

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Untersuchung der putativen Mechanosensor-Komponenten Melusin und T-cap und deren Einfluss auf die elektromechanische Kopplung im Kardiomyozyten bei adaptiver und maladaptiver Hypertrophie

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Johannes Matthias Vogt

aus
Gotha

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	Prof. Dr. med. L. S. Maier
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. L. Zelarayán-Behrend

Datum der mündlichen Prüfung: 27. September 2017

I -Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Herzinsuffizienz	2
1.2. Die Herzmuskelzelle	3
1.2.1. Ultrastruktur der kontraktiven Einheit	4
1.3. Die elektromechanische Kopplung	5
1.3.1. Systole: zytosolischer Ca^{2+} -Anstieg und Kontraktion	5
1.3.2. Diastole: zytosolische Ca^{2+} -Eliminierung und Zellrelaxation	7
1.3.3. <i>Remodelling</i> der elektromechanischen Kopplung bei der Herzinsuffizienz	8
1.4. Das Aktionspotential und die kardialen Ionenströme	9
1.4.1. Funktionelle und strukturelle Betrachtung der K^+ -Kanäle	10
1.4.2. Der verzögert gleichrichtende K^+ -Kanal I_{Ks}	11
1.4.3. Herzrhythmusstörung durch irreguläre K^+ -Ströme	12
1.4.3.1. Das <i>long-QT1-</i> und <i>long-QT5-syndrome</i>	12
1.5. Die Hypertrophiesignale	13
1.5.1. Die intrazellulären Hypertrophiesignale: Mechanosensorik	14
1.5.1.1. Das zentralisierte Modell der Mechanosensorik.....	15
1.5.1.2. Das dezentralisierte Modell der Mechanosensorik.....	16
1.5.2. Hypertrophie Modelle in der Herzforschung	16
1.6. Melusin und T-cap im Kontext der Mechanosensorik	17
1.6.1. Melusin	17
1.6.2. T-cap (Telethonin)	20
1.7. Fragestellungen der Arbeit	20
1.7.1. Fragestellung zu den elektrophysiologischen Änderungen im T-cap-KO-Modell	21
1.7.2. Fragestellung zu den drei hämodynamisch belasteten Melusin-TG-Modellen	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Das Elektrokardiogramm	22
2.1.1. Allgemeine Darstellung der Elektrokardiographie	22
2.1.2. Das murine Elektrokardiogramm	23
2.2. Myozytenisolation	24
2.2.1. Entnahme des Herzens	24
2.2.2. Die LANGENDORFF-Perfusion zur Gewinnung einzelner Myozyten	25
2.2.3. Verwendete Lösungen zur Isolation	26
2.3. Die <i>patch-clamp</i> -Technik	28
2.3.1. Allgemeiner Überblick der Anlage	28
2.3.2. Anwendungsmöglichkeiten der Technik	29

2.3.3. Aufbau der durchgeführten <i>patch-clamp</i> -Experimente	30
2.3.3.1. Aktionspotentialaufzeichnung und -auswertung	31
2.3.3.2. Verwendete Pipetten- und Badlösung	31
2.4. Epifluoreszenzmikroskopie	32
2.4.1. Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie in der Elektrophysiologie	32
2.4.2. Aufbau des Fluoreszenzmikroskops	33
2.4.3. Messung mit der Epifluoreszenzmikroskopie und Versuchsanordnungen	34
2.4.4. Datenauswertung	35
2.4.5. Versuchslösungen zur Epifluoreszenz	36
2.5. Liste der verwendeten Substanzen	37
2.6. Statistik	37
3. Ergebnisse	39
3.1. T-cap-KO-Charakteristika	39
3.1.1. Elektrokardiographische Beschreibung	39
3.1.2. Das ventrikuläre AP der Kardiomyozyten	41
3.1.2.1. Das Ruhemembranpotential und die Amplitude	41
3.1.2.2. Die Repolarisationsphase	42
3.1.3. Das <i>EC-Coupling</i>	44
3.1.3.1. Sarkomerlänge, Ca ²⁺ -Transient und Zellverkürzung	44
3.1.3.2. <i>Post Rest</i>	48
3.1.3.3. <i>Caffeine</i> -Protokoll	49
3.2. Melusin-TG-Charakteristika	50
3.2.1. Ergebnis der Myokardinfarkt-Intervention (MI)	50
3.2.2. Ergebnis der Intervention Aortenkonstriktion (TAC)	57
3.2.3. Ergebnis der trainierten Tiere (Swim)	63
4. Diskussion	70
4.1. T-cap im Kontext der Mechanosensorik	70
4.1.1. Das QT-Intervall und der Einfluss durch den T-cap-KO	70
4.1.2. T-cap als Interaktionspartner des K ⁺ -Kanals I _{Ks} (KvLQT1/minK)	71
4.1.3. Das <i>EC-Coupling</i> im T-cap-KO	72
4.1.4. Zusammenfassung T-cap	74
4.2. Melusin	75
4.2.1. Der Effekt der MI-Intervention	75
4.2.1.1. Melusineffekt bei der MI-Intervention	78
4.2.2. Der Effekt der TAC-Intervention	79
4.2.2.1. Melusineffekt bei der TAC-Intervention	80
4.2.3. Der Effekt des Trainings (Swim)	81

4.2.3.1. Melusineffekt bei den trainierten Tieren	82
4.2.4. Zusammenfassung Melusin	83
5. Anhang	85
5.1. Ergänzungen zu T-cap	85
5.2. Ergänzungen zu Melusin	86
6. Zusammenfassung	97
7. Literaturverzeichnis	98

II -Abkürzungsverzeichnis

AD/DA	Analog-Digitale Wandler
Akt	Proteinkinase B
AM	Azetoxy-Methylester
ANP	<i>atrial natriuretic peptid</i>
APD	Aktionspotentialdauer
As	Aminosäure
ATP	Adenosyltriphosphat
BDM	Butanedionmonoxim
BNP	<i>brain natriuretic peptid</i>
Bpm	<i>beats per minute</i> = Schläge pro Minute
Ca ²⁺ -Ion	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CHORD-Domäne	Cystein- und Histidin-reiche Domäne
DAD	späte Nachdepolarisation
DAG	Diacylglycerol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid-Lösung
EAD	frühe Nachdepolarisation
<i>EC-Coupling</i>	<i>Excitation-Contraction Coupling</i> / Elektromechanische Kopplung
ECM	Extrazelluläre Matrix
E _K	Gleichgewichtspotential
EKG	Elektrokardiogramm
E _m	Ruhemembranpotential
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FF	<i>Force Frequency</i>
FKBP 12.6	<i>FK 506 binding protein</i>
FR	<i>Fractional Release</i>
GSK3β	<i>glycogen synthase kinase</i>
Hz	Hertz
I _{Ca}	einwärtsgerichteter Ca ²⁺ -Strom über den L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
I _K	K ⁺ -Strom
I _{Ks}	verzögert gleichrichtender K ⁺ -Kanal
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
K ⁺ -Ion	Kaliumion

KO	<i>Knock Out</i>
L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal	spannungsabhängiger L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal (DHPD-Rezeptor)
LQTS	<i>long-QT-syndrome</i>
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
MAPK	<i>mytogen-activated proteinkinase</i> (JNKs, p38 MAPKs, ERK1/2)
MHC	<i>myosin heavy chain</i> = Myosin schwere Kette
MI	Myokardinfarkt
MKKKs	MAPK-Kinase-Kinasen
MKKs	MAPK-Kinasen
MLP	<i>muscle-LIM-protein</i>
Na ⁺	Natrium/ Natriumion
n.s.	nicht signifikant
NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺-exchanger</i> = Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PR	<i>Post Rest</i>
ras	G-Protein
rt ₅₀ ; rt ₈₀ ; rt ₉₀	Relaxationszeit bis zur 50; 80 und 90 %igen Ausgangslänge der Myozyten (FF-S) und die Ca ²⁺ -Eliminationszeit (FF-Ca ²⁺)
RT ₃₀ ; RT ₅₀ ; RT ₈₀ ; RT ₉₀	Repolarisationsdauer bis zum 30; 50; 80 und 90 %igen Spannungsabfall vom <i>peak</i> des AP
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
RZL	Ruhezelllänge
SEM	<i>standard error of the mean</i> = Standardfehler vom Mittelwert
SACs	<i>stretch activated channels</i>
SERCA	Sarko(end)oplasmatische-Ca ²⁺ -ATPase
Sham	Kontrollgruppe ohne Intervention
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Swim	durch Schwimmen trainiertes Tiermodell
TAC	<i>transversal aortic coarctation intervention</i> (Aortenkonstriktion)
T-cap	Telethonin
TG	transgen
TUNEL-Methode	weist -OH Gruppen der fragmentierten DNA bei Apoptose nach

UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
vs.	versus
VT	ventrikuläre Tachykardie
w/v	<i>weight/volume</i> , relative Lösungsverhältnis: $\frac{m[g]}{V[ml]} * 100 = w/v[\%]$
WT	Wildtyp

III - Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abbildungsverzeichnis		Tabellenverzeichnis		Formelverzeichnis	
	Seite		Seite		Seite
Abb. 1.1.	3	Tab. 2.1.	27	Formel 2.1.	24
Abb. 1.2.	4	Tab. 2.2.	27	Formel 2.2.	36
Abb. 1.3.	6	Tab. 2.3.	27		
Abb. 1.4.	9	Tab. 2.4.	28		
Abb. 1.5.	10	Tab. 2.5.	32		
Abb. 1.6.	11	Tab. 2.6.	32		
Abb. 1.7.	14	Tab. 2.7.	36		
Abb. 1.8.	18	Tab. 2.8.	36		
Abb. 1.9. A/ B	19	Tab. 2.9.	36		
Abb. 2.1.	26	Tab. 2.10.	36		
Abb. 2.2.	29	Tab. 2.11.	37		
Abb. 2.3.	34	Tab. 2.12.	37		
Abb. 3.1.	40	Tab. 3.1.	39		
Abb. 3.2. A/ B	40	Tab. 3.2.	43		
Abb. 3.3.	41	Tab. 3.3.	46		
Abb. 3.4. A/ B	42	Tab. 3.4.	47		
Abb. 3.5.	43	Tab. 3.5.	47		
Abb. 3.6. A/ B	45	Tab. 3.6.	47		
Abb. 3.7. A/ B	46	Tab. 3.7.	48		
Abb. 3.8.	48	Tab. 3.8.	48		
Abb. 3.9. A/ B	49	Tab. 3.9.	51		
Abb. 3.10. A/ B	52	Tab. 3.10.	54		
Abb. 3.11. A/ B/ C	53	Tab. 3.11.	54		
Abb. 3.12. A/ B	55	Tab. 3.12.	57		
Abb. 3.13.	56	Tab. 3.13.	59		
Abb. 3.14. A/ B/ C	57	Tab. 3.14.	60		
Abb. 3.15. A/ B	58	Tab. 3.15.	63		
Abb. 3.16.	60	Tab. 3.16.	65		
Abb. 3.17.	61	Tab. 3.17.	66		
Abb. 3.18.	62	Tab. 5.1.	86		
Abb. 3.19. A/ B/ C	62	Tab. 5.2.	86		
Abb. 3.20. A/ B	64	Tab. 5.3.	87		
Abb. 3.21. A/ B	67	Tab. 5.4.	88		
Abb. 3.22.	67	Tab. 5.5.	89		
Abb. 3.23. A/ B/ C	68	Tab. 5.6.	90		
Abb. 5.1. A/ B/ C/ D	85	Tab. 5.7.	91		
Abb. 5.2. A/ B	87	Tab. 5.8.	91		
Abb. 5.3. A/ B	88	Tab. 5.9.	92		
Abb. 5.4.	89	Tab. 5.10.	93		
Abb. 5.5. A/ B	90	Tab. 5.11.	94		
Abb. 5.6. A/ B	92	Tab. 5.12.	95		
Abb. 5.7. A/ B	93				
Abb. 5.8. A/ B	95				
Abb. 5.9.	96				

1. Einleitung

Ein zentrales Forschungsgebiet der Kardiologie sind die zellulären Signale der Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Unter den vielfältigen Mechanismen der Hypertrophiesignale kann ein neurohumorales und ein intrazelluläres System unterschieden werden. Das intrazelluläre System wird anscheinend durch im Zytoskelett verankerte Mechanosensoren reguliert (KNÖLL et al. 2003). Die Proteine Melusin und T-cap konnten als Zytoskelettbestandteile der Kardiomyozyte zugeordnet werden (GREGORIO et al. 1998; BRANCACCIO et al. 1999), von ihnen wird vermutet, dass sie wichtiger Bestandteil des Mechanosensors sein könnten.

In dieser Arbeit werden die genetisch veränderten Mausmodelle T-cap-*Knock Out* (KO) und Melusin-transgen (TG) charakterisiert. Der Verlust jedes einzelnen dieser beiden Proteine geht mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) einher (BRANCACCIO et al. 2003a; BOS et al. 2006). Beiden Proteinen konnte eine Verbindung von der kontraktile Einheit der Kardiomyozyte zur Zellmembran nachgewiesen werden (GREGORIO et al. 1998; BRANCACCIO et al. 1999). T-cap scheint mit einem K⁺-Kanal und Melusin mit den Signalträgern der Zellmembran, den Integrinen, zu interagieren. Dies suggeriert eine funktionelle Bedeutung der Zellbestandteile für die Mechanosensorik.

Die folgenden Abschnitte geben eine Einführung zum Thema der Herzinsuffizienz sowie den Aufbau und die Funktion des Kardiomyozyten. Darunter werden die elektromechanische Kopplung (*EC-Coupling*) und das Aktionspotential (AP) beschrieben. Begleitend werden die Anpassungsvorgänge bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz dargestellt. Abschließend folgt die Überleitung zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytoskelettbestandteilen T-cap und Melusin im Kontext der Mechanosensorik mit den zugehörigen Hypothesen.

1.1. Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom und beschreibt das Unvermögen des Herzens, der Anforderung der Organdurchblutung nachzukommen. Es kommt zu einer verminderten körperlichen Belastbarkeit. Folglich geht die Herzinsuffizienz mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten einher.

An einer Herzinsuffizienz leiden circa 5 % der Gesamtbevölkerung. Im höheren Alter sind dies mehr als 20 % bei den über 70-Jährigen und mehr als 50 % bei den über 80-Jährigen. Die Herzinsuffizienz ist die häufigste Einweisungsdiagnose für eine stationäre Behandlung bei den über 60-Jährigen. Die mittlere Überlebensrate 5 Jahre nach Erstdiagnose beträgt 50 %. Bei symptomatischer Herzinsuffizienz liegt die jährliche Letalität trotz optimaler Therapie zwischen 16-25 % pro Jahr und damit im Bereich bösartiger Erkrankungen wie Brust- oder Darmkrebs. Obwohl die Anstrengungen der letzten Jahrzehnte das mittlere Überleben um etwa ein Jahr verbessern konnten, ist die Sterblichkeit insgesamt noch immer sehr hoch.

Die ventrikuläre Funktionsstörung bei Herzinsuffizienz kann ätiologisch in eine systolische, diastolische und arrhythmische Störung eingeteilt werden. Die häufigsten Ursachen sind die arterielle Hypertonie und die koronare Herzerkrankung mit folglich ischämischer Herzkrankheit (KENCHAIAH et al. 2004). Es gibt jedoch auch angeborene Ursachen, wie zum Beispiel die familiäre DCM. Die ständige Belastung durch Volumen, Druck, Kontraktionsschwäche oder Rhythmusstörung führt zu einem so genannten *low output failure*, das eine verminderte periphere Durchblutung bedingt (Vorwärtsversagen). Als Anpassungsmechanismus wird daraufhin das neurohumorale System aktiviert (Adrenalin/ Renin-Aldosteron-Angiotensin System/ Vasopressin/ natriuretische Peptide). Die Anpassungsvorgänge im Kardiomyozyten (*remodelling*) basieren auf elektrophysiologischer, kontraktile und struktureller Ebene. Eine gutartige Adaption ist die kompensierte Hypertrophie, hierbei weist das Herz bereits spezifische Veränderungen auf, jedoch noch ohne Insuffizienzzeichen wie Vorwärtsversagen mit Leistungsabfall durch Muskelschwäche und Ermüdbarkeit sowie Rückwärtsversagen mit Stauungszeichen.

Die Hypertrophie ist gekennzeichnet durch Kardiomyozytenwachstum, Kapillarausbildung und Fibroblastenproliferation mit Zunahme der extrazellulären Matrix (ECM) und Fibrose des Herzens. Die Herzhypertrophie kann solange kompensiert sein, bis ein kritisches Herzgewicht überschritten wird. Daraufhin kann eine relative Koronarinsuffizienz entstehen mit Apoptose von Kardiomyozyten. Dadurch wird das Herzgefüge gestört und die Ventrikel dilatieren. Das Herz ist dekompenziert.

1.2. Die Herzmuskelzelle

Die Herzmuskelzellen sind im Verbund parallel zueinander angeordnet und im humanen Myokard circa 15 µm breit und 80-100 µm lang. Sie stellen ein funktionelles Synzytium dar, weil sie sowohl mechanisch als auch funktionell miteinander verbunden sind. Die funktionelle Verbindung der Zellen wird durch interzelluläre Poren erreicht. Diese *gap junctions* werden aus sechs Connexinmolekülen auf jeder Membranseite gebildet. Durch die Pore ist ein Molekül- und Ladungsaustausch möglich. Das ist Grundlage für die kontinuierliche Erregungsweiterleitung der Aktionspotentiale und synchrone Kontraktion der Vorhöfe und Herzkammern.

Die Kardiomyozyte wird nach außen von einer Zellmembran umgeben. Diese besteht aus einer Lipiddoppelschicht (*lipid bilayer*), in die Proteine eingereiht sind (SINGER und NICOLSON 1972). Die Proteine ermöglichen Stoffwechselfunktionen, um den spezifischen Anforderungen an das Organ nachzukommen. Die Zellmembran der Kardiomyozyten wird auch Sarkolemm genannt und stülpt sich zur Vergrößerung der Oberfläche abschnittsweise schlauchartig in das Zellinnere ein (siehe Abb. 1.1.). An den schlauchartigen Einstülpungen, den so genannten transversalen (T-) Tubuli der Zellmembran, findet sich unter anderem der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, welcher in dieser Region dem intrazellulären Schlauchsystem, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) nahe liegt. Diese enge Beziehung zwischen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und SR ist für die Regulation der elektromechanischen Kopplung wichtig.

