konzentration mit Aqua bidest. verdünnt wurden. Für die Myozytenisolation wurde aus 10-fach konzentrierter Tyrode-Stocklösung am Versuchstag Tyrodelösungen mit verschiedenen Modifikationen, für die verschiedenen Isolationsstufen vorbereitet und steril filtriert.

Tabelle 1: Tyrode-Grundlösung

Bezeichnung	Konzentration
NaCl	137 mmol/l
KCl	5,4 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
HEPES	20mmol/l

Tabelle 2: Kalziumhaltige Tyrode-Lsg. I

Bezeichnung	Mengen
Tyrode Grundlösung	500 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/l	55 ul

Tabelle 3: Kalziumfreie Tyrode-Lsg. II

Bezeichnung	Mengen
Tyrode Grundlösung	200 ml
Glucose	5,4 g
Penicillin	2000 i.U.
Streptomycin	2 mg

Tabelle 4: Enzym-Lösung

Bezeichnung	Mengen
Tyrode Grundlösung	80 ml
Taurine	600 mg
D-L-Glutamat	94 mg
D-L-Carnitine	31 mg
Collagenase II	80 mg
Protease XIV	3,2 mg
CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/l	2 ul

Tabelle 5: Enzym-Stop-Lösung

Bezeichnung	Mengen
Tyrode Grundlösung	300 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/l	15 ul
Albumin Fraktion V	6 g
BDM	607 mg

Für die Zellkulturexperimente, beziehungsweise für die Muskelstreifenexperimente nach der Stabilisierungsphase, wurde zu 500 ml des gebrauchsfertigen M 199 Kulturmedium, Taurin, D+L-Carnitine, Kreatin, D+L-Glutamat, Penicillin und Streptomycin hinzugegeben, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Stammlösungen bzw. modifiziertes M199 Medium, wurden innerhalb einer Woche verbraucht oder andernfalls verworfen. Als Dissektionslösung, mit der das Herz direkt nach Entnahme perfundiert wurde, diente sowohl bei den Myozytenkulturen als auch bei den Muskelstreifenexperimenten, eine mit BDM ergänzte Krebs-Henseleit Lösung die kein Kalzium enthielt, da ja primär Kardioplegie für die Präparation erreicht werden musste.

Tabelle 6: Dissektionslösung

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl <sub>2</sub>	116,0 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,0 mmol/l
*2,3-Butane-Dione-Monoxime (BDM)	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	20,0 mmol/l
Glukose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,0 mmol/l
Kaliumchlorid	KCl	5,0 mmol/l
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mmol/l
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	1,2 mmol/l
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l

Als Standard-Lösung für die Muskelstreifenexperimente diente die Krebs-Henseleit Lösung. In ihr wurden die Muskelstreifen unter Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) zunächst zur Kontraktion gebracht und stabilisiert.

Tabelle 7: Krebs-Henseleit Lösung

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl <sub>2</sub>	116,0 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,0 mmol/l
Glukose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,0 mmol/l
Kaliumchlorid	KCl	5,0 mmol/l
Kalziumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1,75 mmol/l
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mmol/l
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	1,2 mmol/l
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l

Gebrauchsfertigem M 199 Medium, wurde einige Substanzen hinzugegeben und danach steril filtriert, so das ein modifiziertes M 199 Medium entstand, dass für die Langzeitkultur von Herzmuskelzellen und Muskelstreifen genutzt wurde.

Tabelle 8: Modifiziertes M 199 Medium

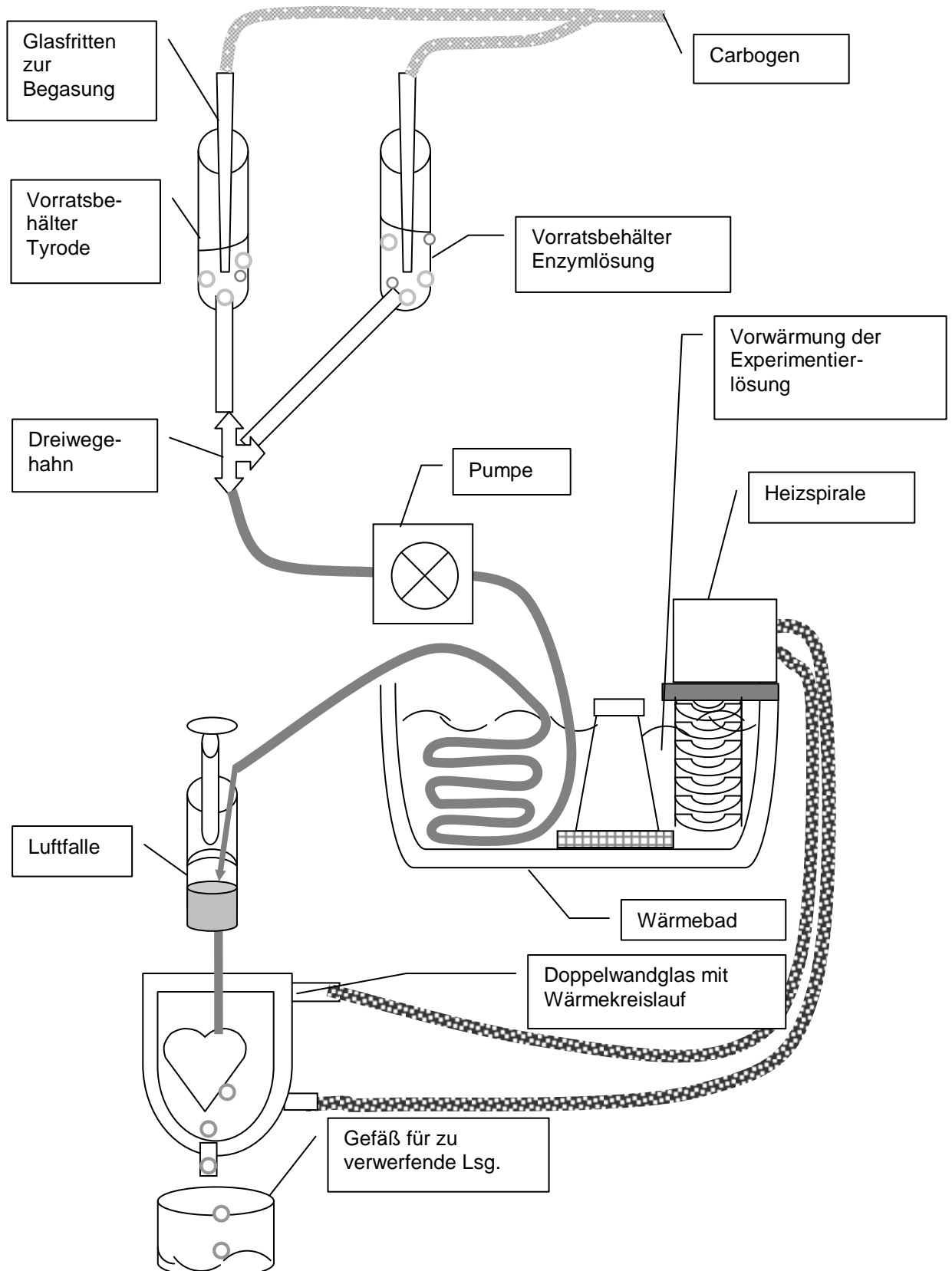
Bezeichnung	Konzentration
D,L-Carnitin	4,0 mmol/l
Creatin	5,0 mmol/l
Taurin	5,0 mmol/l
D,L-Glutamin	2,0 mmol/l
Penicillin	100 iU/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml

### 2.3. Versuchsaufbau der Myozytenisolation

Die Myozytenisolutionsanlage wurde aus sterilen Einmalartikeln bzw. wo möglich aus dampfsterilisierten Glasartikeln aufgebaut. Nach jeder Isolation wurde die Anlage mit 35%iger

Essigsäure gespült und danach mit mehreren Litern sterilem Aqua bidest. gespült. Nach dreimaliger Myozytenisolation oder aber einer Standzeit von einer Woche wurde die Anlage bis auf das Wasserbad komplett neu aufgebaut, um einen möglichst hohen Reinheitsgrad aufrechtzuerhalten. Der Aufbau der Anlage entspricht bis auf einige Modifikationen dem Versuchsaufbau den Langendorff (Langendorff 1895) bereits bei seinen Experimenten zur Herzmuskelphysiologie entwickelte.

Abb.4: Skizze der modifizierten Langendorffperfusion



## 2.4. Versuchsaufbau der Muskelstreifenanlage

Vor der Beschreibung des Versuchsaufbaus sollte darauf hingewiesen werden, dass alle Versuche auf zwei teilweise zusammenhängenden Anlagen parallel durchgeführt wurden. Gemeinsam genutzte Komponenten beider Anlagen waren die Pumpe für die Experimentierlösungen, der Perfusor, der Stimulator und der Computer zur Datenerfassung, wobei der Kreislauf der Experimentierlösung zwischen Kontrolle und Verum immer getrennt war. Im Aufbau waren beide Anlagen identisch, weshalb die folgende Beschreibung von nur einer Versuchsanordnung ausgeht.

Im Zentrum der Anlage stand das so genannte Organbad, in dem sich das Muskelpräparat umspült von Experimentierlösung befand. Der detaillierte Aufbau des Bades ist der Querschnittszeichnung in Abbildung 6.) zu entnehmen. Das Bad besteht aus einer kleinen Wanne, die in eine etwa 5 mm dicke Acrylscheibe gefräst wurde. Die Acrylscheibe war in einen über das Heizungssystem erwärmten Aluminiumblock eingelassen. In die Wanne tauchten zwei Vorrichtungen zur Befestigung des Präparats ein. Auf der einen Seite ist dies ein kleines Körbchen, welches aus Platindraht gebogen wurde. Ihm gegenüber befand sich ein Haken aus Platindraht. Der Haken ist mit einer Mikrometerschraube so verbunden, so dass man ihn langsam längs des Bades bewegen kann um den Muskel vorzudehnen. Das Körbchen auf der anderen Seite ist höhenverstellbar mit einem piezoelektronischen Kraftaufnehmer „KG4“ der Firma Scientific Instruments (Heidelberg) verbunden. Des Weiteren befinden sich im Organbad zwei parallel eingeklebte Silberdrahtelektroden, die die Feldstimulation des Muskels ermöglichen. Die Verbindung zwischen Kraftaufnehmer und Körbchen und zwischen Haken und Mikrometerschraube wurde aus einer kliniküblichen Stahlkanüle hergestellt. Diese Art der Muskelaufhängung wurde gewählt, da beschrieben wurde, dass sie besonders schonend für das Präparat ist (de Tombe und ter Keurs 1991, Janssen und de Tombe 1997).

Mit einer Kreiswalzenpumpe wird die Experimentierlösung aus dem Vorratsbehälter in das Organbad befördert. Auf der dem Zulauf des Organbades gegenüberliegenden Seite befindet sich ein Ablauf, über den die Experimentierlösung abgesaugt wird. Von dort gelangt die Experimentierlösung über eine Pumpe wieder zurück in den Vorratsbehälter oder direkt in ein Abfallgefäß. Die Geschwindigkeit der Pumpe wurde so gewählt, dass in einer Sekunde der halbe Flüssigkeitsinhalt des Organbades ausgetauscht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich ein Perfusor verwendet, der die kontinuierliche Zugabe kleinster Mengen von PE- und Praz-Lösungen in die Vorratsbehälter ermöglichte. Alle Teile des Leitungssystems für die Experimentierlösung waren aus Kunststoff. Es wurden weitgehend klinikübliche Standardartikel mit Luer-Lock-System wie Infusionsleitungen, Perfusorschläuche und Dreiwegehähne der Firmen B. Braun und Fresenius verwendet. Sowohl Zu- als auch Ablauf beider parallel betriebener Anlagen wurden von derselben Pumpe angetrieben. Es handelte sich dabei um eine Peristaltikrollenpumpe mit acht Kanälen der Firma Masterflex. Die Pumpenschläuche der Firma Ismatec waren aus Tygon und hatten einen Innendurchmesser von 2,79 mm.

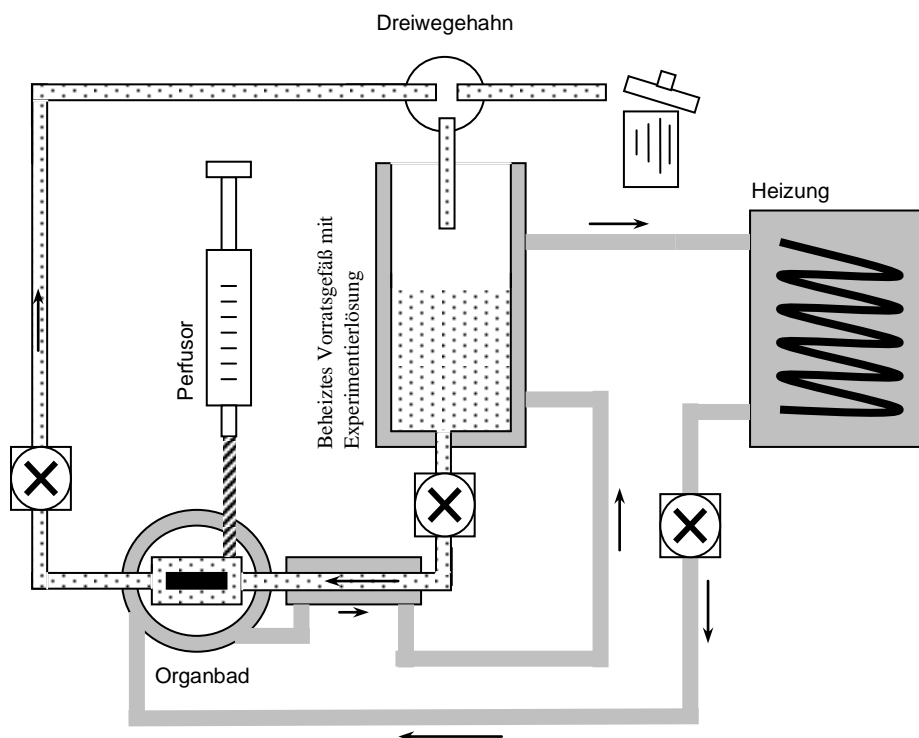
Als Vorratsbehälter für die Experimentierlösung diente ein doppelwandiger, oben geöffneter, zylindrischer Glasbehälter. Das Fassungsvermögen des Behälters betrug ungefähr 300 ml. Für ein Experiment wurde er mit 100 ml Experimentierlösung befüllt. Während der gesamten Dauer des



Versuchs wurde die Experimentierlösung über einen Mikrofilter aus Glas (Firma Schott, Porosität 1) mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Dies diente zum einen der Einstellung des pH-Wert, als auch zum anderen der Anreicherung der Experimentierlösung mit Sauerstoff. Der Zwischenraum zwischen den Wänden wurde von Heizmittel durchströmt. So konnte die Temperatur auf ca. 37°C stabil gehalten werden.