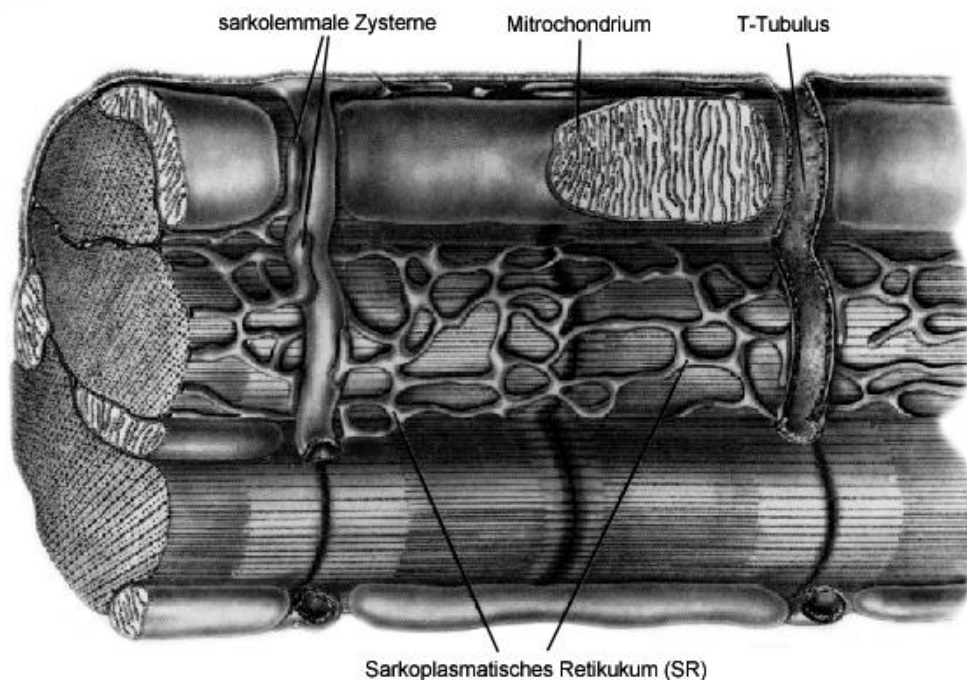


Abb. 1.1.

In der Abbildung sind verschiedenen Kompartimente der Kardiomyozyte in Beziehung zu den Zellorganellen dargestellt. (Nach BERS 2001, Seite 3. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

Lichtmikroskopisch erscheinen die Kardiomyozyten wie die Skelettmuskulatur als quergestreifter Muskel. Dies ergibt sich aus der Anordnung der kontraktilen Elemente im Kardiomyozyt. Die kleinste kontraktile Einheit wird als Sarkomer benannt. Die Kardiomyozyten besitzen als Zellorganelle den Zellkern (Nukleus) mit der genetischen Information sowie die Mitochondrien zur Energiebereitstellung in Form von Adenosyltriphosphat (ATP), das SR als Ca^{2+} -Speicher, den Golgi Apparat, die Lysosomen, Peroxisomen, sekretorische Granula und das Zytoskelett. Energiespeicher liegen der Kardiomyozyte in Form von Lipidtröpfchen und als Glykogen vor.

1.2.1. Ultrastruktur der kontraktilen Einheit

Die kontraktilen Einheiten liegen in direkter Nachbarschaft zu den T-Tubuli, den Einstülpungen der Zellmembran und einem schlauchartigen System, dem SR (auch longitudinaler L-Tubulus). Im SR werden die zur Kontraktion essentiellen Ca^{2+} -Ionen an das Protein Calsequestrin gebunden (OSTWALD und MAC LENNAN 1974). Weiterhin enthält das SR einen Ca^{2+} -Freisetzungskanal, den so genannten Ryanodinrezeptor (RyR), durch den die Ca^{2+} -Ionen für die Kontraktion in das Zytosol ausgeschüttet werden (LAI et al. 1988; INUI et al. 1987).

Elektronenmikroskopisch lässt sich das durchschnittlich 2 μm lange Sarkomer wie folgt unterteilen. Die äußere Begrenzung wird als Z-Linie bezeichnet. An der Z-Linie sind die Aktinfilamente und das Titin fixiert. Titin ist vermutlich Teil des Dehnungssensors des Sarkomers (LINKE 2008). Die für die vorliegende Arbeit wesentlichen Proteine T-cap und Melusin sind hier im Bereich der Z-Linie lokalisiert. In der I-Bande liegen die Aktinfilamente und das Titin vor, während durch die H-Bande nur die Myosinfilamente ziehen. In der A-Bande erstreckt sich das gesamte Myosinmolekül. Die M-Linie markiert die zentrale Trennlinie (siehe Abb. 1.2.).

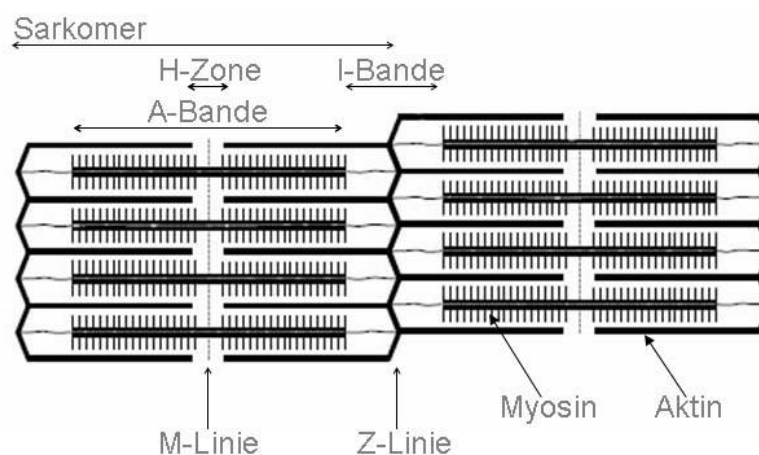


Abb. 1.2.

Darstellung zweier angrenzender Sarkomere. Die Bezeichnungen sind deskriptiv und ergeben sich aus der unterschiedlichen Überlagerung der Proteine im elektronenmikroskopischen Bild. Die Z-Linie ist eine Region mit vielen verankerten Proteinen unter anderen Titin, T-cap und Melusin. (Nach BERS 2001, Seite 16. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

1.3. Die elektromechanische Kopplung

Unter elektromechanischer Kopplung versteht man die Kopplung der elektrochemisch gespeicherten Energie in mechanische Arbeit. Das Resultat ist die Kontraktion der Kardiomyozyte nach dem Modell der Filamentgleittheorie von HUXLEY (1969). Durch die Depolarisation der Zellmembran kommt es zur Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridin Rezeptoren/ DHPD) entlang der sarkolemmalen T-Tubuli. Dies führt zum Ca^{2+} -Einstrom in diesen Bereich.

1.3.1. Systole: zytosolischer Ca^{2+} -Anstieg und Kontraktion

Der zytosolische Ca^{2+} -Anstieg erfolgt zum einen über den Ca^{2+} -Einstrom des sarkolemmal lokalisierten L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (I_{Ca}), auch Dihydropyridin Rezeptor (DHPR) genannt, und zum anderen den Ryanodinrezeptor (RyR) im SR. In der Abbildung 1.3. ist der schematische Zusammenhang des transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstroms und der Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR dargestellt. Lokalisation des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals ist der Kreuzungspunkt zwischen transversalen und longitudinalen Tubuli, den so genannten Diaden. Hier liegt er in direkter Nachbarschaft zum RyR. Der RyR ist auf seiner luminalen Seite Kalzium-sensitiv und wird durch den gegenüberliegenden Ca^{2+} -Einstrom aktiviert. Durch Öffnen des RyR's kommt es zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, welcher der wesentliche Anteil des Anstiegs der freigesetzten Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol von diastolisch 100 nM auf systolisch etwa 1 μM ist. Die durch das Ca^{2+} -Ion induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR wurde von FABIATO und FABIATO 1975 beschrieben (*Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release*). Dabei erreicht die Ca^{2+} -Konzentration im Zentrum der Diaden bis zu 600 μM (LANGER und PESKOFF 1996).

Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ergibt sich zu 30-40 % aus extrazellulären Ca^{2+} -Ionen und zu 60-70 % aus sarkoplasmatisch freigesetzten Ca^{2+} -Ionen im humanen Myokard (PIESKE et al. 1999). In der Maus ist das Verhältnis etwa 90 % sarkoplasmatisch und 10 % extrazellulär (BERS 2001). Dabei ist dieses Verhältnis neben der Spezies auch von der Herz- beziehungsweise Stimulationsfrequenz abhängig (MAIER et al. 1998).

Eine Regulationsmöglichkeit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals ist durch β -Adrenorezeptorstimulation gegeben, hierbei wird mithilfe zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) vermehrt Proteinkinase A (PKA) aktiviert. PKA phosphoryliert den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und erhöht dadurch den Ca^{2+} -Einstrom. Weiterhin kann durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal phosphoryliert und dadurch moduliert werden (GRUETER et al. 2006).

Der RyR besitzt drei Isoformen. Die Isoform RyR2 ist im Kardiomyozyten vertreten. Der RyR wird durch einen Komplex von Proteinen reguliert, darunter das FKBP. FKBP stabilisiert zum einen den Kanal, zum anderen steuert es das so genannte *coupled gating*, das mehrere RyR zu einer Kalzium-freisetzenden Einheit koordiniert (*Ca^{2+} -release-unit*, LEHNART et al. 2003).