Aus verschiedenen Gründen war es sinnvoll, die Temperatur der Experimentierlösung auf einen Wert im Bereich der Körpertemperatur zu erhöhen. Erstens kommt man so näher an physiologische Bedingungen heran, zweitens löst sich Carbogen besser bei höheren Temperaturen und drittens reduziert sich dabei die Dauer einer Muskelkontraktion deutlich. Dies wiederum ist Voraussetzung dafür, dass die diastolische Kraft auch bei Stimulation mit für das Kaninchen physiologischen hohen Frequenzen konstant bleiben kann. Kernstück der Heizung war das Wasserbad „M3“ der Firma Lauda. Das gewärmte Wasser durchströmte neben dem doppelwandigen Vorratsbehälter, einen den Lösungsschlauch umgebenden dickeren Schlauch auf der gesamten Strecke bis zum Organbad. Die Heizleistung wurde so eingestellt, dass die Temperatur im Organbad zwischen 36,0 °C und 36,5 °C lag. Die erforderliche Heiztemperatur des Wasserbades dafür betrug 39,0 °C.

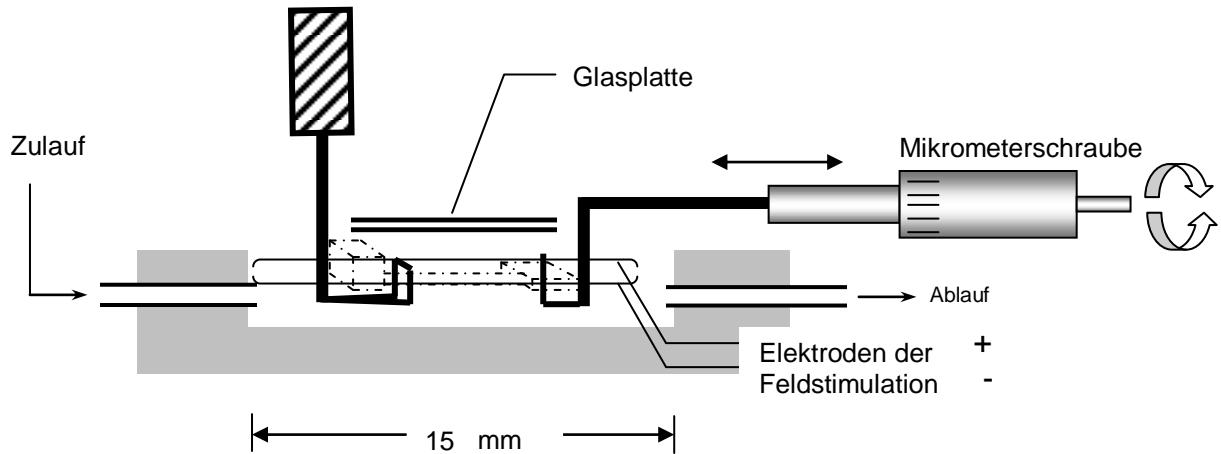
Abb.5: Versuchsaufbau der Muskelstreifenanlage



Das Muskelpräparat wurde durch einen elektrischen Spannungsimpuls zwischen den Silberelektroden im Organbad zur Kontraktion angeregt. Als Reizquelle diente ein Mehrkanal-Stimulator der Firma Scientific Instruments (Heidelberg). Die Stimulationsspannung und die Frequenz waren für beide Kanäle gleich. Vor Gebrauch wurde der Stimulator mit Hilfe eines Speicher-Oszilloskops geeicht. Die Stimulationsspannung lag dabei 10% über der individuellen Reizschwelle zwischen 3-5 V.

Zur Messung der Kraft wurde ein Kraftaufnehmer (KG4) und ein Brückenverstärker (DUBAM) aus dem Angebot der Firma Scientific Instruments (Heidelberg) verwendet. Vor Gebrauch wurde der Kraftaufnehmer mit fünf unterschiedlichen Gewichten geeicht.

**Abb. 6: Aufhängung der Muskelpräparate im Detail**



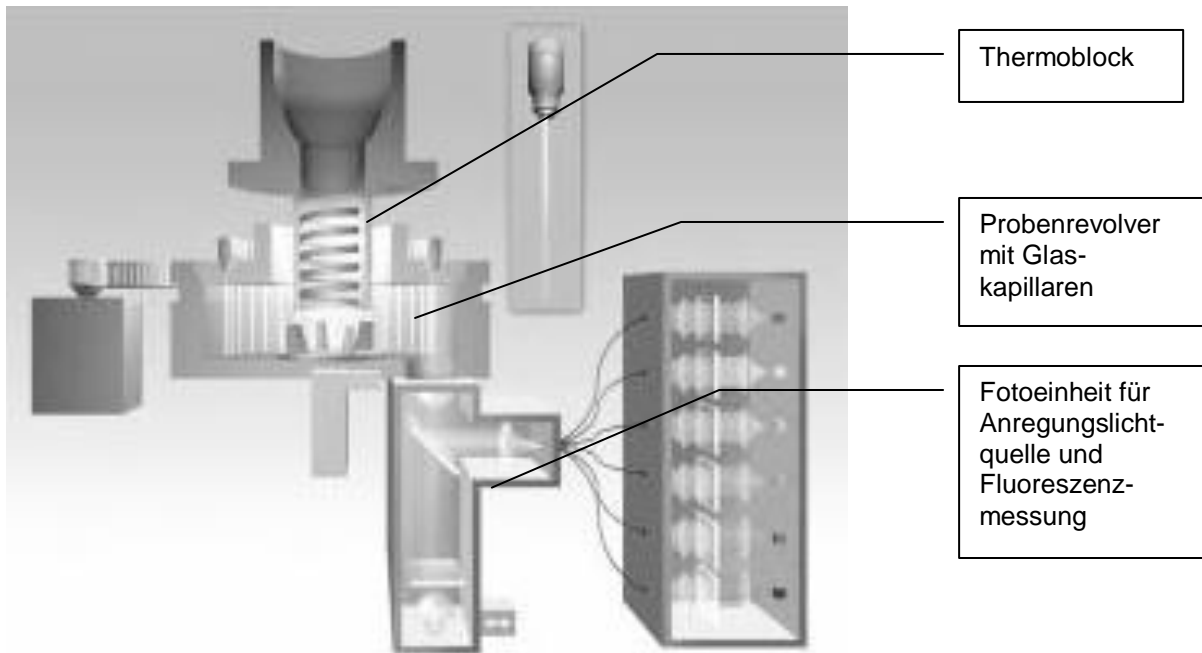
Vor und nach jedem Experiment wurde die Anlage mit 35%iger Essigsäure und folgend mit 400 ml sterilem Aqua dest. durchgespült, um Kontamination durch diverse Keime vorzubeugen. Das Vorratsgefäß wurde mit einer Flaschenbürste gereinigt. Die Mikrofilter zur Begasung wurden abgebürstet und mit sterilem Aqua dest. durchspült.

Mindestens alle vier Wochen wurde das Schlauchsystem komplett ausgewechselt und danach die beiden Kraftaufnehmer mit definierten Gewichten in Vertikalposition geeicht. Glasteile und das Organbad wurden über Nacht in phosphatfreiem RBS Laborreiniger eingelegt. Auch alle Teile der Muskelaufhängung mit Kontakt zur Experimentierlösung wurden im Zuge dieser Überholung der Anlage ausgewechselt. Bei verdächtigen Verunreinigungen wurden Teile auch schon vor Ablauf ihrer vierwöchigen Einsatzzeit ausgetauscht.

## 2.5. Der Light-cycler

Das LightCycler Diagnostics © PCR-Analysesystem der Firma Roche wird schon seit einigen Jahren sehr erfolgreich für die Analytik klinischer Fragestellungen vor allem in der Hämato-Onkologie aber auch bei medizinischen Forschungsfragestellungen eingesetzt und wird als allgemein gut etabliert angesehen. Es handelt sich dabei um einen Thermocycler, in dem die Proben auf einem motorgetriebenen Revolver geführt werden, um neben der normalen PCR- auch in eine Fotokammer verbracht werden zu können, damit Fluoreszenzanalysen nach Anregung mit Licht spezifischer Wellenlängen durchgeführt werden können. So wird eine Verfolgung der Zunahme an Doppelstrang DNA in Echtzeit, sowie je nach Zugabe spezifischer Primer, eine sehr genaue qualitative und quantitative Analyse in relativ kurzer Zeit ermöglicht.

Abb. 7 Schematischer Aufbau des Roche Lightcyclers®



## 2.6. Isolation und Kultivierung von Kardiomyozyten aus Kaninchen- und Rattenherzen

Weibliche Chinchylla Bastard Kaninchen (Gewicht zwischen 1,5-2,0 kg) wurden mit 1000 i.E. Heparin i.V. antikoaguliert um Thrombembolien während der Präparation vorzubeugen. Darauf folgend wurden die Tiere mit Natrium-Thiopental (50 mg/kg) in eine der Ohrvenen narkotisiert. Die weiblichen Wistar Ratten (200-250g) wurden mit Halothan® per inhalationem narkotisiert und durch Heparininjektion in den linken Vorhof bei bereits eröffnetem Thorax antikoaguliert. Nach einem quer verlaufenden Bauchschnitt wurde der Thorax transdiaphragmal eröffnet, das Herz nach beidseitiger Rippendurchtrennung schnellst möglich frei präpariert und mit mindestens 5 mm der ascendierenden Aorta entnommen, kurz in 4°C temperierter Tyrode gewaschen und an eine modifizierte Langendorffperfusionsanlage angeschlossen in dem die Aorta über eine 20 G Kanüle gestülpt und mit einem Vicrylfaden befestigt wurde und das Herz so retrograd perfundiert werden konnte. Unmittelbar nach Befestigung wurde das Herz für 5-8 min. mit auf 36,0°C temperierter Tyrode I Lösung (siehe Tab. 1) perfundiert, die mit 100% O<sub>2</sub> begast wurde. Nach dem die Kontraktionen wieder eingesetzt und sich stabilisiert hatten, wurde die Perfusionslösung für 12-15 min. auf die Ca<sup>2+</sup>-freie Tyrode II Lösung gewechselt. Der Ca<sup>2+</sup>-Entzug hat den Schluss der Gap-junctions der Herzmuskelzelle zur Folge, so dass die Separation der Zellen initialisiert wurde. Im weiteren Verlauf wurde der Verdau der extrazellulären Matrix eingeleitet, in dem die Perfusionslösung für 12-15 min. auf die Tyrode-Enzymlösung gewechselt wurde. Bei der Isolation von Kaninchenkardiomyozyten wurde der Verdau mit der Tyrode-Stop-Lösung beendet, die beiden Vorhöfe sowie die großen Gefäße entfernt und das verbleibende ventrikuläre Gewebe in Tyrode III-Lösung überführt. In dieser Lösung wurde das Gewebe vorsichtig mit einer Schere zerkleinert und die Zellen durch langsames Schwenken separiert. Bei der Isolation von Rattenkardiomyozyten entfiel der Enzymstop. Zerkleinern und Separieren der Zellen wurde nach entfernen von Vorhöfen und der großen Gefäßen in Tyrode-Enzym-Lösung

durchgeführt. Die bei beiden Spezies erhaltene Einzelzellsuspension wurde dann durch Nylongaze (Maschenweite 200  $\mu\text{m}$ ) gefiltert um nicht verdaute Anteile oder tote, konglomerierte Zellen zurückzuhalten. Die Zellsuspension wurde dann schrittweise höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Tyrodelösung ausgesetzt. Die erhaltene Suspension wurde anschließend in eine Sedimentationslösung überführt die ein Absinken der toten Zellen verhindert, so dass nach Entfernen des Überstandes fast ausschließlich lebende Zellen im Medium zu finden sind. Ein Teil der sedimentierten Zellen (Suspension von 50 $\mu\text{l}$ ) wurde mit Methylenblau angefärbt (färbt nur Zellen mit nicht intakter Zellmembran) und in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die somit in ihrem Anteil bestimmten überlebenden Zellen wurden für die folgenden Experimente auf Kulturschalen ausplattiert.

Die Myozyten wurden in einer Dichte von  $1,4 \times 10^3 / \text{cm}^2$  sogenannter rod-shaped cells (d.h. auf Grund Ihrer Rutenform als definitiv lebend zu identifizierende Zellen) auf zuvor mit Laminin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichteten Kulturschalen aufgebracht, nach zwei Stunden dreimal mit Medium gewaschen um die nicht anhaftenden und damit toten Zellen zu entfernen und dann für 24h im Brutschrank ( $\text{CO}_2$  – Auto-Zero, Heraeus Instruments, Hanau) kultiviert. Zu dem in den Kontrollgruppen eingesetzten M 199 (1,75 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  und kein PE) wurde in den anderen Gruppen PE (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) bzw.  $\text{CaCl}_2$  (3,0 mmol/L) zugesetzt. Nach 24h Kultur wurden die Zellen mit 5 mL PBS-Lösung gewaschen, mit einem Zellschaber aus Latex in 5mL PBS überführt, bei 1500 U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert und die Zellpellets nach pipettieren des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zu weiteren Analyse aufbewahrt.