Weitere Möglichkeiten der Regulation finden durch die Phosphorylierung von cAMP-abhängiger PKA oder der CaMKII statt. Eine pharmakologische Interaktion ist durch das Methylxanthin *caffeine* (Koffein) beschrieben. Dies verursacht eine Öffnung des RyR's. Neben den Methylxanthinen können Ryanodin, ATP und andere den RyR beeinflussen.

Die zytosolischen Ca^{2+} -Ionen binden an das Aktinfilament der kontraktiven Einheit. Hierbei binden sie spezifisch an die Troponin C-Untereinheit des Aktins und setzen damit die Bindungsstelle für das Myosinköpfchen am Aktin frei. Die zwei Myosinköpfchen am Myosin haben jeweils ein ATP gebunden. Dieser Myosin-ATP-Komplex bindet an die jetzt frei gewordene Bindungsstelle des Aktins. Unter Hydrolyse des ATP's verlagert sich das Myosinköpfchen durch Konformationsänderung um 40° . Nach Lösen von ADP aus dem Aktin-Myosin-ADP-Komplex resultiert die Endstellung des Myosinköpfchens von 45° . Damit ist die Verschiebung der Filamente erfolgt, die Sarkomere kontrahieren sich. Abschließend bindet ATP wieder an die frei gewordene Bindungsstelle am Myosinköpfchen. Die Aktin-Myosin-Assoziationskonstante wird vermindert, das Myosin löst sich vom Aktin (Weichmachereffekt des ATP's). Das Myosinköpfchen nimmt seine Ausgangskonformation von 90° ein und steht einem erneuten Zyklus zur Verfügung. Die wiederholten Zyklen des Anlagerns und Abknickens erzeugen ein Vorbeigleiten der beiden Filamente. Es resultiert die Kontraktion des Muskels (Filamentgleittheorie von HUXLEY 1969), wodurch es zur systolischen Kontraktion des Herzens kommt.

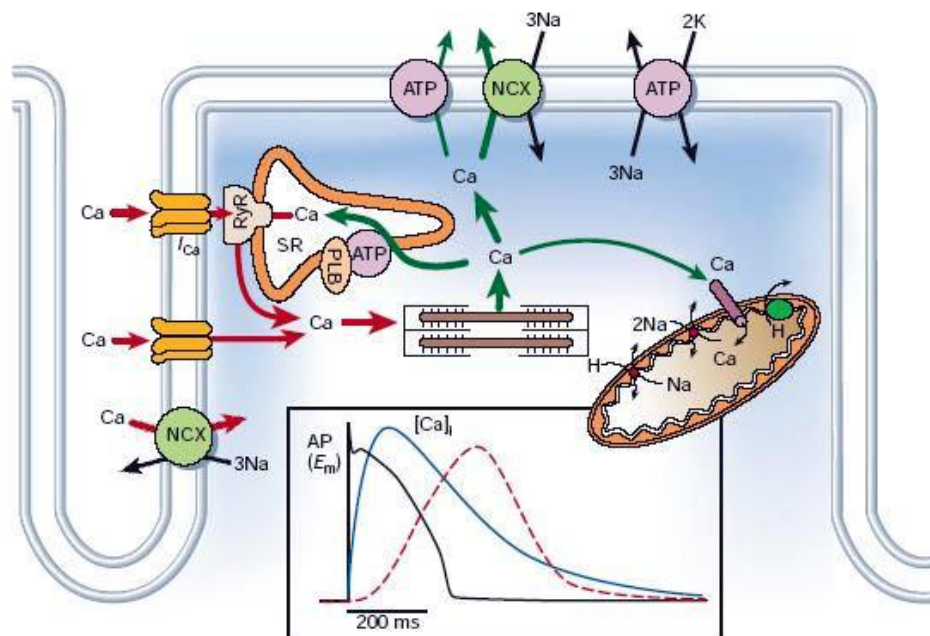


Abb. 1.3.

Schematischer Ablauf der elektromechanischen Kopplung in der Kardiomyozyte. Dargestellt ist ein Teil der Zellmembran des Kardiomyozyten mit den entsprechenden Kanalproteinen. Die roten Pfeile markieren den Ca^{2+} -Strom in das Zytosol von extrazellulärer Seite und aus dem SR. Die grünen Pfeile markieren den Ca^{2+} -Fluss bei der Eliminierung aus dem Zytosol. Die Grafik demonstriert den Zusammenhang zwischen dem kardialen AP (schwarz), dem Ca^{2+} -Anstieg (blau) und der Kontraktion (rot gestrichelt). (Nach BERS 2002a, Seite 198)

Die Kraftübertragung (Mechanotransduktion) von den Sarkomeren in den Myofibrillen auf die Zellmembran und die anliegenden Muskelzellen im Organ wird durch Strukturproteine des Zytoskeletts ermöglicht. Der entsprechende Proteinkomplex wird als *costamer* bezeichnet und beinhaltet unter anderem Integrin, Vinculin und Talin (SAMAREL 2005).

1.3.2. Diastole: zytosolische Ca^{2+} -Eliminierung und Zellrelaxation

Die Eliminierung/Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen erfolgt über drei wesentliche Mechanismen: die Wiederaufnahme (*reuptake*) in das SR, den Transport nach extrazellulär und zum geringen Teil in die Mitochondrien. Die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR wird über die Sarko(endo)plasmatische- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) ermöglicht. Von der SERCA sind fünf Isoformen, welche auch in nicht-muskulären Gewebe vorkommen bekannt. In der Kardiomyozyte wird die Isoform SERCA2a exprimiert (ZARAIN-HERZBERG et al. 1990). Bedeutend für die Steuerung der Wiederaufnahme ist eine Beeinflussbarkeit der SERCA, durch Phospholamban (PLB; KIRCHBERGER et al. 1974; TADA et al. 1975). PLB als integrales Protein des SR's wirkt in seiner dephosphorylierten Form hemmend, da es mit der SERCA verbunden ist. Im phosphorylierten Zustand wirkt PLB enthemmend auf die SERCA und fördert die Rückaufnahme in das SR (INUI et al. 1986; JAMES et al. 1989; KIM et al. 1990). PLB kann dabei an drei verschiedenen Positionen reversibel phosphoryliert werden. Die phosphorylierten Aminosäuren (As) sind dabei Serin 10, Serin 16 und Threonin 17. PLB nimmt durch die Phosphorylierung eine Vermittlerposition zwischen der SERCA und den verschiedenen Proteinkinasen ein. Zu den PLB steuernden Proteinkinasen gehören die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase C und die CaMKII.

Der andere Mechanismus zur Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -*exchanger*/ NCX); BERS 2001). Der NCX liegt als transmembranäres Protein im Sarkolemm der Kardiomyozyte vor. Im Herz wird die Variante NCX1 exprimiert (NICOLL et al. 1990). In anderen Geweben kommen noch die Isoformen NCX2 und NCX3 vor. Nach extrazellulär wird jeweils ein Ca^{2+} -Ion gegen drei Na^+ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten transportiert. Dieser elektrogene Transport hat zur Folge, dass der NCX bei positiveren Membranpotential (> -40 mV), zum Beispiel bei der Depolarisation, in umgedrehter Richtung arbeiten kann (*reverse mode*; BIRKELAND et al. 2005). Für den NCX konnte bis jetzt noch keine eindeutige Regulierbarkeit durch Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Von geringerer Bedeutung für den Ca^{2+} -Transport ist die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und der mitochondriale Uniporter mit anteilig circa 2 % der Ca^{2+} -Elimination.

Durch die zytosolische Ca^{2+} -Elimination auf Werte unter $1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Ionen, relaxiert sich die Kardiomyozyte und erreicht ihre diastolische Ausgangslänge.

1.3.3. Remodelling der elektromechanischen Kopplung bei der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist die kontraktile Dysfunktion auf zellulärer Ebene. Diese kontraktile Dysfunktion ist durch Anpassungsvorgänge in der elektromechanischen Kopplung zu erkennen.

Quantitativ konnte eine Abnahme der SERCA-Expression und eine Zunahme der NCX-Expression festgestellt werden (HASENFUSS et al. 1997). Die Aktivität der SERCA ist generell herunterreguliert im insuffizienten Herzen. Die Verminderung der SERCA-Expression und –Aktivität führt zu verlängerten Ca^{2+} -Eliminations- und Relaxationszeit im insuffizienten Herzen (HASENFUSS et al. 1994; PIESKE et al. 1995). Der NCX scheint in seiner Aktivität hochreguliert zu sein (HASENFUSS et al. 1999; PIESKE et al. 1999).

Der RyR scheint mengenmäßig nicht verändert (ARAI et al. 1993; SCHILLINGER et al. 1996), er wird jedoch vermehrt phosphoryliert in Kardiomyozyten vorgefunden. Dadurch dissoziiert das Regulatorprotein FKBP 12.6 vom Kanal ab, das eine vermehrte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR's zur Folge hat. Über das so entstandene Ca^{2+} -leak gehen Ca^{2+} -Ionen in der Diastole aus dem SR verloren. Diese Ca^{2+} -leak kann ventrikuläre Tachykardien fördern (LEHNART et al. 2006). Weiterhin entsteht ein verminderter SR- Ca^{2+} -Gehalt (YANO et al. 2000).

Zusammenfassend sind die verminderte Aktivität der SERCA, ein Ca^{2+} -Verlust aus dem SR über den RyR und die Zunahme der Ca^{2+} -Eliminierung durch den NCX nach extrazellulär entscheidend für die veränderte Ca^{2+} -Homöostase bei Herzinsuffizienz. Dies beinhaltet einen reduzierten SR- Ca^{2+} -Gehalt mit reduzierter Ca^{2+} -Amplitude und folglich eingeschränkter Kontraktilität (BERS 2001).

Im Kardiomyozyten ist die Kraft-Frequenzbeziehung nur noch schwach positiv oder sogar negativ. Negativ beschreibt hierbei die Abnahme der systolischen Ca^{2+} -Transienten und somit der Kontraktionskraft bei zunehmender Herzfrequenz (HASENFUSS et al. 1996; ENDOH 2004). Säugetierherzen zeigen physiologisch eine positive Kraft-Frequenzbeziehung, das heißt die Kontraktionskraft steigt durch zunehmende Ca^{2+} -Transienten bei Herzfrequenzanstieg.

Zusätzlich konnte eine veränderte Ansprechbarkeit der kontraktile Elemente auf Ca^{2+} -Ionen beim insuffizienten Herz beschrieben werden (HAJJAR und GWATHMEY 1992). Die hierbei zumeist erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität wird auf einen Isoformenwechsel (Shift) der Myosinmoleküle zurückgeführt. Auch sind Isoformenshifts der Isoformen von Troponin T und I bekannt (DE TOMBE 1998; VAN DER VELDEN et al. 2004).

1.4. Das Aktionspotential und die kardialen Ionenströme

Das Aktionspotential (AP) beruht auf unterschiedlichen Ionenströmen über die Zellmembran beruht auch auf Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen. Durch die selektive Permeabilität der Ionenkanäle können die unterschiedlichen Ionen entlang des Konzentrationsgefälles (chemischer Gradient) fließen. Dabei entsteht ein elektrischer Gradient (elektrische Spannung). Die resultierende Änderung des Membranpotentials in der Summe aller Ströme ist das AP.

Das Ruhemembranpotential der humanen Kardiomyozyte entspricht mit -80 mV ungefähr dem Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen (BERS 2001). Das kardiale AP beginnt mit einem schnellen Aufstrich ($200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; vergleiche Abb. 1.4.), welcher durch eine erhöhte Leitfähigkeit der Membran für Na^+ -Ionen (I_{Na}) entsteht. Dabei bewegt sich das Membranpotential in Richtung des Ruhemembranpotentials für das Na^+ -Ion. Dieses ist positiv und es kommt zur Depolarisation der Zelle. Das Membranpotential liegt am Gipfel des Ausschlags (*peak*) im Kardiomyozyten zwischen $+35$ bis $+50 \text{ mV}$.

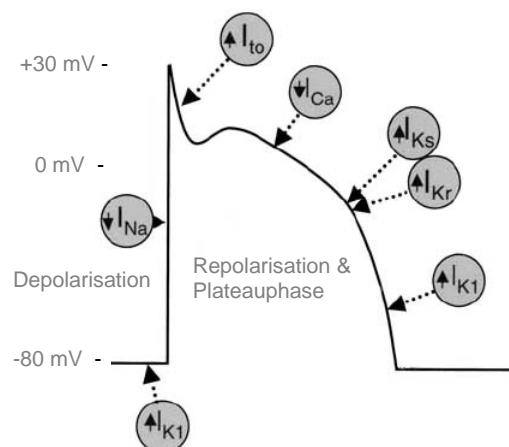


Abb. 1.4.

Spannungskurve eines kardialen AP's im Menschen. Die angezeigten Ströme weisen auf die vorliegenden Ionenströme der entsprechenden Phase des AP's. Die Richtungspfeile vor den Ionenströmen weisen auf den Nettostrom nach intra- beziehungsweise extrazellulär hin. (Nach POURRIER et al. 2003 modifizierte Abb., Seite 142)

Mit zunehmender Depolarisation der Membran steigt die treibende Kraft (elektrochemische Triebkraft) für den repolarisierenden K^+ -Strom an ($E_m - E_K$). Der Auswärtsstrom der K^+ -Ionen übersteigt den Einwärtsstrom von Na^+ -Ionen, das Membranpotential bewegt sich in Richtung Gleichgewichtspotential der K^+ -Ionen, folglich fällt die Spannungskurve der frühen Repolarisationsphase ab. Hieran sind spannungsaktivierte K^+ -Kanäle (I_{to}) und inaktivierte Na^+ -Kanälen (I_{Na}) beteiligt. An den sprunghaften initialen Abfall des Membranpotentials folgt die Plateauphase des AP's. Die langsame Repolarisation der Spannungskurve, basiert auf dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Die späte Plateauphase wird von den *delayed-rectifier* (verzögert-gleichrichtenden) K^+ -Strömen (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}) getragen. Vor allem I_{Kr} und I_{Ks} werden

für ihre Bedeutung in der späten Plateauphase in den folgenden Abschnitten detailliert aufgezeigt.

Die weitere Repolarisation des Membranpotentials in Richtung des diastolischen Ruhemembranpotentials ist durch die fortschreitende Zunahme der K^+ -Ströme I_{Kr} und I_{K1} erklärt. I_{Kr} wird mit zunehmender Repolarisation deaktiviert, der K^+ -Strom I_{K1} bei der nächsten Depolarisation reduziert und beendet. I_{K1} gehört zu den *inward-rectifier* (einwärts-gleichrichtenden) K^+ -Kanälen und bleibt im Verlauf des ruhenden Membranpotentials bis zur nächsten Depolarisation offen. Das nun vorherrschende negative Ruhemembranpotential erhöht wiederum die treibende Kraft für die Na^+ -Ionen (und Ca^{2+} -Ionen). Somit kann durch die Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle (I_{Na}) ein weiteres AP eingeleitet werden.

In der Maus ist das AP sehr kurz. Durch die höhere physiologische Herzfrequenz wird die Plateauphase stark vermindert (siehe Abb. 1.5.). Weiterhin ist bei der Maus der Ca^{2+} -Strom (I_{Ca}) der Plateauphase nur circa 1/3 im Vergleich zum humanen Ca^{2+} -Strom (BERS, 2001).

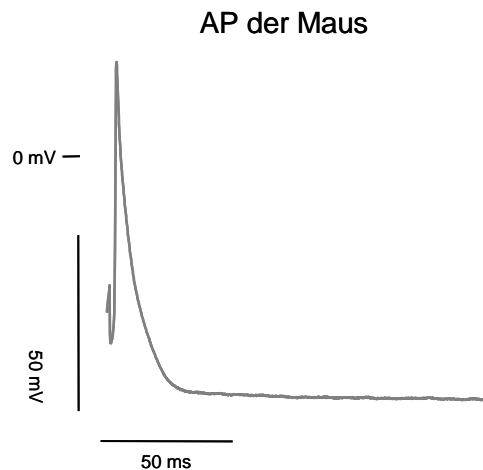


Abb. 1.5.

Abbildung eines AP der Maus mit stark verkürzter Plateauphase. Gemessen im WT mit der *patch-clamp*-Technik in der vorliegenden Arbeit.

1.4.1. Funktionelle und strukturelle Betrachtung der K^+ -Kanäle

Der K^+ -Kanal (I_K) gehört zu den wesentlichen Strömen des kardialen AP's. Er durchspannt die Zellmembran mit sieben transmembranären Proteindomänen. Der Zusammenschluss der Domänen bildet eine zentrale Pore (SALKOFF et al. 2005). Für die Selektivität ist wahrscheinlich das *P-loop* im Protein verantwortlich (KUROKAWA et al. 2001). Die Spannungsabhängigkeit der Kanäle wird durch die Konformationsänderung einer Poren versperrenden S4 Domäne, die für eine Änderung des Membranpotentials sensibel ist erklärt (MANNUZZU et al. 1996; YANG et al. 1996).

Zu den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen zählen $I_{to,fast}$, $I_{to,slow}$ in der frühen Repolarisation, I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} , I_{Kp} , $I_{K,slow}$ in der späten Repolarisation und I_{K1} während des Ruhemembranpotentials. Der K^+ -Kanal wird funktionell in zwei Subgruppen, den *inward-rectifier* (einwärts-gleichrichtend) und den *delayed-rectifier* (verzögert-gleichrichtend) Kanal,

unterschieden. Die *delayed-rectifier*-K⁺-Ströme sind vor allem in der späten Plateauphase am kardialen AP beteiligt (BERS, 2001).

1.4.2. Der verzögert gleichrichtende K⁺-Kanal I_{Ks}

Zu den *delayed-rectifier*-K⁺-Kanälen zählen die drei Ionenströme I_{Kr}, I_{Ks} und I_{Kur} der späten Repolarisation. Diese zeigen als biophysikalisches Merkmal eine langsame Aktivierung während der Depolarisation der Membran und eine geringe Inaktivierung ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit während der anhaltenden Plateauphase. Die Nomenklatur der K⁺-Kanälen I_{Kr}, I_{Ks} und I_{Kur} bezieht sich auf die Inaktivierung, die als schnell (*rapid*), langsam (*slow*) und *ultra rapid* beschrieben wurde (SANGUINETTI und JURKIEWICZ 1990; SANGUINETTI und JURKIEWICZ 1991).