## **2.7. Präparation, Kultivierung und Registrierung von mechanischen Parametern der Herzmuskelstreifen von Kaninchen**

Weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen (Gewicht:1,5-2,0 Kg) wurden mit Natrium-Thiopental (50 mg/kg KG) i.V. narkotisiert und erhielten ebenfalls 1000 i.U. Heparin zur Antikoagulation in die Ohrvene. Das Herz wurde schnellst möglich frei präpariert und per retrograder Perfusion über die kanülierte Aorta mit Dissektionslösung (Tabelle 6) gewaschen. Die Dissektionslösung enthielt im Gegensatz zur Experimentierlösung BDM, welches durch reversible Interaktion mit den Myosinquerbrücken der Myofilamente die Kontraktion des Herzmuskels unterbindet. Es wurde der Dissektionslösung zugesetzt, um die Kontraktion der isolierten Trabekel zu unterdrücken aber auch um einen ungestörten Ablauf und minimalen Energieverbrauch des Herzens während der Präparation sicherzustellen. Während des ganzen Vorgangs wurden die Lösungen bei einer Temperatur von  $36,5^\circ\text{C}$  mit einem Carbogen Gasgemisch (95%  $\text{O}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$ ) über eine Glasfritte (Schott) begast, um einen pH-Wert von 7,4 aufrechtzuerhalten. Unter sauberen Bedingungen wurde unter einem Stereomikroskop (Olympus) mit Hilfe von Instrumenten aus der Augen Chirurgie, durch einen Schnitt durch den Truncus pulmonalis der Septum nah fortgeführt wurde, der rechte Ventrikel eröffnet. Von der nun frei liegenden Wand des rechten Ventrikels wurden pro Herz jeweils mindestens zwei freie Trabekelstreifen präpariert, von denen immer ein Präparat pro Herz als Kontrollpräparat diente. Des Weiteren wurde aus Gründen der Qualitätskontrolle immer auch eine Frischprobe genommen, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Unter 40-facher Vergrößerung des Stereomikroskop

wurden die Dimensionen der Präparate bestimmt. Diese lagen im Durchschnitt bei einer Breite von  $0,45 \pm 0,03$  mm, einer Dicke von  $0,39 \pm 0,03$  mm und einer Länge von  $4,29 \pm 0,20$  mm. Die Trabekel wurden mit Hilfe einer zum *Muskelsauger* modifizierten Insulinspritze zur Versuchsanlage transferiert und horizontal im Organbad platziert, in dem das Präparat an einem Ende in dem körbchenförmig gestalteten Stück Platindraht, welches mit einem Piezokraftaufnehmer verbunden war, zu liegen kam und am anderen Ende an dem spießförmigen Stück Platindraht, welches mit einer Mikrometerschraube verbunden war, einfach aufgespießt wurde. Schon während der Trabekelpräparation wurde an den beiden Enden Würfel aus Ventrikelwandgewebe geformt, die das genannte Aufhängungsverfahren ermöglichen, ohne den später kontrahierenden Anteil des Präparats zu beschädigen. Wurden Präparationsfehler bemerkt, also z.B. eine Überdehnung des Präparates, eine Berührung des Muskelstreifens oder eine insuffiziente Heparinisierung des Kaninchens mit resultierender Myokardinfarzierung, so wurde das Präparat verworfen.

Die Präparate wurden über eine Feldstimulation, die durch zwei Silberelektroden im Organbad erzeugt wurde, mit einer Frequenz von 1 Hz bei einer Spannung von 3-5 V stimuliert und so zur Kontraktion gebracht. Die Signale des Piezokraftaufnehmers wurden elektrisch verstärkt, mit Hilfe einer auf LabView® basierenden Software aufgenommen und ausgewertet, wobei die Kraft der jeweiligen Präparate auf ihre Querschnittsfläche normalisiert wurde und so in der Einheit  $\text{mN/mm}^2$  angegeben wurde. Die initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der KH-Lösung von 0,25 mmol/l, wurde schrittweise (um 0,25 mmol/l) auf 1 mmol/l erhöht und dann die elektrische Stimulation begonnen. Wenn die Präparate anfangen zu kontrahieren, wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1,75 mmol/l erhöht und nach einer Stabilisierungsphase mit der Vordehnung der Präparate begonnen, bis eine diastolische Ruhespannung von 2-4  $\text{mN/mm}^2$  erreicht wurde. Dieser Wert reflektiert eine physiologische Sarkomerlänge unterhalb  $L_{\text{max}}$ -Sarkomerlänge, bei der die maximal entwickelte Kraft des Trabekels erreicht wird- und liefert die besten Kraftwerte bei Langzeitarbeit des Präparates (Kentisch et al. 1986).

Eines der relativ seltenen Probleme der Methode, welches erst unter Stimulation zutage trat, waren anhaltende autonome Rhythmen des Präparats. Drei Lösungsstrategien wurden hierfür gewählt:

1. Die Stimulation wurde vorübergehend abgeschaltet, bis keine Kontraktionen mehr nachweisbar waren.
2. Die Spannung wurde kurzfristig bis auf 5 V erhöht, um den Muskel auf die Frequenz der Stimulation zu zwingen.
3. Die Stimulationsfrequenz wurde kurzzeitig auf 2 Hz erhöht.

Die drei Strategien konnten die Arrhythmien in der Mehrzahl der Fälle beseitigen. Führte auch mehrfache Wiederholung aller Ansätze nicht zu einer Beruhigung des Muskels, so mussten die Präparate verworfen werden. Nach einer weiteren Stabilisierungsphase wurde die Perfusionslösung auf modifiziertes M 199 Medium gewechselt, welches durch verschiedene Zusätze, u. a. Fettsäuren und Antibiotika, die relativ langen Kulturzeiten erlaubt. Wenn hier nach die Kontraktionsparameter stabil waren, wurde die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen für 3, 6 bzw. 10h begonnen. In den sogenannten *slack*- Experimenten, bei denen die Trabekel ohne diastolische Vorspannung

kontrahierten, wurden die Präparate zu keinem Zeitpunkt gedehnt, aber gleichwertige Stabilisierungsphasen und Inkubationsbedingungen eingehalten. Die permanente Kontraktion der Präparate wurde optisch überwacht, da ja kein Kraftsignal messbar war. Eines der beiden Präparate wurde mit Medium perfundiert, welches mit PE (10µmol/l), PE+ Praz (13µmol/l), PE + GF109203X (1µmol/l) oder PE + Praz + Ca<sup>2+</sup> (3 mmol/l) ergänzt wurde. Das Kontrollpräparat wurde mit normalem M 199 Medium, unter ansonsten identischen Bedingungen, bei Zugabe der in der Verumgruppe verwendeten Menge an Lösemitteln perfundiert. Bis auf GF 109203 X, welches nur in DMSO (Dimethylsulfoxid) zu lösen ist, war dies ausschließlich Aqua bidestillata. Nach den o.g. Inkubationszeiten wurde die elektrische Stimulation abgeschaltet, die zuvor erwähnten Gewebewürfel von den kontrahierenden Anteilen der Trabekel abgeschnitten, da sie durch Irritationen durch die Aufhängung das Ergebnis verfälschen könnten, das verbleibende Präparat sofort in einem Eppendorf Cup mit RNA-Later Reagenz (Quiagen) durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. In dem RNA-Stabilisierungsreagenz bleibt die RNA bis zu 1 Tag bei 37 °C, 7 Tage bei 18–25 °C oder 4 Wochen bei 2–8 °C intakt, sodass die Lagerung der Proben ohne Eis oder Trockeneis möglich wäre. Die Proben konnten in diesem Reagenz auch bei -20 °C oder -80 °C längerfristig archiviert werden.

## **2.8. Quantifizierung spezifischer messenger-RNA mit der real-time Polymerasekettenreaktion.**

Die DNA freie gesamt RNA, wurde aus den Zellpellets bzw. den Trabekeln mit Hilfe einer Säulenpräparation nach einem Standardprotokoll des Quiagen RNeasy Kit ® und dem RNase-Free DNase Set extrahiert. Der RNeasy Mini Kit ® verwendet zur Isolierung von RNA spezielle Säulen mit einer Silicagel-Membran, an die die RNA bei hoher Salzkonzentration binden kann. Andere Zellbestandteile können durch mehrere Waschschriffe effizient entfernt und die gereinigte RNA anschließend eluiert werden. Die cDNA-Synthese wurde mit der reversen Transkriptase superscript II und Random Primern (beide von Invitrogen) nach einem Invitrogen Standardprotokoll durchgeführt. Die real-time PCR ist eine Methode zur genauen Quantifizierung von DNA- bzw. nach cDNA-Synthese in diesem Fall auch mRNA-Mengen (Ginzinger 2002, Bustin 2002, Guilietti et al. 2001). Vom Grundprinzip her läuft sie genauso ab wie eine herkömmliche PCR: Aus einer einzelsträngigen cDNA wird ausgehend von einem Startermolekül durch eine DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wobei die DNA exponentiell amplifiziert wird. Bei der normalen PCR werden nach Abschluss der Reaktion die entstandenen Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt, identifiziert und semiquantitativ bestimmt. Man bezeichnet dies auch als Endpunktsbestimmung, da die Menge an entstandenem Produkt erst nach abgeschlossener PCR-Reaktion bestimmt wird. Das Besondere der real-time PCR ist, dass während der PCR-Reaktion permanent die Menge des entstandenen Produktes gemessen und aufgezeichnet

wird. Bei einer späteren Auswertung können Expressionsunterschiede der zu untersuchenden Gene zwischen zwei Proben im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion bestimmt werden.

Die folgende PCR-Reaktion wurde in einem real-time Lightcycler (Roche®) durchgeführt. Wesentliches Prinzip der real-time PCR ist, dass ein durch Licht zur Fluoreszenz anregbares Reagenz an die Zyklus um Zyklus amplifizierte Doppelstrang DNA bindet. So können nach jedem Zyklus in Echtzeit die Amplifikationsrate ermittelt werden und Quantifizierungsanalysen durchgeführt werden. Spezifität für ein bestimmtes Gen kann im Wesentlichen durch zwei Methoden erreicht werden. Man kann Randomprimer zusammen mit einer sequenzspezifischen, fluoreszenzfähigen Sonde zum Reaktionsansatz zugeben, z.B. TaqMan® oder aber SYBRGreen®, ein Reagenz dass nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 530 nm fluoreszenzfähig ist und spezifisch nur an Doppelstrang DNA bindet, zusammen mit sequenzspezifischen Primern in den Reaktionsansatz geben, so das von dem sequenzunspezifischem SYBRGreen®, nur die spezifisch amplifizierte Sequenz detektiert wird. Beim vorliegenden Protokoll wurde sich für den Ansatz mit SYBRGreen® entschieden, da diese die momentan kostengünstigste Methode darstellt, wobei ein Nachteil darin besteht, dass jegliche Art von doppelsträngiger DNA erfasst wird, also auch unspezifische Produkte wie z.B. Primer-Dimere. Deren Entstehung kann aber unter optimierten Bedingungen bezüglich Salzkonzentration und Temperatur erfolgreich minimiert werden.

Der Reaktionsansatz enthielt hierbei in einem Volumen von 20 ul, 2 ul cDNA, 0,5 umol/l der jeweiligen Primer, 1 U der Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2 ul von 10fach konzentrierten PCR-Puffer (Invitrogen), 0,2 mmol/l jedes dNTP (BioLine), 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 500 mg/l BSA (New England BioLabs), 50 ml/l DMSO (Sigma) und 1ul von 1/1000 SYBRGreen stock (Roche). Nach einer initialen Denaturierungsstufe von 30 s bei 95°C, folgte das Zyklusprogramm mit 94°C für 0 s, 60°C für 5 s und 72°C für 10 s je Zyklus bei insgesamt 45 Zyklen. Die Emission bei 530 nm wurde nach jedem Zyklus bei 82°C für SERCA 2a und BNP, bei 85°C für GaPDH, und bei 81°C für NCX gemessen. Die jeweiligen Primerpaare sind in Tab. 9a/9b angegeben. RNA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen der jeweiligen Gene, wurden für die Quantifizierungsstandardkurven bei jedem realtime PCR-Ansatz mitgeführt.

Tabelle 9a: Primersequenzen Ratte

Gen	Primersequenz	Temperatur
SERCA 2a	Sense: 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' Antisense: 3'-AGG AGA TGA GGT AGC CGA TGA A-3'	87°C
NCX	Sense: 5'-CCG TAA TCA GCA TTT CAG AG-3' Antisense: 5'-GCC AGG TTC GTC TTC TTA AT-3'	80°C
BNP	Sense: 5'-TCC AAG ATG GCA CAT AGT TC-3' Antisense: 5'-AGG ATC ACT TGA GAG GTG GT-3'	83°C
GaPDH	Sense: 5'-AAG GTC ATC CCA GAG CTG AA-3' Antisense: 5'-AGG AAT GGG AGT TGC TGT TG-3'	84°C

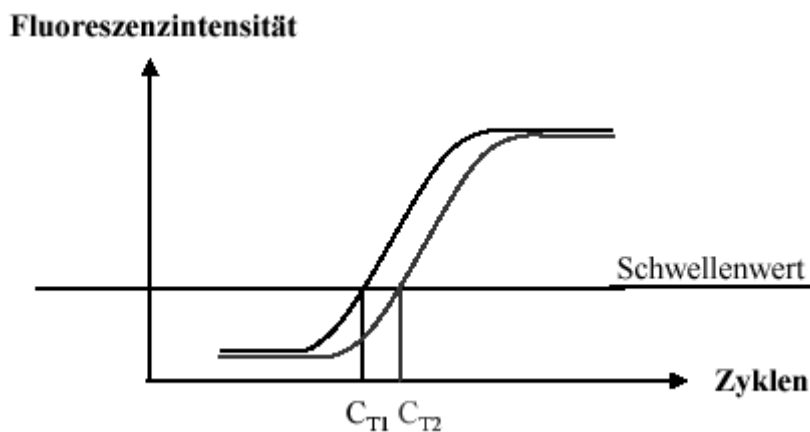
Tabelle 9b: Primersequenzen Kaninchen

Gen	Primersequenz	Temperatur
SERCA 2a	Sense: 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' Antisense: 5'-AGG AGA TGA GGT AGC GGA TGA A-3'	82°C
NCX	Sense: 5'-CTG GAG CGC GAG GAA ATG TTA-3' Antisense: 5'-GAC GGG GTT CTC CAA TCT CAA-3'	81°C
BNP	Sense: 5'-TGC TCT TCT TGC ACC TGT-3' Antisense: 5'-GCA GCT GCT GTA TCT CAG AAA-3'	82°C
GaPDH	Sense: 5'-TGC CGA GTA CGT GGT GGA AT-3' Antisense: 5'-GAT GGC GTG CAC CGT GGT CAT-3'	85°C

### 2.9. Datenverarbeitung und Statistik

Nach beendeter PCR-Reaktion setzt man einen Schwellenwert für die Fluoreszenz fest und bestimmt für jede Probe die Anzahl der Zyklen, bei der dieser Schwellenwert erreicht ist. Diese Werte bezeichnet man auch als ct-Werte (cycle threshold). Eine Probe mit einem höheren ct-Wert hatte eine niedrigere Ausgangskonzentration an zu amplifizierender cDNA, da mehr Zyklen benötigt wurden um den Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen. Eine Probe mit einem niedrigeren ct-Wert dem entsprechend eine höhere. Zur quantitativen Auswertung und zum Vergleich zweier Proben wird die Differenz der ct-Werte gebildet.

Abb. 8: Graphische Darstellung des Quantifizierungsprinzips mittels Lightcycler real-time PCR.

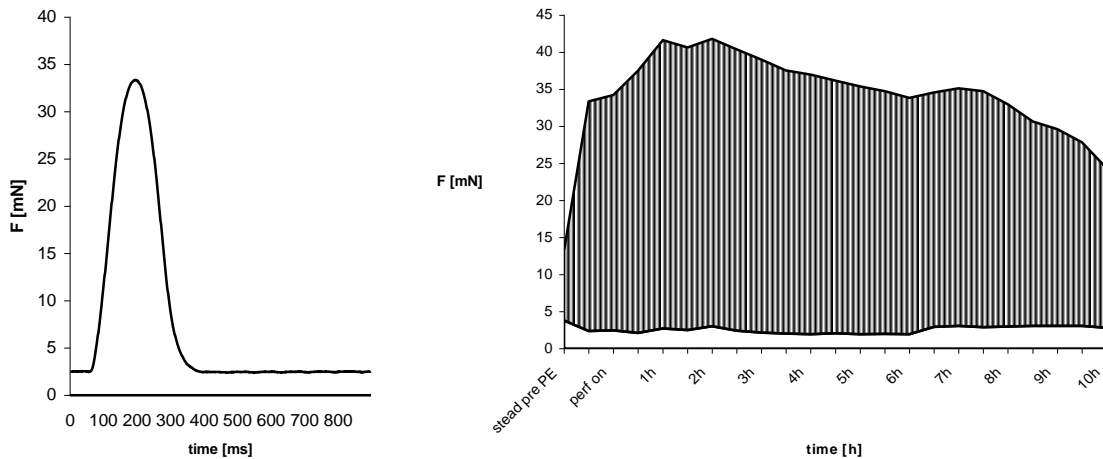


Die Expressionsmenge der Gene NCX 1, SERCA 2a, und BNP wurden zu GaPDH normalisiert in dem Quotienten gebildet wurden. Es wurden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen dann Mittelwerte errechnet wurden, die in Microsoft-Excel-Formaten weiter ausgewertet wurden.

Die durch eine Wandlerkarte umgewandelten elektronischen Signale des Kraftaufnehmers, wurden mit der LabView® Software als mechanische Parameter akquiriert und als *single twitches* und *chart files* gespeichert (Abb.9). Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der LabView® Software, um sie dann in Microsoft-EXCEL-Formate zu überführen und statistische Analysen durchzuführen beziehungsweise Diagrammdarstellungen erstellen zu können.



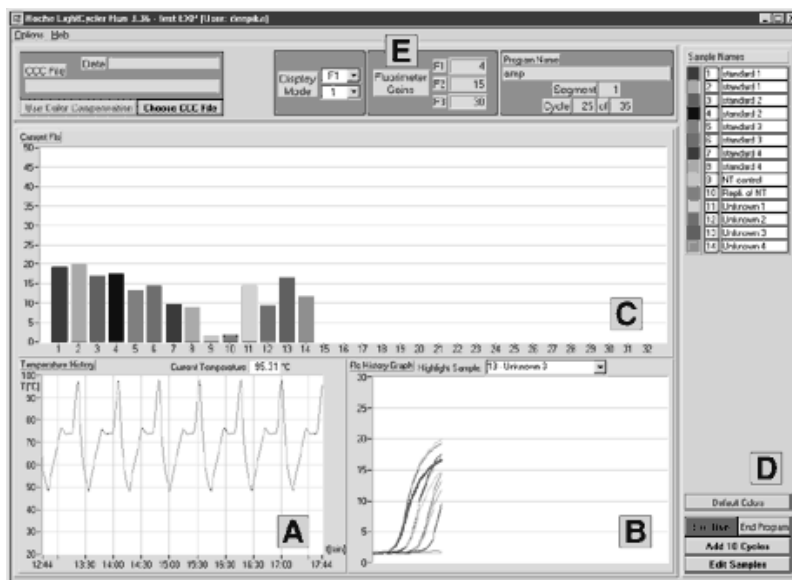
Abb. 9: Exemplarische Originalregistrierungen von *single twitches*, also einem einmaligen Kontraktionsablauf (links), und den sog. *chart files*, die kumulative Darstellung aller *single twitches* über die gesamte Versuchszeit (rechts).



Die Daten der real-time PCR wurden mit der zum Roche Lightcycler gehörenden Software Real Quant 1.01 (Abb.10.) ausgewertet und dann ebenfalls zu weiteren Analysen in Microsoft-EXCEL- Formate überführt. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  *standard error of the mean* (SEM) aufgeführt. Sämtliche Unterschiede in den jeweiligen Datengruppen wurden mit dem gepaarten t-Test auf Signifikanz getestet. Hierbei wurde bei einem  $p < 0,05$  von Signifikanz ausgegangen.

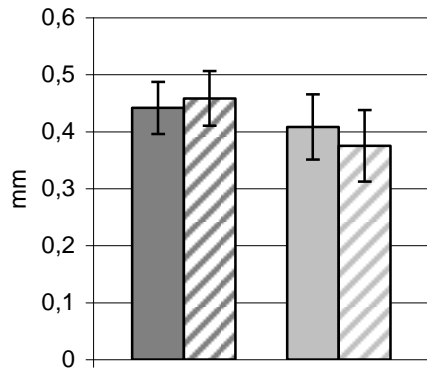
Abb. 10.: Exemplarische Originalregistrierung der Lightcycler Messung.

A= Temperaturverlauf in den einzelnen Zyklen. B= Fluoreszenzzunahme im Verlauf der Zyklen. C= Fluoreszenzgrösse im aktuellen Zyklus D= Wahl der Zyklusanzahl E = verwendetes Messprotokoll

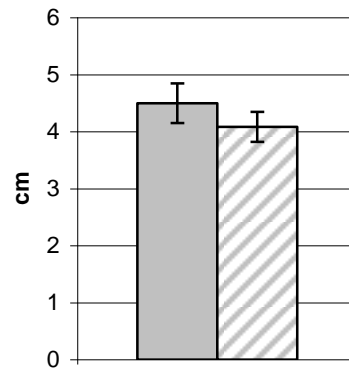


Die Präparate in den unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden hinsichtlich Vergleichbarkeit in den Dimensionen, als auch in der Kraftentwicklung vor Versuchsbeginn untersucht. Hier waren folgende Ergebnisse zu ermitteln, und damit Vergleichbarkeit gegeben (Abb.11).

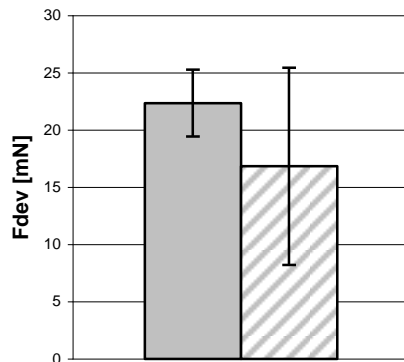
Abb. 11: Vergleichbarkeit der Gruppen.



Vergleich der Präparatdicke:  
 (Doppelbalken li.): Kontrolle=0,44mm;  
 Verum=0,45mm: p-Wert= 0,75;  
 Präparatbreite (Doppelbalken re.):  
 Kontrolle=0,4mm; Verum=0,37mm;  
 p-Wert: 0,5



Vergleich der Präparatlänge:  
 Kontrolle (li.) Mittel=4,5cm gegen  
 Verum (re.) Mittel=4,08cm;  
 p-Wert: 0,32



Vergleich der entwickelten  
 Anfangskraft vor Versuchsbeginn:  
 Kontrolle (li.) Mittel 22,35 mN;  
 Verum (re.) Mittel 16,83 mN  
 p-Wert: 0,144

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Phenylephrin und isometrischer Kraft.

Um zu gewährleisten, dass die für die weiteren Untersuchungen gewählte PE-Konzentration im ausreichenden Maße die  $\alpha_1$ -adrenerge Kaskade stimuliert, wurden zu Beginn an isolierten, elektrisch stimulierten rechtsventrikulären Trabekeln vom Kaninchen, Kraftmessungen bei verschiedenen PE Konzentrationen durchgeführt und der positiv inotrope Effekt als Maß für den Grad der alpha-adrenergen Aktivierung gemessen. Hierzu wurden n=17 Versuche durchgeführt (Abb. 12). Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ , war die entwickelte isometrische Kraft  $\sim 2,4$ -fach höher als in der Ausgangssituation ohne Phenylephrin. Die Fdev (entwickelte Kraft= developed force) lag hier bei  $37,4 \pm 5,6$  mN. Diese Konzentration wurde in allen folgenden Experimenten erzeugt. Frühere Studien bevorzugten Konzentrationen von 10  $\mu\text{mol/L}$  (Reinecke et al. 1997) und 20  $\mu\text{mol/L}$  PE (Golden et al. 2000), um Veränderungen in der NCX-Expression von adulten und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte zu untersuchen.

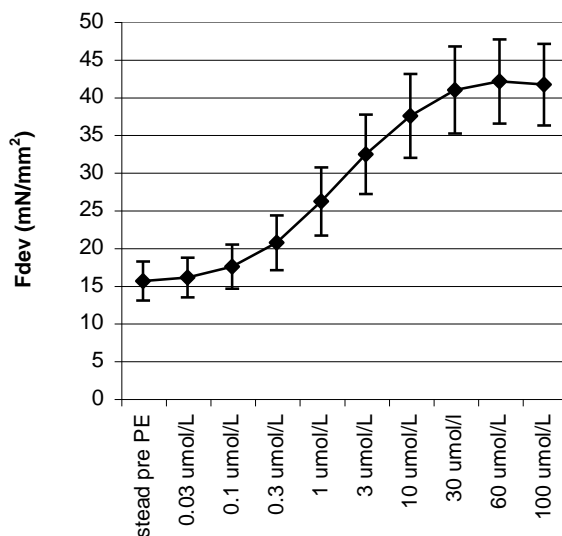


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung der entwickelten Kraft von PE in elektrisch stimulierten, isolierten, rechtsventrikulären Trabekeln des Kaninchens. Ein eindeutig dosisabhängiger Kraftanstieg ist sichtbar, welcher bei 10  $\mu\text{mol/L}$  keine weitere signifikante Zunahme zeigt. Fdev=  $37,4 \pm 5,6$  mN, n=17

#### 3.2. Elektrisch stimulierte rechtsventrikuläre Trabekel des Kaninchens

Die mit einer Frequenz von 1 Hz kontinuierlich kontrahierenden Trabekel wurden nach 3, 6 und 10h aus der Versuchsanlage genommen und die mRNA-Menge der o. g. Gene mit der real-time PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten in diesen Versuchsreihen Trabekelpräparate vom gleichen Tier, die äquivalente Zeiteinheiten in Medium ohne PE kontrahierten.

Nach 3h zeigte sich hierbei eine nicht signifikante, steigende Tendenz der NCX- mRNA-Transkription, die nach 6h in eine Verminderung umschlägt und nach 10h eine signifikante Verminderung der NCX 1-mRNA-Transkription darstellt: 76,6% von Kontrolle  $\pm 3,2$ ;  $p < 0,005$ .

Des Weiteren ist eine signifikante Steigerung der BNP-Transkription nach 10h zu beobachten: 722,8%  $\pm 337,1$ ;  $p < 0,04$ , während die Transkription der SERCA 2a keine signifikante Veränderung zeigt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Myozytenkulturen, waren diese transkriptionellen Effekte des PE bei Experimenten in denen die Präparate zu keinem Zeitpunkt irgendeine Form von Last erfuhren, die so genannten „slack“ Experimente, nicht zu beobachten. Abb. 13.