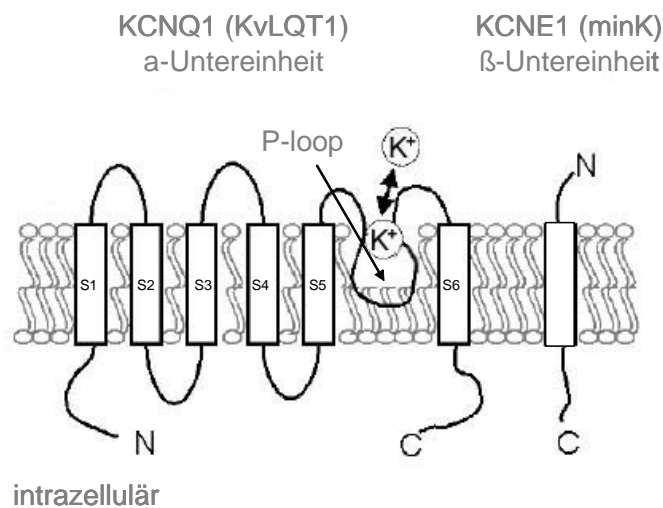


Abb. 1.6.

In der Abbildung ist schematisch die Proteinstruktur des I_{Ks} dargestellt. Das Genprodukt von KCNQ1 ist mit den sechs transmembranären Domänen (S1–S6) die α-Untereinheit. Hier befindet sich auch der Ionenselektivitätsfilter, das so genannte *P-loop*. Die Kanal modulierende β-Untereinheit ist das Genprodukt von KCNE1 und stellt sich als einfache transmembranäre Domäne dar. (Nach KUROKAWA et al. 2001 modifizierte Abb., Seite 878)

Das entsprechend kodierende Gen (KvLQT1) für den K⁺-Kanal I_{Ks} wurde bei der Untersuchung des *long-QT-syndrome* erstmals beschrieben (LQT1; WANG et al. 1996). KvLQT1 stellt dabei die α-Untereinheit des I_{Ks} dar. Zur Komplettierung des I_{Ks} wird die β-Untereinheit benötigt, das Protein minK (auch KCNE1; SANGUINETTI et al. 1996; BARHANIN et al. 1996). Die β-Untereinheit (minK/KCNE1) stellt dabei die modulierende Einheit des Kanals dar, sie ragt mit ihrem C-terminalen Ende in die Porenregion des Kanals hinein (siehe Abb. 1.6.). Zu den durch sie regulierten Eigenschaften zählen unter anderen die Ionenleitfähigkeit, die Ionenselektivität, die Kinetik und die Pharmakologie (BUSCH und SUESSBRICH 1997; ROMÉY et al. 1997; WANG et al. 1998). I_{Ks} wird anscheinend durch Phosphorylierung an verschiedenen Kanalseiten durch PKC und PKA reguliert, hierbei kann die β-adrenerge Stimulation die Amplitude erhöhen und die Aktivierung zu einem negativeren

Ruhemembranpotential verschieben (BERS, 2001). Im Mausmodell weist der I_{Ks} eine Regulierbarkeit durch die PKC an der minK-Untereinheit auf (VARNUM et al. 1993).

Yeast-2-Hybrid Untersuchungen konnten eine mögliche Interaktion der zytosolischen Seite der β -Untereinheit (minK) am C-terminalen Ende, mit dem in der Z-Linie lokalisierten Protein T-cap zeigen (FURUKAWA et al. 2001). Eine Verbindung von kontraktile Komponenten mit dem K^+ -Strom I_{Ks} über T-cap als Adapter Protein, könnte eine Möglichkeit der Zelle darstellen, Dehnungsreize mit einem veränderten Repolarisationsverhalten (K^+ -Strom) zu beantworten.

1.4.3. Herzrhythmusstörung durch irreguläre K^+ -Ströme

Ein Zusammenhang von irregulären AP und Herzrhythmusstörungen wurde bereits 1988 beschrieben (CRANFIELD und ARONSON 1988). Zu den Abweichungen im AP gehören die frühen Nachpolarisationen (Early After Depolarization/ EAD) und die späten Nachdepolarisationen (Delayed After Depolarization/ DAD). EAD und DAD können Herzrhythmusstörungen auslösen.

Die DAD treten nach der vollständigen Repolarisation der Membran auf. Sie können durch die sarkoplasmatische Überladung und folgender spontaner Ca^{2+} -Freisetzung entstehen (BASSANI und BERS 1995; BERS, 2001).

Die EAD zeigen sich während der gesamten Repolarisationsphase. EAD können bei einer verlängerten Aktionspotentialdauer (APD) auftreten. Die APD ist beispielsweise bei Bradykardien oder bei Reduktion von K^+ -Strömen (RODEN und HOFFMAN 1985) oder vermehrten Na^+ - oder Ca^{2+} -Strömen verlängert. Die APD kann außerdem durch Hypokaliämie, pharmakologische Intervention und kongenitale Defekte der K^+ - und Na^+ -Kanäle beeinflusst werden.

1.4.3.1. Das *long-QT1-* und *long-QT5-syndrom*

Eine Erkrankung, die mit einer verlängerten APD und K^+ -Kanalddefekten in Bezug gebracht wird, ist das *long-QT-syndrom* (LQTS; DRICI et al. 1998). Diagnostisches Kriterium ist das verlängerte QT-Intervall im EKG. Dies hängt mit einer verzögerten Repolarisationsdauer der Ventrikel zusammen. Im humanen Myokard liegt ein LQTS vor, wenn die frequenzkorrigierte QT_c -Zeit (nach der BAZET-Formel) größer als 0,46 s ist. Die Verlängerung der QT_c -Zeit ist mit dem plötzlichen Herztod korreliert (PRIORI et al. 2003).

Durch einen Gendefekt im Ionenkanal kann die Repolarisation der Membran nicht physiologisch ablaufen. Führt der Kanalddefekt dabei zu einer verlängerten APD, kann diese im Oberflächen-EKG als verlängertes QT-Intervall erkannt werden. Allgemein konnten Gendefekte, die zu einem LQTS führen, im Na^+ -Kanal (SCN5A) das *long-QT3-syndrom*, den *delayed-rectifier- K^+ -Kanälen* (ether-a-go-go-related gene/HERG; KvLQT1) das *long-QT1-syndrom* und andere mehr identifiziert werden (RODEN et al. 1996).

Der bereits erwähnte *delayed-rectifier-K⁺-Strom* I_{Ks} wird von WANG et al. (1996) mit dem *long-QT1-syndrome* in Zusammenhang gebracht. Das *long-QT1-syndrome* wird hierbei durch den Defekt im KvLQT1-Gen mit Dysfunktion der α -Untereinheit des K⁺-Kanal I_{Ks} verursacht.

Das *long-QT5-syndrome* ist mit dem Gendefekt im KCNE1-Gen assoziiert, das zur Veränderung der β -Untereinheit (minK) des K⁺-Kanal I_{Ks} führt (WANG et al. 1998). Zu einem Krankheitswert beim Menschen führt der Gendefekt auf dem Chromosom 21q22 durch ein verlängertes QT-Intervall wie oben beschrieben, dass häufiger mit ventrikulären Tachykardien (VT) assoziiert ist. Bei der Maus zeigten DRICI et al. (1998) in einem minK-KO-Modell, bei niedrigen Frequenzen, ein verlängertes QT-Intervall. Im Jahr 2007 konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass der KO für minK auch eine signifikant verlängerte APD, EAD und VT im Mausmodell hervorruft (THOMAS et al. 2007).

Der Defekt bzw. Verlust der minK- β -Untereinheit des K⁺-Kanals I_{Ks} ist daher mit dem *long-QT5-syndrome* assoziiert. Hieraus ergibt sich die Fragestellung, ob bei Verlust des T-cap's eine mögliche Interaktion mit der β -Untereinheit minK des K⁺-Kanal I_{Ks} , durch Veränderungen der K⁺-Kanaleigenschaften, wie z.B. mit einer verlängerten APD, eines verlängerten QT-Intervalls, EAD oder VT nachgewiesen werden kann.

1.5. Die Hypertrophiesignale

Die Komplexität der Hypertrophiesignale wird hier exemplarisch beschrieben. Es gibt neurohumorale (extrazelluläre) sowie intrazelluläre Signalwege. Die gemeinsame Endstrecke dieser Signalwege ist die Genexpression im Kardiomyozyten. Die hierdurch erfolgenden Anpassungsvorgänge mit Hypertrophie werden als so genanntes *remodelling* beschrieben.

Ein wichtiger Vermittler der Hypertrophiesignale sind die mytogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Die MAPK mobilisieren nukleäre Transkriptionsfaktoren in den Nukleus, die die Gene cJun, cFos, cMyc, Egr1, Gene für das *atrial natriuretic peptid* (ANP) und für das *brain natriuretic peptid* (BNP) aktivieren können. Die MAPK nehmen damit eine zentrale Position in der Signalkaskade ein, auf welche die verschiedenen intra- sowie extrazellulären Signalwege zulaufen (siehe Abb. 1.7.). Zu den MAPK zählen die intrazellulären Proteinkinasen JNKs, p-38 MAPKs, Akt, ERK1 und 2.