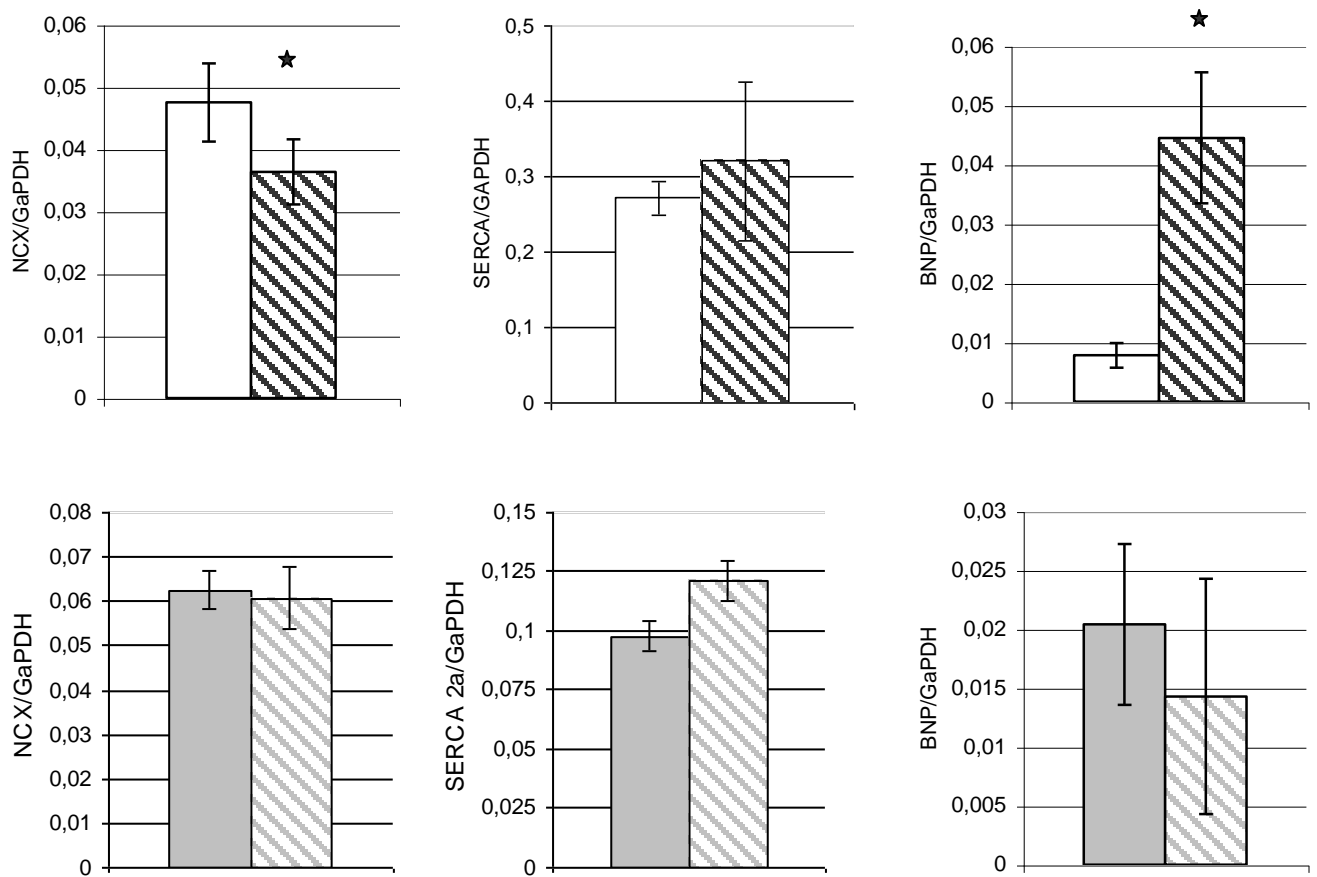


Abb. 13: PE-Effekt bei RV-Trabekeln. Effekt von 10 μmol/L PE auf mRNA-Expression von NCX 1, SERCA 2a und BNP normiert zu GaPDH in elektrisch stimulierten, isometrisch kontrahierenden, ventrikulären Kaninchentrabekeln nach 10h bei optimaler Vorlast (oben) und bei Trabekeln, die ohne jegliche Last, *slack* kontrahierten (unten).

\*  $p < 0.04$ ;  $n = 6$  jeweils von 6 versch. Präparationen. Einfarbige Säule = Kontrolle, schraffierte Säule = +PE

Des Weiteren wurde die These aufgestellt, dass die unter PE-Einfluss beobachteten Transkriptionsveränderungen in der Signalkaskade abwärts über den  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor und die Proteinkinase C vermittelt werden. Dies scheint sich zu bestätigen, da der Effekt von PE bei gleichzeitiger Zugabe des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor selektiven Rezeptorblockers Prazosin nicht mehr zu beobachten ist. Gleiches zeigt sich bei Zugabe des PKC selektiven Inhibitors GF 109203 X. (Abb. 14).

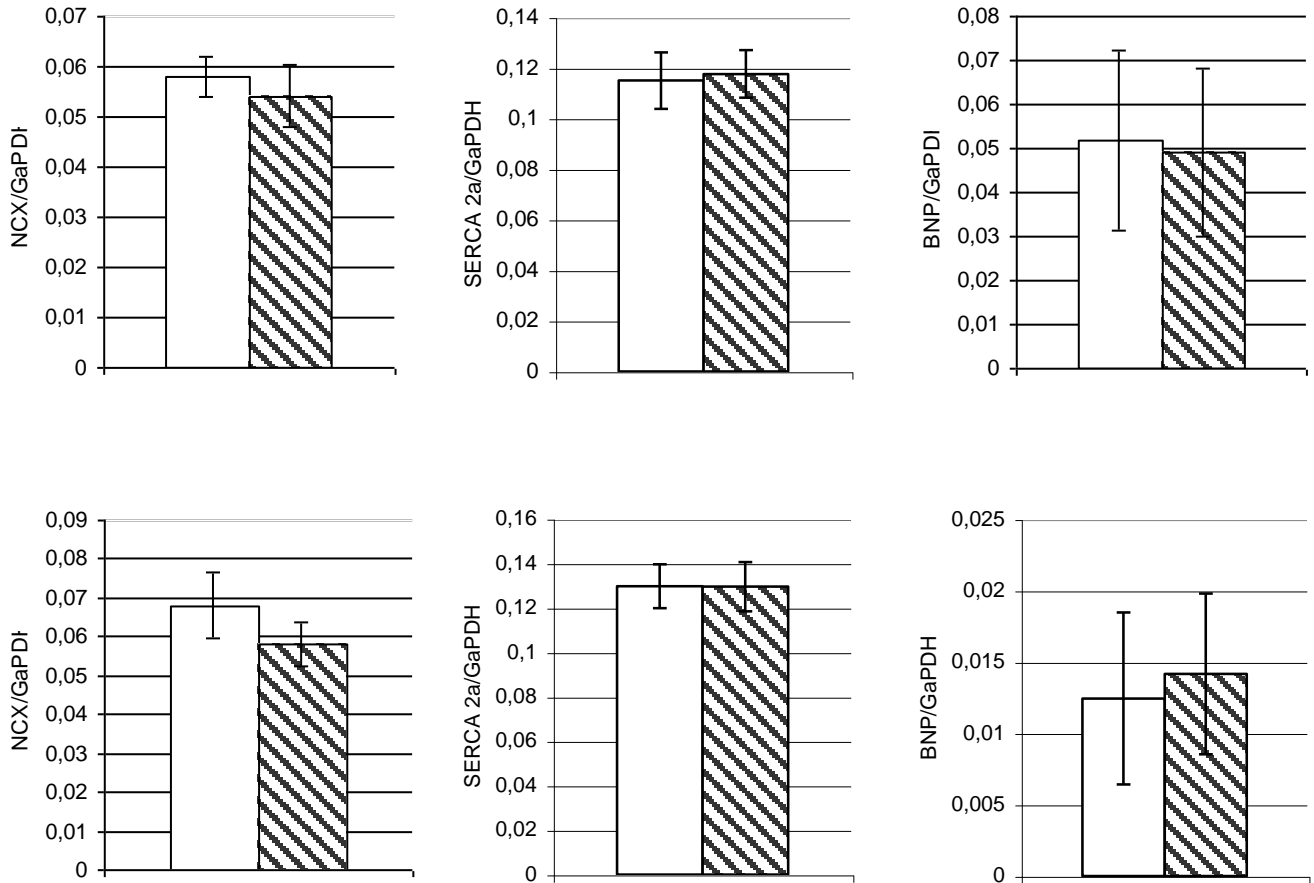


Abb. 14:  $\alpha_1$ -adrenerge Blockade und PKC-Inhibition. Fehlen des PE-Effekts auf die NCX 1 und BNP mRNA Expression in gedehnten, ventrikulären Kaninchentrabekeln unter Gabe von Prazosin (13 mmol/L) (nach 10h) (oben) und unter Gabe des PKC-Inhibitors GF 109203X (1  $\mu$ mol/L) (unten). n=6 jeweils von 6 versch. Präparationen; einfarbige Säule= Kontrolle (Medium ohne PE und Praz, bzw. ohne PE und GF109203X) schraffierte Säule=Verum (+PE+ Praz bzw. PE+ GF 109203X)

Des Weiteren führte eine Erhöhung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (3mmol/L) bei optimaler Vorlast, zu einer Verminderung der NCX 1-mRNA-Transkription:  $77,4 \% \pm 6,8$ ;  $p < 0,02$  im Vergleich zur Kontrolle, bei gleich bleibender SERCA 2a und gesteigerter BNP mRNA-Transkription:  $506,8 \% \pm 193,0$   $p < 0,02$ .

Abb. 15.

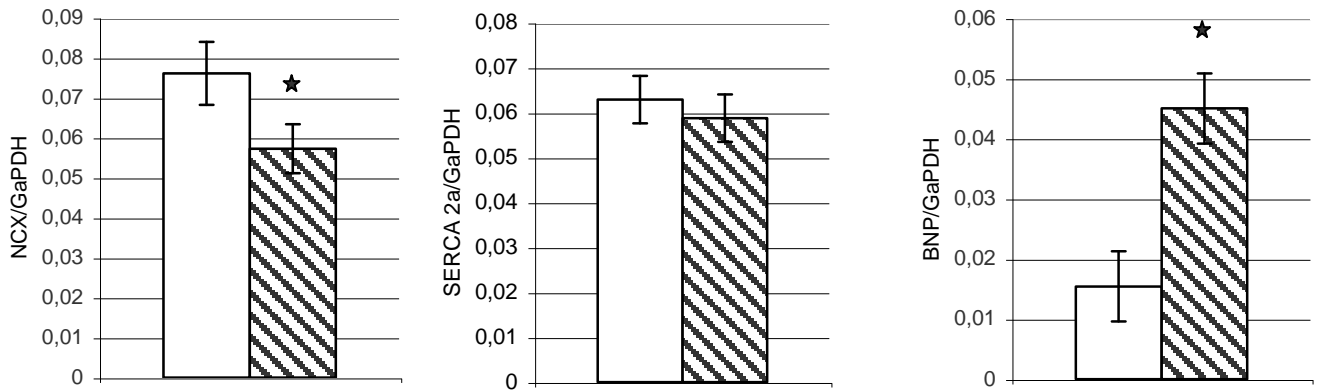


Abb. 15: Effekt von erhöhtem extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> (3 mmol/L) auf mRNA Expression von NCX 1, SERCA 2a und BNP normiert zu GaPDH bei gedehnten, ventrikulären Kaninchentrabekeln. \* p<0.02; n=6 jeweils von 6 versch. Präparationen. Einfarbige Säule= Kontrolle: Ca<sup>2+</sup> 1,75 mmol/L, schraffierte Säule= Ca<sup>2+</sup> 3,0 mmol/l.

### 3.3. Isolierte, ungedehnte Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte in Kultur

Kultivierte Kardiomyozyten wurden bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1,75 mmol/L, einer Konzentration von 10 μmol/L PE ausgesetzt. Kulturen mit Medium ohne PE-Zusatz dienten als Kontrolle. Je Spezies wurden n=11 Experimente durchgeführt. Nach 24h wurde mit der real-time PCR die Menge der mRNA-Transkription für die Gene NCX 1, SERCA 2a, BNP und GaPDH bestimmt, wobei die Bestimmung von GaPDH zur Normierung diente. Abbildung 16.) zeigt die Höhe der mRNA-Transkription in den Kardiomyozyten der beiden Spezies. In Kaninchenkardiomyozyten wurden keine signifikanten Transkriptionsänderungen bis auf BNP gefunden. 257,7% von Kontrolle ±47,9 p<0,01.

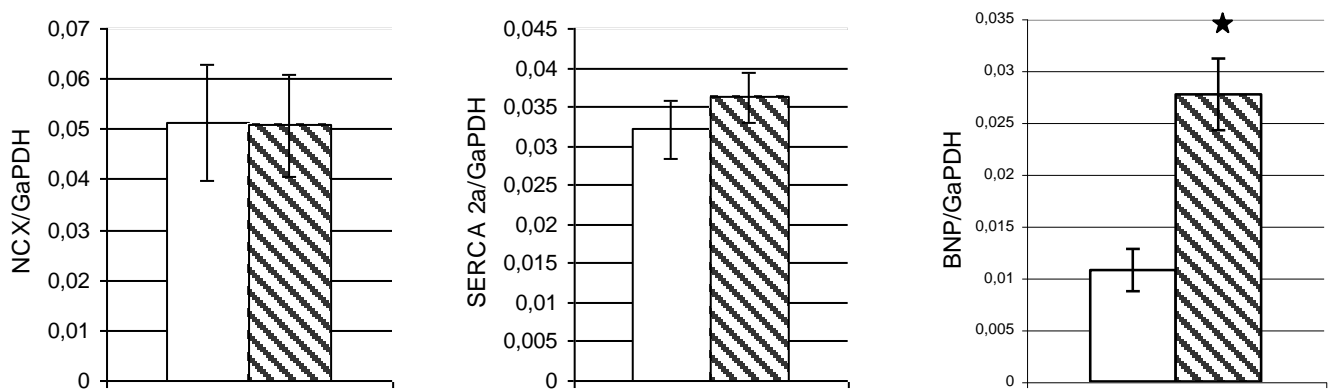


Abb. 16: PE-Effekt auf isolierte Kaninchenmyozyten. Effekt der Inkubation mit 10 μmol/L PE auf mRNA-Transkription von NCX 1, SERCA 2a und BNP normiert zu GaPDH nach 24h Inkubation der isolierten, kultivierten, adulten Kaninchenkardiomyozyten. n=11 von 11 versch. Myozytenisolationen. \* p<0.01 ; einfarbige Säule= Kontrolle, schraffierte Säule= +PE.

Des Weiteren wurde der Effekt einer erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentration auf die Kardiomyozyten untersucht, indem im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,75 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ ), die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium auf 3,0 mmol/L erhöht wurde. Hier konnten keine signifikanten Transkriptionsänderungen beobachtet werden, was aus Abbildung 17.) zu ersehen ist. Hierbei war bei den Kaninchenkardiomyozyten für NCX 1  $101,9 \pm 7,7\%$ , SERCA 2a  $102,3 \pm 3,9\%$  und für BNP  $93,6 \pm 4,1\%$  im Vergleich zur Kontrolle zu ermitteln.

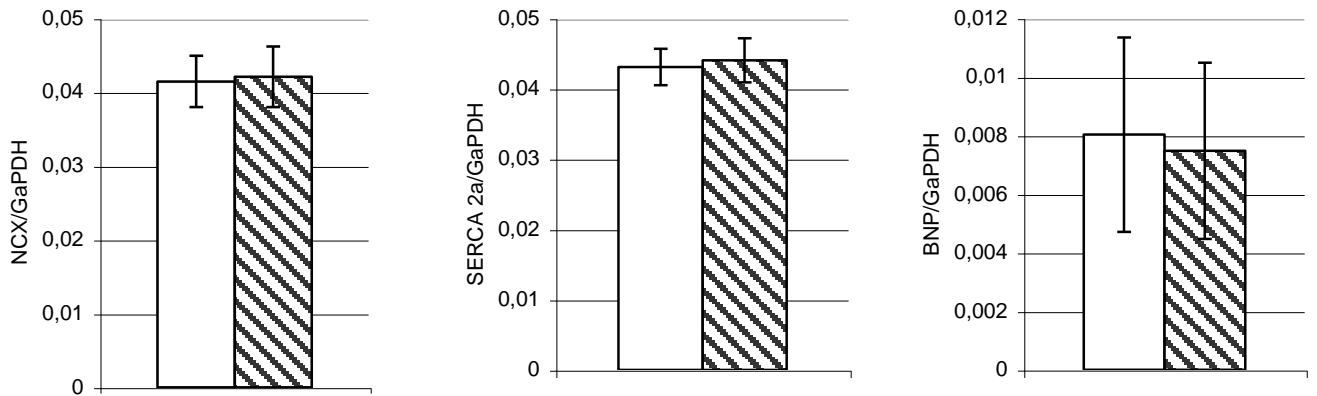


Abb. 17: Erhöhte extracelluläre Kalziumkonzentration bei isolierten Kardiomyozyten. Effekt der Inkubation mit 3,0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  auf mRNA-Expression von NCX 1, SERCA 2a und BNP normiert zu GaPDH, nach 24h Inkubation der isolierten, kultivierten adulten Kaninchenkardiomyozyten. n=7 von 7 versch. Myozytenisolationen; einfarbige Säule= Kontrolle  $\text{Ca}^{2+}$  1,75 mmol/L, schraffierte Säule=  $\text{Ca}^{2+}$  3,0 mmol/l.

Da in bereits vorliegenden Studien bei Kardiomyozyten von Ratten eine signifikant vermehrte Expression des NCX1 als Antwort auf den PE-Reiz beobachtet wurden, dienten im Rahmen dieser Arbeit zusätzliche Experimente an Kardiomyozyten der Ratte zur Überprüfung der Effektivität des gewählten PE-Stimulationsprotokolls. Hier ließen sich die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Molkentin und Dorn 2001, Reinecke et al. 1997) im Wesentlichen reproduzieren. Bei den Ratten-Kardiomyozyten kam es nach 24 h Kultur unter PE zu signifikanten Transkriptionsänderungen bei den Genen NXC 1: 117,8 % im Vergleich zur Kontrolle  $\pm 7,9$   $p < 0,05$ , SERCA 2a: 89,2 %  $\pm 3,4$   $p < 0,02$  und BNP: 284,1 %  $\pm 82,4$   $p < 0,02$ . Abb.18

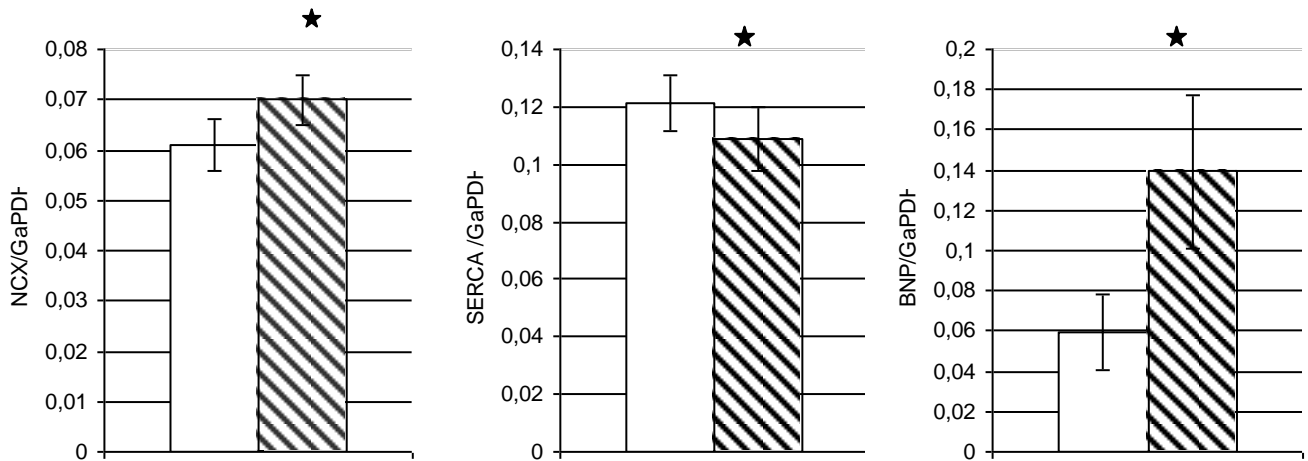


Abb. 18: PE-Effekt auf isolierte Ratten-Myozyten. Effekt der Inkubation mit 10  $\mu\text{mol/L}$  PE auf die mRNA Expression von NCX 1, SERCA 2a und BNP normiert zu GaPDH nach 24h Inkubation der isolierten, kultivierten, Rattenkardiomyozyten. n=11 von 11 versch. Myozytenisolationen. \*  $p < 0.03$ ; einfarbige Säule= Kontrolle, schraffierte Säule= +PE

Wie bei den Kardiomyozyten des Kaninchens führte eine Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 3,0 mmol/L zu keiner signifikanten Expressionsänderung. Bei Rattenkardiomyozyten waren für NCX 1:  $99,1 \pm 3,1\%$ , SERCA 2a  $104,6 \pm 4,4\%$  und für BNP  $95,1 \pm 10,3\%$  im Vergleich zur Kontrolle zu ermitteln.

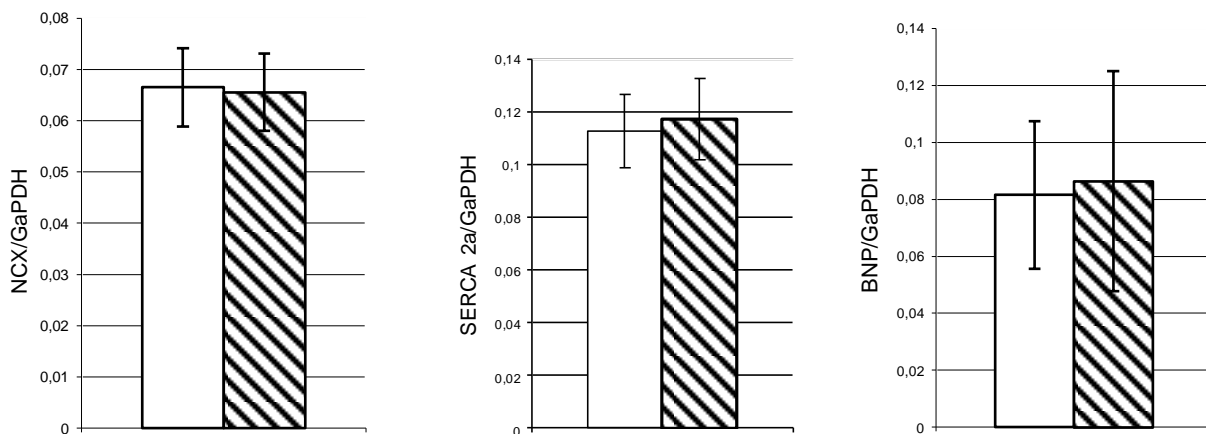


Abb.19: Erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration bei isolierten Rattenkardiomyozyten. Effekt der Inkubation mit 3,0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  auf mRNA-Expression von NCX 1, SERCA 2a, und BNP normiert zu GaPDH, nach 24h Inkubation der isolierten, kultivierten Rattenkardiomyozyten. n=7 von 7 versch. Myozytenisolationen.; uni= Kontrolle  $\text{Ca}^{2+}$  1,75 mmol/L, schraffiert=  $\text{Ca}^{2+}$  3,0 mmol/l.



## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt 1.) dass kontinuierliche  $\alpha_1$ -adrenerge Simulation mittels PE in ventrikulären Trabekeln des Kaninchens unter optimaler Vorlast zu einer verminderten Transkription von NCX 1 mRNA führt. 2.)  $\alpha_1$ -adrenerge Simulation induziert keine Veränderungen der NCX 1 mRNA-Transkription in Trabekeln und Kardiomyozyten bei fehlender Last. 3.) der Effekt von PE bei ventrikulären Trabekeln des Kaninchens unter optimaler Vorlast war unter Blockade des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors bzw. der PKC nicht mehr nachweisbar. 4.) Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt nur unter Vorlast zu einer verminderten NCX 1 mRNA-Transkription während lastfreie Trabekel und Myozyten dadurch keine Veränderung der Expression zeigen.

Unter physiologischer Vorlast und  $\alpha_1$ -adrenergem Stress konnte bei multizellulären Herzmuskelpräparationen des Kaninchens ein signifikanter Effekt auf die NCX 1 mRNA-Transkription gezeigt werden und unerwartet führte es zu einer verminderten NCX 1 mRNA-Transkription. Dieser Effekt läuft über eine Signalkaskade des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors und der Proteinkinase C ab.

Andere Autoren hatten bisher publiziert, dass Hypertrophie unabhängig von den Lastbedingungen über  $\alpha_1$ -adrenerge Mechanismen vermittelt wird (Frey N et al. 2004). In Kardiomyozyten adulter Ratten wurde gezeigt, dass permanente  $\alpha_1$ -adrenerge-Stimulation zu einer vermehrten NCX 1-Transkription auf mRNA- bzw. Translation auf Proteinebene führt (Reinecke et al. 1997).

Dabei zeigt die vorliegende Arbeit, dass  $\alpha_1$ -adrenerge-Stimulation nur unter physiologischer Vorlast Effekte auf die NCX 1 mRNA-Transkription hat. Unter Abwesenheit jeglicher mechanischer Last aber identischem PE-Protokoll waren keine Expressionsänderungen für NCX 1 detektierbar. Dazu übereinstimmend, allerdings im Kontrast zu bisherigen Untersuchungen an Rattenkardiomyozyten, zeigte PE-Stimulation an lastfrei kultivierten Kardiomyozyten des Kaninchens keine Expressionsänderungen für NCX 1. Dabei konnte bei jeglichen  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulationsprotokollen durch deutlich erhöhte BNP-Expression, einem sensiblem Lastindikator und klinischer Parameter für Herzinsuffizienz (Maisei 2002), die Integrität der intrazellulären Signalübertragung in den Experimenten dargestellt werden. Dabei konnten die bereits publizierten Daten zur vermehrten NCX 1 Expression in Rattenkardiomyozyten mit dem identischen Protokoll reproduziert werden (Reinecke et al. 1997, Golden et al. 2000, Golden et al. 2001).

Die Rolle mechanischer Dehnung bei der Hypertrophie des Kardiomyozyten wurde bisher intensiv untersucht und es wird angenommen, dass dies einer der Induktoren eines so genannten *early gene program*, einer Dysregulation von NCX 1 und SERCA 2a ist. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt das vermehrte Druckbelastung in Katzenherzen zu einer vermehrten NCX 1 mRNA-Transkription führte (Kent et al. 1993).

Dabei ist momentan noch wenig bekannt über welche Signalkaskaden der mechanische Reiz zu einer Expressionsänderung führt. Mehrere Autoren nehmen an, dass auto- und/oder parakrine Mechanismen durch Endothelin1, Noradrenalin oder Angiotensin II über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die intrazelluläre Signalkaskade beeinflussen (Frey et al. 2004, Wettschurek et al. 2001).

Andere Autoren wiederum wenden sich vom neurohumoralen Modell ab und favorisieren als Proteine der Mechanotransduktion die  $\beta$ -Integrine sowie Proteine der Z-Scheibe des Sarkomers (Brancaccio et al. 2003, Knoll et al. 2002).

Der exakte Punkt an dem  $\alpha_1$ -adrenerge sowie lastabhängige Signalwege ineinander greifen, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es lässt sich aber ein Zusammenspiel oben genannter Faktoren an der Proteinkinase C vermuten. Arbeiten mit dem adenoviralem Gentransfer als Methode lassen die Vermutung zu, dass MAP-Kinasen in Rattenkardiomyozyten eine entscheidende Rolle in der Regulation der NCX1-Expression spielen, mit einer spezifischen Rolle von ERK 1/ 2 (Extracellular signal-regulated kinases) bei der Vermittlung von Signalwegen der Integrine als auch  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation (Menick et al. 2002).

Seit dem gezeigt wurde, dass Last die Gradienten für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch das Sarkolemm (Kent et al. 1989, Haneda et al. 1989) und das die  $\alpha_1$ -Adrenoceptor Stimulation die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht (Auffermann et al. 1989) wurde angenommen, dass Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen eine eminente Rolle in den Regulationsprozessen spielen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sowohl Veretridine, ein Stimulator des  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Einstroms in das Sarkolemm, als auch Last bei erregbaren Kardiomyozyten zu einem Anstieg der NCX 1-mRNA-Transkription führt (Kent et al. 1996). Des Weiteren wurde ein schneller Anstieg der NCX 1-Aktivität und Proteinexpression beobachtet, wenn das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  durch Behandlung mit dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitor Oubain erhöht wurde (Vermuri et al. 1989).

Ein weiterer potentieller Effektor für die durch Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermittelte Hypertrophie ist die Calmodulin aktivierte Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin. Einmal aktiviert durch erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, vermittelt Calcineurin über den nuclear factor of activated T cells (NFAT) die Hypertrophie (Wilkins und Molckentin 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde, ähnlich wie durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation, verminderte Expression von NCX1 mRNA durch Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur in Präparaten mit physiologischer Vorlast beobachtet, während bei lastfreien Bedingungen keine Expressionsänderungen durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erreichen war.

Die in dieser Arbeit beobachtete verminderte NCX1 mRNA-Expression als Folge der  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation scheint womöglich Spezies abhängig zu sein. In vivo Studien mit Ratten, bei denen durch osmotische Minipumpen kontinuierliche  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation erfolgte, ergaben eine vermehrte NCX1-Expression (Golden et al. 2001).