Die extrazellulären Signale werden über die G_q-Protein vermittelte Kaskade zu den MAPK geleitet. Die G_q-Protein vermittelnden Rezeptoren liegen in der Zellmembran, zu denen der α_1 -Adrenalin-, der Endothelin-, und der Angiotensin-II-Rezeptor gehören. Nach Rezeptorbesetzung aktiviert die $\beta\gamma$ -Untereinheit die Phospholipase C (PLC). PLC spaltet das membrangebundene Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃). DAG aktiviert die Proteinkinasen PKC, PKC δ und

PKC ϵ . Die Proteinkinase PKC mobilisiert das kleine G-Protein ras, welches die Aktivierung der MAPK-Kinase-Kinase (MKKKs) ermöglicht. Die MKKKs phosphoryliert die MAPK-Kinasen (MKKs), die folgend die MAPK phosphorylieren (YAMAZAKI et al. 1998; BERS 2001; siehe Abb. 1.7.). Darüber hinaus kann die Hypertrophiesignalkaskade durch die Wachstumsfaktoren beeinflusst werden.

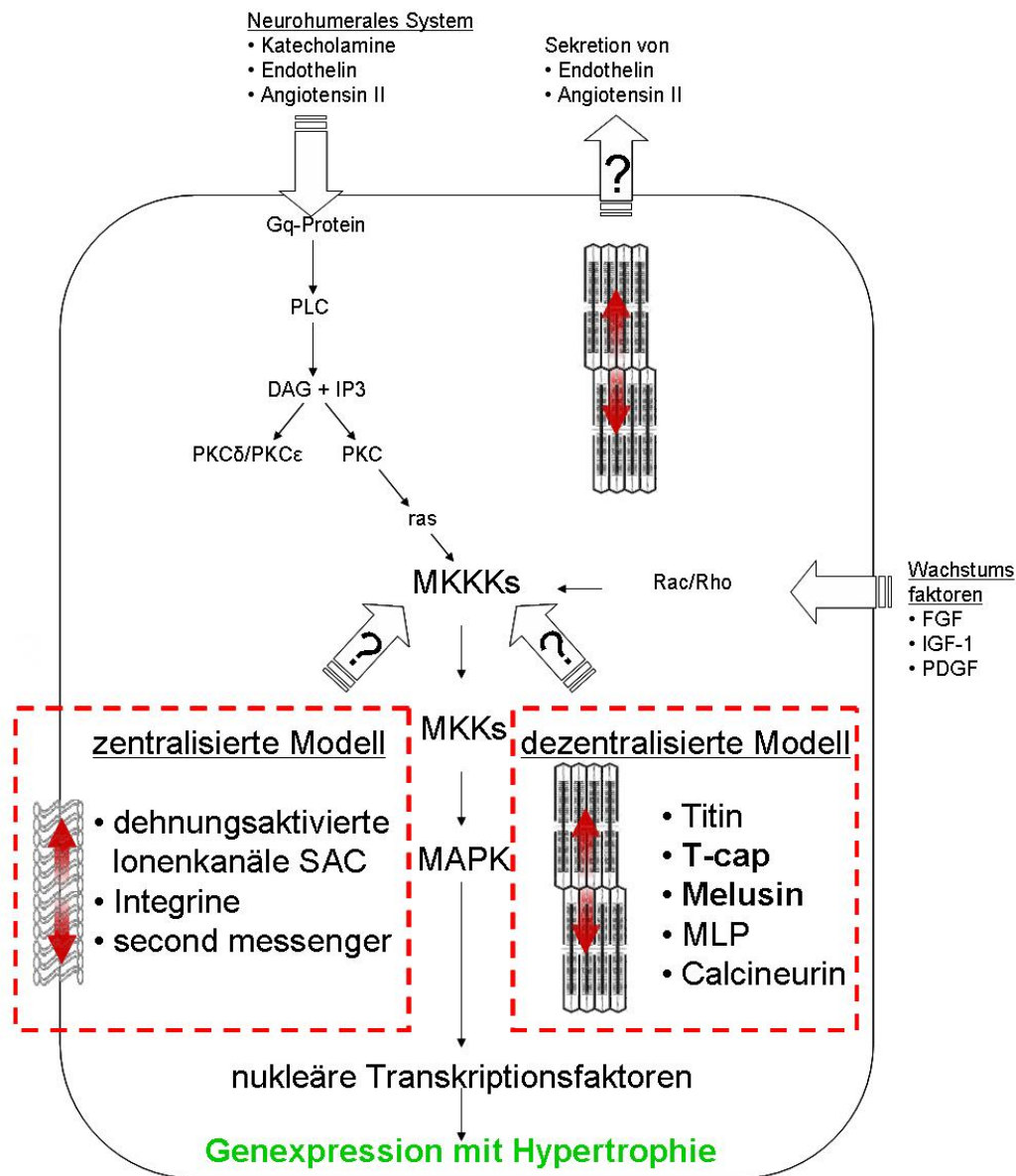


Abb. 1.7. Schematische Darstellung der Hypertrophiesignale im Kardiomyozyten. Es kann in die neurohumoralen (extrazellulären) Transmitter durch Hormone und Wachstumsfaktoren sowie in ein intrazelluläres Modell unterschieden werden. Das intrazelluläre Modell wird durch Dehnungsreize bestimmt, hier wird durch die Lokalisation der beteiligten Komponenten in ein zentralisiertes (Zellmembran-gebundenes) und ein dezentralisiertes (Sarkomer-gebundenes) Modell unterschieden (siehe Text).

1.5.1. Die intrazellulären Hypertrophiesignale: Mechanosensorik

Der erste Nachweis einer Dehnungs-induzierten Hypertrophie gelangen CSAPO et al. (1965) mit Uterusmuskelzellen. Die Existenz einer von neurohumoralen Signalen unabhängigen

Mechanosensorik im Kardiomyozyten wurde durch die Arbeiten von VANDENBURGH und KAUFMAN (1979) sowie KOMURO et al. (1990) postuliert. In deren Experimenten wurden isolierte Myozyten *in vitro* einem mechanischen Stimulus ausgesetzt, auf welchen sie mit Gen-expression und Zellwachstum reagierten. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden auf einer Siliconplatte fixiert und gedehnt. Dabei konnte die Transkription von cFos, einem Hypertrophieindikator, in Abhängigkeit vom Dehnungszustand nachgewiesen werden (KOMURO et al. 1990).

Interessant ist die Frage, wie die Kardiomyozyte einen mechanischen Dehnungsreiz aufnehmen kann und in die Signalkaskade involviert. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch Kardiomyozytendehnung Angiotensin II und Endothelin 1 sekretorisch als Antwort auf den mechanischen Dehnungsreiz abgegeben werden können (SADOSHIMA et al. 1993; YAMAZAKI et al. 1996; siehe Abb. 1.7.). Es ist möglich, dass die Kardiomyozyte mechanische Reize direkt - ohne das neurohumorale System - beantwortet. Die detaillierte Vermittlung der Mechanosensorik bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

Die intrazelluläre Mechanosensorik wird nach der Lokalisation der Komponenten in ein zentralisiertes und ein dezentralisiertes Modell unterteilt (KNÖLL et al. 2003; siehe Abb. 1.7.). Wie eigenständig die intrazellulären Signalwege von den extrazellulären Signalwegen sind und ob sie untereinander kommunizieren, ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine Gemeinsamkeit der neurohumoralen und intrazellulären Signalwege ist die gemeinsame Endstrecke auf der Ebene der Genexpression durch die MAPK.

1.5.1.1. Das zentralisierte Modell der Mechanosensorik

Definiert wird das zentralisierte Modell durch die Membranständigkeit der involvierten Komponenten. Im Kontrast hierzu steht das dezentralisierte Modell mit den vermuteten Mechanosensoren im Inneren der Zelle, nahe der kontraktilen Einheit, welche die mechanische Belastung über das Zytoskelett erfährt.

Im zentralen Modell werden verschiedene Mechanismen subsumiert. Diese sind *stretch-activated-channels* (SACs), die Integrine und die *second messenger*. Erstgenannte wurden von SIGURDSON et al. (1992) beschrieben. Hier wurde eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf einen mechanischen Reiz festgestellt. Der vermehrte Ca^{2+} -Einstrom konnte auf die SACs im Sarkolemm zurückgeführt werden. Weiterhin wurde von SADOSHIMA et al. (1996) ein *second messenger*-Mechanismus durch in hypotoner Lösung geschwollener Kardiomyozyten identifiziert. Bereits nach 5 s Dehnung konnten hierbei Tyrosinkinaseaktivitäten gemessen werden. Angenommen wurde eine Aktivierung durch Zellmembrandehnung mit Konformationsänderung der *second messenger*. Von ROSS und BORG (2001) wurden die Integrine in den Kontext der Mechanosensorik gestellt. Integrine interagieren zwischen der ECM und unmittelbar mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Hierdurch sind Übertragungsprozesse bidirektional möglich. Die

Mechanotransduktion ist ein eingehendes Signal, ein so genanntes *outside-in* Signal, das mit Tyrosinkinaseaktivität beantwortet wird. Der Mediator der Signalkaskade ist die *focal adhesion kinase* (FAK). Diese wandelt den mechanischen Reiz in ein biochemisches Signal in Form von MAPK, PKC und viele andere um (siehe Abb. 1.7.). Neben der Tyrosinkinase FAK sind zahlreiche andere Mediatoren der Integrine bekannt. Als weiterer intrazellulärer Interaktionspartner der β_1 -Integrine konnte 1999 von BRANCACCIO et al. das Protein Melusin identifiziert werden. Inwiefern Melusin in die Hypertrophiesignalkaskade eingreift ist Gegenstand der Forschung.