Bei klinischen Studien an Patienten mit Herzinsuffizienz Stadium NYHA IV konnte außerdem gezeigt werden, dass hohe Noradrenalin-Plasmaspiegel direkt mit einer vermehrten myokardialen NCX 1-Expression korrelieren (Schillinger 2002). Dabei ist bekannt, dass gleiche Stimuli in unterschiedlichen Spezies zu gegensätzlichen Expressionsänderungen führen können. Ein Herzinsuffizienzmodell, bei dem durch tachykardes Ventrikelpacing über implantierte Schrittmacher eine linksventrikuläre Volumenüberlastung erzielt wird, führt zur Herzinsuffizienz ohne eine klare Phase der funktionell kompensierten Hypertrophie und ist auf zellulärer Ebene durch verminderter SERCA-Aktivität und eine verminderte NCX-Transkription auf mRNA-Ebene auf 36% der Kontrolle gekennzeichnet (Yao et al. 1998), ohne dabei signifikante Veränderung auf Proteinebene zu erzeugen (Schillinger et al 2006). Bei Hunden führt das gleiche Modell zu einer vermehrten NCX 1-Expression auf Proteinebene (O'Rourke et al. 1999)

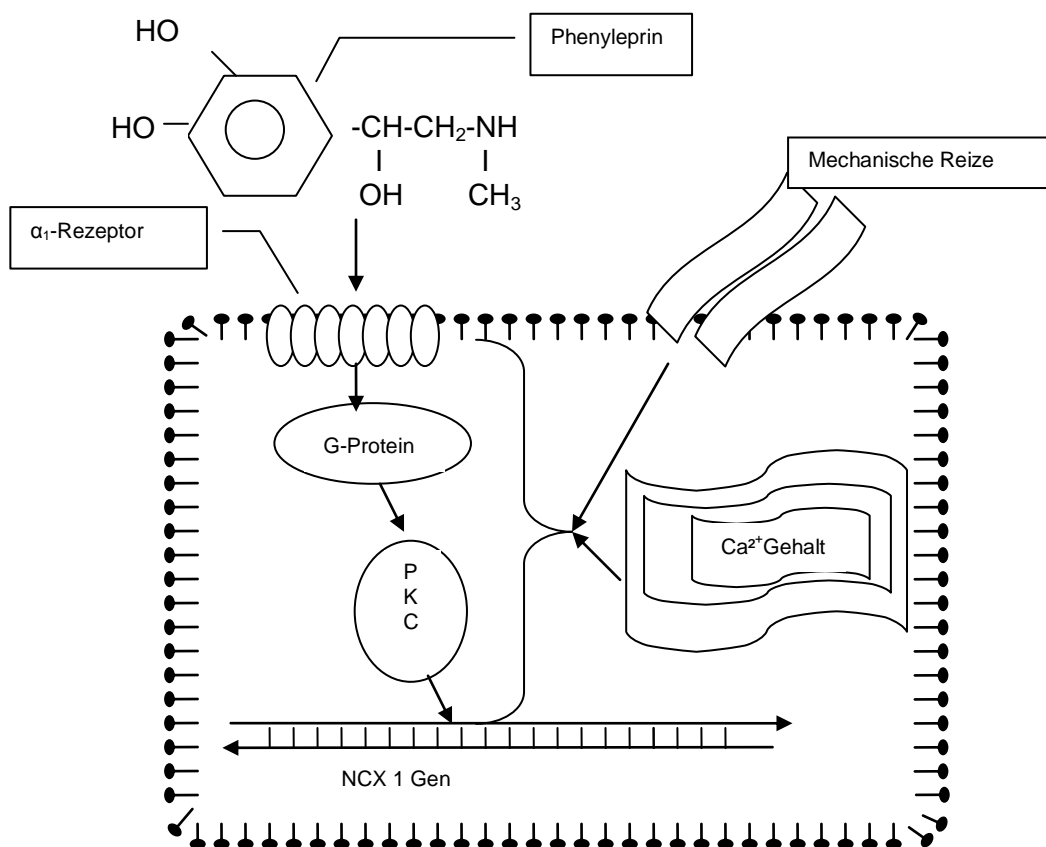
Eine andere Möglichkeit wäre, dass die unerwartet verminderte NCX-Expression modellabhängig ist. Ein Modell der kombinierten Druck- und Volumenüberlastung, erzeugt durch Zerstörung der Aortenklappe und Konstriktion der Aorta supra-avalvulär, führte zu NCX mRNA- und Proteinhochregulation und erhöhten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen durch die Zellmembran (Pogwizd et al. 1999). Des Weiteren wurde auch die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in Tiermodellen untersucht, in denen der Ramus circumflexus der linken Koronararterie ligiert wurde. Hier wurde ein erhöhter Auswärtstrom über den NCX, sowie ein erhöhter Beitrag des NCX-Stroms zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums beobachtet, wobei der sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt unverändert war (Litwin und Bridge 1997). In anderen Herzinsuffizienz Modellen des Kaninchens, z.B. durch künstlichen Myokardinfarkt oder kombinierter Druck-Volumenüberlastung des linken Ventrikels, wurde auch eine vermehrte NCX 1-Expression beobachtet (Sipido et al. 2002, Schillinger et al. 2003).

Neuere Untersuchungen zu intrazellulären Signalwegen bezüglich der NCX 1-Regulation in Rattenkardiomyozyten ergaben, dass je nach Alteration der intrazellulären Kalziumströme, die PKC vermittelte Phosphorylierung einerseits über NFAT zu einer vermehrten Transkription als auch ohne gestörte Kalziumströme über MAP-Kinasen zu einer verminderten Transkription führen (Prasad et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen postulieren Phosphorylierungs-unabhängige Signalwege über Kalzium-Modulin-Kinasen die unabhängig von der PKC-Aktivierung die transkriptionellen Vorgänge beeinflussen (Brown et al 2010). Die Komplexität dieser Signalwege wird nochmals deutlich durch die Entdeckung, dass in Katzen- und Rattenkardiomyozyten die adrenerg- bzw. PKC-vermittelte Regulation der NCX-Expression auch noch durch den Azetylierungs-Zustand diverser Histon-Proteine und damit ihrer Bindungsfähigkeit an den NCX-Promotor beeinflusst wird (Chandrasekaran et al 2009).

Hier kann spekuliert werden ob, je nach Gewicht der neurohumoralen Einflüsse bzw. der Lastbedingungen in den jeweiligen Modellen, unterschiedliche Phänotypen der Herzinsuffizienz bezüglich der NCX 1-Expression beobachtet werden können.

Zusammengefasst lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen sagen, dass die beobachtete NCX 1-Expressionsänderungen durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation direkt von den Lastbedingungen abhängig sind und möglicherweise auch durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden.

Abb. 20: Schema der diskutierten Regulationsmechanismen



#### 4.1. Klinische Bezüge

Nun stellt sich die Frage welche Rolle diese Ergebnisse in der Herzinsuffizienz des Menschen spielen? Es sei vorweggenommen, dass es den Anschein hat, dass verminderte NCX-Expression kein Bestandteil der menschlichen Herzinsuffizienz darstellt. Frühere Arbeiten mit Myokardproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz die ein Transplantat erhalten haben gezeigt, dass die NCX Expression auf mRNA- und Proteinebene in dem insuffizienten Gewebe deutlich erhöht ist (Studer et al. 1994). Darauf folgende Arbeiten haben neben der erhöhten Expression des NCX auch eine vermehrte Transportaktivität des Proteins beschrieben (Flesch et al. 1996). Die funktionelle Relevanz dieser Befunde für die Herzinsuffizienz wurden aber auch in Frage gestellt (Schwinger et al. 1999). Eine weitere Arbeit mit humanen Myokardproben von Patienten in unterschiedlichen Stadien der Herzinsuffizienz konnten keine signifikante Korrelation zwischen NCX mRNA-Expression und klinischem Grad der Erkrankung feststellen (Piper et al. 2000). Weitere Studien über die Proteinexpression sowie die Funktion isolierter Trabekel von im Endstadium der Herzinsuffizienz transplantierten Patienten zeigten eine Beziehung zwischen vermehrter NCX-Expression und diastolischer Dysfunktion (Hasenfuss et al. 1999), also einer verminderten diastolischen Relaxations- und so mit Füllungsfähigkeit und damit auch geringerer Auswurfleistung. In einer weiteren Studie mit

ähnlichem Patientenkollektiv konnte eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter NCX-Expression und Sympathikusaktivierung in Form erhöhter Noradrenalin-Konzentrationen im Plasma dargestellt werden, wobei keine signifikante Korrelation zwischen hämodynamischen bzw. anderen endokrinen Parametern (Renin, Aldosteron, ANP u.a.) und der NCX-Expression zu erkennen waren. In Rahmen dieser Studie wurde auch eine unterschiedliche Anfälligkeit für maligne Arrhythmien des Typ IV b nach Lown, je nach NCX-Expressionshöhe beschrieben (Schillinger et al. 2002). Patienten mit eher hohem NCX-Proteinlevel im Myokard, neigten eher zum Auftreten von malignen Kammertachykardien. Dies lässt vermuten, dass es bezüglich NCX-Expression und Myokardfunktion verschiedene Phänotypen der terminalen Herzinsuffizienz gibt, bei denen zum Beispiel Vorwärts- oder Rückwärtsversagen dominieren, sowie häufiges oder seltenes Auftreten von malignen Herzrhythmusstörungen zu beobachten ist. Die weitere Untersuchung dieser Phänomene wäre klinisch ungemein von Bedeutung, da durch dieses Wissen Phänotyp- und Stadien- spezifische Interventions- und Therapiestrategien entwickelt werden könnten und auch spezifischere, molekulare Screening Methoden wahrscheinlich erscheinen.

#### **4.2. Schlussfolgerungen**

In Zusammenhang mit den Ergebnissen oben genannter Arbeiten und den Beobachtungen in dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass die Regulation des myokardialen NCX nicht einem Faktor allein zuzuschreiben ist, sondern dass ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie Hämodynamik, Ionenhaushalt und endokrine Effektoren eine Expressionsänderung zur Folge hat. Die vorliegenden Ergebnisse lassen hierbei vermuten, dass endokrine und mechanische Faktoren über eine ineinandergreifende intrazelluläre Signalkaskade und Endstrecke die NCX-Regulation beeinflussen. Ein unterschiedlich starker Einfluss dieser Faktoren könnte die unterschiedlichen Phänotypen der Herzinsuffizienz auf molekularer Ebene erklären und neue Therapie- und Screening-Strategien etablieren.

### **5. Zusammenfassung**

Die Regulation der Expression des myokardialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers spielt eine entscheidende Rolle in der Genese von kontraktile Dysfunktion und Arrhythmie bei der Herzinsuffizienz. Ein besseres Verständnis dieser Regulationsprozesse könnte neue Angriffspunkte für Präventions- und Therapiestrategien liefern. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation und mechanischer Last, auf die mRNA-Transkription des NCX 1-Gens und weiterer Gene des Kalziumtransportes untersucht. Es wurden elektrisch stimulierte (1 Hz, 1,75 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ , optimale Vorlast), rechtsventrikuläre Trabekelpräparate des Kaninchens nach 3, 6, und 10 h kontinuierlicher  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation durch 10  $\mu\text{mol/L}$  PE untersucht. Diese Trabekel zeigten eine Abnahme der NCX- mRNA im Vergleich zur Kontrolle (gleiche Bedingungen, kein PE) auf  $77,5 \pm 3,2\%$  nach 10h ( $p < 0,05$ ). Dieser Effekt war sowohl in Anwesenheit des selektiven  $\alpha_1$ -Rezeptorblocker Prazosin (Praz) (13  $\mu\text{mol/L}$ ), als auch des PKC-Inhibitors GF 109203X (1  $\mu\text{mol/l}$ ) nicht zu beobachten. Darüber hinaus konnte keine Regulation des NCX durch PE in nicht gedehnten Trabekeln beobachtet werden. Da vermutet wurde, dass der  $\alpha_1$ -adrenerge Effekt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sein könnte, wurde die Wirkung erhöhter extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (3 mmol/l) untersucht und eine Abnahme der NCX-

mRNA auf  $77,4 \pm 7,8$  % ( $p < 0,02$ ) beobachtet. Des Weiteren wurden in Zellkulturexperimenten über 24 h, isolierte Kardiomyozyten von der Ratte und dem Kaninchen  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation durch 10  $\mu\text{mol/l}$  Phenylephrin ausgesetzt. Die mRNA der Gene von NCX 1, SERCA 2a und BNP wurden mit der real-time PCR bestimmt und gegen das Transkriptionsprodukt des GaPDH-Gens normiert. Bei den Kaninchenmyozyten waren keine signifikante Expressionsänderungen der Gene NCX 1 und SERCA 2a gegenüber der Kontrolle (Kultur ohne PE) zu beobachten, während die mRNA von BNP auf  $257,7 \pm 47,9$ % ( $p < 0,03$ ) der Kontrolle anstieg. In Rattenmyozyten wurden signifikante Veränderungen für NCX 1 ( $117,8 \pm 7,9$ %,  $p < 0,035$ ), SERCA 2a ( $89,3 \pm 3,4$ %,  $p < 0,012$ ), und BNP ( $284,2 \pm 82,4$ %,  $p < 0,016$ ) beobachtet.

Die genannten Befunde lassen erkennen, dass  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation die NCX-Transkription in isometrisch kontrahierenden, multizellulären Herzmuskelstreifen bei optimaler Vorlast über die Aktivierung der PKC vermindert. Die verminderte NCX-Transkription scheint durch Kalzium vermittelt und hängt von den Lastbedingungen ab. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass endokrine und mechanische Faktoren über eine ineinander greifende intrazelluläre Signalkaskade und Endstrecke, die Regulation der NCX 1-Expression beeinflussen. Unterschiedlich starke Veränderungen dieser Faktoren könnten die unterschiedlichen Phänotypen der Herzinsuffizienz erklären und nach besserem Verständnis neue Möglichkeiten für Prävention und Therapie eröffnen.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

ANP	atrial natriuretic peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	Butane-Dione-Monoxime
BNP	brain natriuretic peptide
cGMP	zyklisches Guanidinmonophosphat
CNP	c-type natriuretic peptide
CT	cycle threshold
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
GaPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanidintriphosphat
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
Lsg.	Lösung
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-kinase
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonucleinsäure
NCX	Natrium/Kalzium-Exchanger
NFAT	nuclear factor of activate T-cells
NPR	Natriuretische Peptid Rezeptoren
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PKC	Proteinkinase Typ C
PRAZ	Prazosin
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
SERCA	Sarkoendoplasmatische Retikulum Kalzium Adenosintriphosphatase
SR	Sarkoendoplastmatisches Retikulum
TnC	Troponin Kalzium-bindend
TnI	Troponin inhibitorisch
TnT	Troponin Tropomyosin-bindend
V	Volt

## 6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der elektromechanischen Kopplung. Seite 6.

Abb. 2a: Wirkungsweise der Kalziumionen bei der Myofilamentaktivierung. Aktin- und Myosinfilament im Längsschnitt. Seite 9.

Abb.2b: Aktin- und Myosinfilament im Querschnitt. Seite 9.

Abb. 3: Der pathologische Circulus vitiosus. Seite 11.

Abb. 4: Skizze der modifizierten Langendorferperfusion. Seite 15.

Abb. 5: Versuchsaufbau der Muskelstreifenanlage. Teile der Abbildung entstammen von: O. Zeitz. Einfluß von Hydroxylradikalen auf die Myocardfunktion – Protektive Effekte von Nebivolol. Med. Diss. Freiburg im Breisgau. 1998. Seite 17.

Abb. 6: Aufhängung der Muskelpräparate im Detail. Teile der Abbildung entstammen von: O. Zeitz. Einfluß von Hydroxylradikalen auf die Myocardfunktion – Protektive Effekte von Nebivolol. Med. Diss. Freiburg im Breisgau. 1998. Seite 18.

Abb. 7: Schematischer Aufbau des Roche Lightcyclers. Teile der Abbildung entstammen dem Internetinformationsportal der Firma Roche Diagnostics. Seite 19.

Abb. 8: Graphische Darstellung des Quantifizierungsprinzips mittels Lightcycler real-timePCR. Seite 24.

Abb. 9: Exemplarische Originalregistrierungen lab view. Seite 25.

Abb. 10: Exemplarische Originalregistrierungen der Lightcycler Messung. Seite 25.

Abb. 11: Vergleichbarkeit der Gruppen. Seite 26.

Abb. 12: Dosis-Wirkungsbeziehung von Phenylephrin. Seite 27.

Abb. 13: Phenylephrin bei rechtsventrikulären Trabekeln. Seite 28.

Abb. 14:  $\alpha_1$  -adrenerge Blockade und PKC-Inhibition. Seite 29.

Abb. 15: Effekt von erhöhtem extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Seite 30.

Abb. 16: Phenylephrin-Effekt auf isolierte Kaninchen Myozyten. Seite 30.

Abb. 17: Erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration bei isolierten Kardiomyozyten. Seite 31.

Abb. 18: Phenylephrin-Effekt auf isolierte Ratten Myozyten. Seite 32.

Abb. 19: Erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration bei isolierten Ratten-Kardiomyozyten. Seite 32.

Abb. 20: Schema der diskutierten Regulationsmechanismen. Seite 35.

Alle Abbildungen ohne Herkunftsnachweis wurden entweder selbst angefertigt oder stellen *screenshots* während den eigenen Experimenten dar.



### **6.3. Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1: Tyrode-Grundlösung. Seite 13.  
Tabelle 2: Kalziumhaltige Tyrode-Lösung I. Seite 13.  
Tabelle 3: Kalziumfreie Tyrode-Lösung II. Seite 13.  
Tabelle 4: Enzym-Lösung. Seite 13.  
Tabelle 5: Enzym-Stop-Lösung. Seite 13.  
Tabelle 6: Dissektionslösung. Seite 14.  
Tabelle 7: Krebs-Henseleit-Lösung. Seite 14.  
Tabelle 8: Modifiziertes M 199 Medium. Seite 14.  
Tabelle 9a: Primersequenzen Ratte. Seite 23.  
Tabelle 9b: Primersequenzen Kaninchen. Seite 24.

## 7.Literaturverzeichnis

1. Auffermann W, Stefenelli T, Wu ST, Parmley WW, Wikman-Coffelt J, Mason DT (1989): Influence of positive inotropic agents on intracellular calcium transients. Part I. Normal rat heart. *Am Heart J* 118(6), 1219-27.
2. Bers DM: *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2. Auflage. Kluwer Academic Publishers Verlag, Dordrecht, Niederlande 2001
3. Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Lembo G (2003): Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9(1),68-75.
4. Bridge JH, Smolley JR, Spitzer KW (1990): The relationship between charge movements associated with I<sub>Ca</sub> and I<sub>Na-Ca</sub> in cardiac myocytes. *Science* 248(4953),376-8
5. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 22:307(4), 205-11.
6. Brockhoff C, Warnholtz A, Münzel T (2000): Atrial natriuretic peptides: diagnostic and therapeutic potential. *Ther. Umsch.* 57(5), 305-12.
7. Bustin SA (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1), 23-39.
8. Chandrasekaran S, Peterson RE, Mani SK, Addy B, Buchholz AL, Xu L, Thiyagarajan T, Kasiganesan H, Kern CB, Menick DR (2009): Histone deacetylases facilitate sodium/calcium exchanger up-regulation in adult cardiomyocytes. *FASEB J.* 23(11); 3851–3864
9. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T(1984): Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 311(13); 819-23.
10. Davis M, Espiner E, Richards G, Billings J, Town I, Neill A, Drennan C, Richards M, Turner J, Yandle T (1994): Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnoea. *Lancet.* 19:343(8895), 440-4
11. De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, Hall C, Cannon CP, Braunwald E (2001): The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 345(14),1014-21.
12. de Tombe PP, ter Keurs HE (1991) Lack of effect on unloaded velocity of sarcomere shortening in rat cardiac trabeculae. *Circ Res.* 68(2), 382-91.
13. Fabiato A, Fabiato F (1978): Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci.* 307, 491-522.
14. Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Böhm M (1996): Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94(5), 992-1002.

15. Frey N, Katus H, Olson EN, Hill JA (2004): Hypertrophy of the heart. A new therapeutic target? *Circulation* 109(13), 1580-1589.
16. Ginzinger DG (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30(6), 503-12.
17. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001): An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25(4), 386-401.
18. Golden KL, Fan QI, Chen B, Ren J, O'Connor J, Marsh JD (2000): Adrenergic stimulation regulates Na(+)/Ca(2+)Exchanger expression in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32(4), 611-20.
19. Golden KL, Ren J, O'Connor J, Dean A, DiCarlo SE, Marsh JD (2001): In vivo regulation of Na/Ca exchanger expression by adrenergic effectors. *Am J Physiol* 280, H1376-H1382.
20. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75(3), 434-42
21. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99(5), 641-8.
22. Haneda T, Watson PA, Morgan HE (1989): Elevated aortic pressure, calcium uptake, and protein synthesis in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 1, 131-8.21
23. Højmann Larsen A, Frandsen A, Treiman M (2001): Upregulation of the SERCA-type Ca<sup>2+</sup> pump activity in response to endoplasmic reticulum stress in PC12 cells. *BMC Biochem* 2:4
24. Janssen PM, de Tombe PP (1997): Uncontrolled sarcomere shortening increases the intracellular Ca<sup>2+</sup> transient in rat cardiac trabeculae. *Am J Physiol* 272, H1892-H1897
25. Kent RL, Hooper JK, Cooper G 4<sup>th</sup> (1989): Load responsiveness of protein synthesis in adult mammalian myocardium: role of cardiac deformation linked to sodium influx. *Circ Res* 64(1), 74-85.
26. Kent RL, Rozich JD, Mc Collam PL, McDermott DE, Thacker UF, Menick DR, McDermott PJ, Cooper G 4<sup>th</sup> (1993): Rapid expression of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in response to cardiac pressure overload. *Am J Physiol* 265, H1024-1029.
27. Kent RL, McDermott PJ (1996): Passive load and angiotensin II evoke differential responses of gene expression and protein synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 78(5), 829-38.
28. Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI (1986): Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circ Res* 58(6), 755-68.
29. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002): The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111, 943-55.

30. Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch* 61, 291–332.
31. Litwin SE, Bridge JH (1997): Enhanced Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange in the infarcted heart. Implications for excitation-contraction coupling. *Circ Res* 81(6), 1083-93.
32. Maisel A. (2002): B-type natriuretic peptide levels: diagnostic and prognostic in congestive heart failure: what's next? *Circulation* 105(20), 2328-31.
33. Mani SK, Egan EA, Addy BK, Grimm M, Kasiganesan H, Thiyagarajan T, Renaud L, Brown JH, Kern CB, Menick DR (2010):  $\beta$ -Adrenergic Receptor Stimulated Ncx1 Upregulation is Mediated via a CaMKII/AP-1 Signaling Pathway in Adult Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48(2), 342–351.
34. Menick DR, Xu L, Kappler C, Jiang W, Withers PR, Shepherd N, Conway SJ, Muller JG (2002): Pathways regulating Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger expression in the heart. *Ann NY Acad Sci* 976, 237-247.
35. Molkenkin JD, Dorn GW 2nd (2001): Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63, 391-426.
36. Morgan HE, Baker KM (1991): Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83(1), 13-25.
37. O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E (1999): Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res* 84, 562–570.
38. Piper C, Bilger J, Henrichs EM, Wudel E, Schultheiss HP, Horstkotte D, Dörner A (2000): Is Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger expression altered in the endomyocardium of patients with chronic heart valve diseases parallel to myocardial dysfunction? *Z Kardiol* 89(8), 682-90.
39. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM (1999): Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* 85(11), 1009-19.
40. Prasad AM, Inesi G (2009): Effects of thapsigargin and phenylephrine on calcineurin and protein kinase C signaling functions in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(5), C992–C1002.
41. Reinecke H, Vetter R, Drexler H (1997): Effects of alpha-adrenergic stimulation on the sarcolemmal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger in adult rat ventricular cardiocytes. *Cardiovasc Res* 36, 216-22.
42. Schillinger W, Schneider H, Minami K, Ferrari R, Hasenfuss G (2002): Importance of sympathetic activation for the expression of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage failing human myocardium. *Eur Heart J* 23, 1118-24
43. Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, Hasenfuss G (2003): Relevance of Na/Ca Exchange in Heart Failure. *Cardiovasc Res* 57(4), 921-33.
44. Schillinger W, Teucher N, Christians C, Kohlhaas M, Sossalla S, Van Nguyen P, Schmidt AG, Schunck O, Nebendahl K, Maier LS, Zeitz O, Hasenfuss G (2006): High intracellular Na<sup>+</sup> preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. *Eur J Heart Fail* 8(7), 673-80.

45. Schwinger RH, Wang J, Frank K, Müller-Ehmsen J, Brixius K, McDonough AA, Erdmann E (1999): Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity but unchanged Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99(16), 2105-12.
46. Shigekawa M, Iwamoto T (2001): Cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>(2+)</sup> exchange: molecular and pharmacological aspects. *Circ Res* 88(9), 864-76.
47. Sipido KR, Volders PG, Vos MA, Verdonck F (2002): Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 53(4), 782-805.
48. Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75(3), 443-53.
49. Vemuri R, Longoni S, Philipson KD (1989): Ouabain treatment of cardiac cells induces enhanced Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange activity. *Am J Physiol* 256(6 Pt 1), C1273-6.
50. Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermann S (2001): Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galpha-q/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nature Medicine* 7, 1236-1240.
51. Wilkens BJ, Molkentin JD (2004): Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1178-1191.
52. Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Spitzer KW, Bridge JH, Muelheims G, Ross J Jr, Barry WH (1998): Abnormal myocyte Ca homeostasis in rabbits with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol* 275, H1441-H1448.

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich denen Danken, die mich immer wieder durch wissenschaftliche/technische aber vor allen Dingen auch moralische Unterstützung während meiner Arbeit begleitet haben.

Als erstes sei **Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuss** für die Möglichkeit gedankt, in seiner Abteilung mit stetem Vertrauen promovieren und zur Präsentation der Ergebnisse zu internationalen Kongressen fahren zu können.

**Prof. Dr. med. Wolfgang Schillinger** danke ich ganz besonders, der mir dieses Thema überließ, die Arbeit im Wesentlichen betreute und bei jeder Diskussion und in der Schreibphase mit Rat zur Seite stand.

Des Weiteren sei **Dr. rer. nat. Phuc Van Ngyun** und **Dipl. Biologe Frank Schaub** gedankt, die mich maßgeblich bei den molekularbiologischen Methoden unterstützten, sowie den **MTA Elizabeth Barski, Michael Kothe** und **Sandra Ott-Gebauer** für Ihre Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau **Agnes Christians**, meinen Eltern **Roswitha** und **Franz Christians**, meine Geschwistern **Angela** und **Thomas Christians** und allen anderen noch nicht genannten, die auf meinem bisherigen Weg für mich da waren.

## Lebenslauf

Ich wurde am 30.12.1977 in Xanten geboren und besuchte zuletzt das Andreas-Vesalius-Gymnasium in Wesel, an dem ich 1997 mit der allgemeinen Hochschulreife meine schulische Ausbildung abschloss. Danach absolvierte ich für 13 Monate meinen Zivildienst im Marienhospital Wesel in der urologischen Abteilung. Im Oktober 1998 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Göttingen auf und begann im Sommersemester 2000 eine experimentelle Doktorarbeit in der kardiologischen Abteilung bei Prof. Hasenfuss. Neben dem Studium vertrat ich studentische Interessen in der Studienkommission der Fakultät und als gewählter Vertreter im Fakultätsrat. Des Weiteren arbeitete ich über 5 Jahre auf Stationen und der Notaufnahme des Universitätsklinikums Göttingen im Pflegedienst. Im März 2001 legte ich die ärztliche Vorprüfung, im März 2002 das erste, im August 2004 das zweite und schließlich im November 2005 das dritte Staatsexamen ab, nach dem ich mein praktisches Jahr im Diakoniekrankenhaus in Rotenburg an der Wümme u.a. mit dem Wahlterial Pädiatrie ableistete. Im Dezember 2005 begann ich meine weitere Ausbildung als Weiterbildungs-assistent in der Pädiatrie am Klinikum Leverkusen. Im April 2009 heiratete ich meine Frau Agnes Christians. Nachdem ich im Juni 2009 die Anstellung an das Deutsche Kinderherzzentrum St. Augustin wechselte, erlangte ich im September 2011 die Facharztbezeichnung Kinder- und Jugendmedizin durch die Ärztekammer Nordrhein sowie im April 2012 die Qualifikation zum Neugeborenen-Notarzt durch die Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.

Köln, 01.03.2013