1.5.1.2. Das dezentralisierte Modell der Mechanosensorik

Zum dezentralisierten Modell werden folgende Proteine nahe der Z-Linie des Sarkomers gezählt: Titin, ein gigantisch großes Makromolekül, das aufgespannt zwischen den Myosinfilamenten und der Z-Linie ist. Dieses steht in Verbindung mit mehr als 20 Liganden und wird daher als Knotenpunkt der Dehnungs- und Stressreize in der Muskelzelle gesehen (LINKE 2008). Melusin, das am *costamer* liegt und über eine Integrinbindungsstelle verfügt. T-cap (Telethonin), das mit dem Aminoende des Titins interagiert. *Muscle-LIM-protein* (MLP), das mit Titin und T-cap einen Makromolekülkomplex darstellt. Calcineurin, das zytoplasmatisch vorliegt und sich bei Ca^{2+} -Konzentrationssteigerung mit Calmodulin verbindet, welches als Mediator der adaptiven Genexpression identifiziert werden konnte. Calsarcin, das mit Calcineurin und den Proteinen der Z-Linie interagiert, scheint ein Transformator zwischen Ca^{2+} -Signalen und den vermuteten Mechanosensorproteinen der Z-Linie zu sein (KNÖLL et al. 2003).

Hervorzuheben sind die Proteine Melusin und T-cap. Melusin ist an den Verbindungsstellen zwischen dem Zytoskelett und Sarkomer lokalisiert. Es interagiert hier mit dem β_1 Integrin der Zellmembran, das als Teil der zentralisierten Mechanosensorik bekannt ist. Somit könnte für Melusin eine Mediatorfunktion eines Dehnungsreizes zwischen Sarkomer und Zytoskelett bestehen. Weiterhin konnte durch die biochemische Beschreibung Melusins, eine Kalzium-abhängige Anpassung des *EC-Coupling* vermutet werden.

T-cap wurde als Komponente eines möglichen Mechanosensor-Komplexes mit MLP und Titin am Sarkomer beschrieben. Es wird angenommen, dass T-cap mit der minK-Untereinheit des K^+ -Stroms I_{Ks} interagieren könnte und somit eine elektrophysiologische Anpassung unter mechanischem Stress hervorrufen könnte.

1.5.2. Hypertrophiemodelle in der Herzforschung

Laut TARNAVSKI et al. (2004) stellen operierte Mausmodelle eine gute Basis zur Untersuchung von menschlichen Herzerkrankungen dar. Die operativen Techniken, eine Aortenkonstriktion (TAC) oder einen Myokardinfarkt (MI) zu erzeugen sind im Verfahren etabliert (ROCKMAN et al. 1991; DU et al. 1998). Die chirurgische Prozedur sieht eine unter

Anästhesie geführte Öffnung des Thoraxes vor. Hierbei wird das Herz dargestellt und die linke Koronararterie beziehungsweise Aorta aufgesucht. Bei der MI-Intervention wird die linke Koronararterie peripher ihres Abgangs von der Aorta unterbunden und damit ein circa 40 %iger Verlust des linksventrikulären Myokards erzeugt. Der MI ist ein akutes Pumpversagen durch eine systolische Ventrikelfunktionsstörung. Zur TAC-Intervention wird die Aorta ascendens mit einer Ligatur umschlossen und das Lumen verengt. Im TAC-Modell entsteht eine Druckbelastung durch Erhöhung der Nachlast, wie zum Beispiel bei der Hypertonie und der Aortenklappenstenose. Dies führt über die erhöhte Wandspannung ebenfalls zur systolischen Ventrikelfunktionsstörung. Über die Hypertrophiesignale kommt es zu Anpassungsvorgängen des Myokards. Wird das kritische Herzgewicht überschritten dilatieren die Ventrikel. Endzustand ist eine DCM mit Herzinsuffizienz-Phänotyp.

Das kontinuierliche Training der Maus ist ein anerkanntes Verfahren für das physiologische Hypertrophiemodell (EVANGELISTA et al. 2003; DE BONO et al. 2006). Durch das körperliche Training wird eine gutartige Anpassung, durch Hypertrophie, Volumenzunahme, niedrigere Ruhfrequenz sowie höhere submaximale Leistungsfrequenz erreicht.

1.6. Melusin und T-cap im Kontext der Mechanosensorik

Melusin und T-cap sind als Bestandteile der dezentralisierten Mechanosensorik hypothesiert worden. Die funktionelle Beschreibung könnte Melusin und T-cap in einen Mechanosensorprozess einordnen.

1.6.1. Melusin

Die Arbeitsgruppe um BRANCACCIO entdeckte 1999, auf der Suche nach Interaktionspartnern vom β_1 -Integrin, das spezifisch im Skelett- und Herzmuskel vorkommende Protein Melusin. Das entsprechende Gen konnte auf dem X-Chromosom (Xq12.1-13 im humanen beziehungsweise XbandD im murinen Genom) lokalisiert werden. Das Translationsprodukt ist ein 38 kDa schweres Protein. Humanes Melusin besteht aus einer 347 As langen Kette und bei der Maus aus 350 As. Die Übereinstimmung der As-Sequenz der unterschiedlichen Spezies liegt bei 92 % (BRANCACCIO et al. 1999).

Am Carboxylende des Melusins ist die spezifische Interaktionsstelle der Integrine. *Yeast-2-Hybrid* Analysen wiesen darauf hin, dass Melusin spezifisch mit der zytoplasmatischen Seite von β_1 -Integrin interagieren kann (vor allem mit den Isoformen β_1A ; β_1B ; β_1D). Nahe des C-terminalen Endes besitzt Melusin eine Aspartat- und Glutamat-reiche Region, welche dem Carboxylende von Calsequestrin, einem Kalzium-speichernden Protein des SR's, stark ähnelt. Interessanterweise interagiert die C-terminale Seite des fragmentierten Melusins nur unter Ca^{2+} -Einfluss mit dem β_1 -Integrin, das vollständige Protein

nur bei Kalzium-freier Lösung. Dies weist auf eine Beeinflussbarkeit durch sich verändernde Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol hin, das eine Kalzium-abhängige Funktion des Melusins vermuten lässt (BRANCACCIO et al. 1999). Zum Aminoende hin liegen zwei Cystein- und Histidin-reiche Regionen, sogenannte CHORD-Domäne (*cystein and histidin rich domain*; BRANCACCIO et al. 2003a).

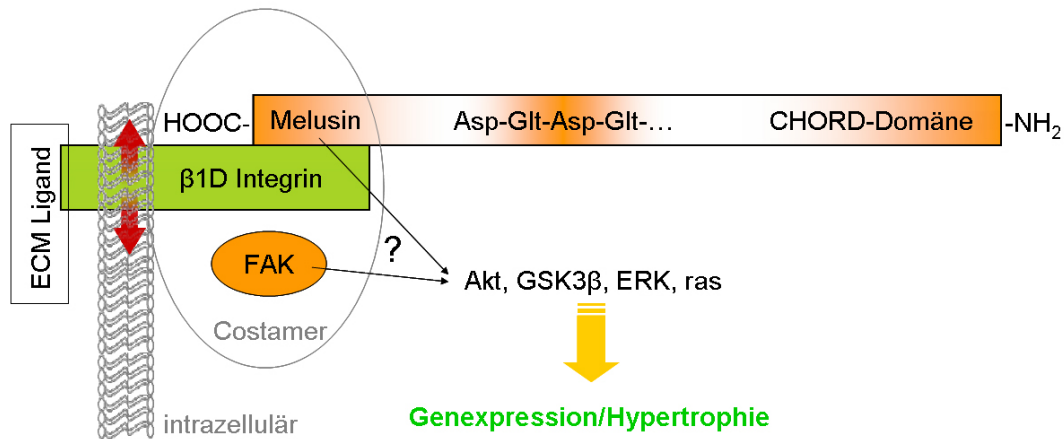


Abb. 1.8.

Schematische Darstellung des Integrin-Melusin-Komplexes. In der Zellmembran ist das $\beta_1\text{D}$ -Integrin aufgezeigt, das in der *costamer*-Region mit der Z-Linie der Sarkomere interagiert. Hierbei ist das Integrin unter anderem mit FAK und Melusin assoziiert. Die Melusinstruktur mit den bisher erkannten Regionen im Molekül ist angedeutet. Am C-terminalen Ende, das mit dem Integrin interagiert, schließt sich die Aspartat- und Glutamat-reiche Region an. Am Aminoende liegt die CHORD-Domäne (BRANCACCIO et al. 2003a).

Die Signalkaskade zur Hypertrophie könnte an diesem Knotenpunkt eingeleitet werden. Es könnte am Integrin-Melusin-Komplex ein Dehnungsreiz von der Zellmembran und/oder den Liganden der ECM aufgenommen und in ein biochemisches Signal umgewandelt werden. Die Proteinkinasen Akt, GSK3 β , ERK und ras könnten dabei in die bisher unvollständig gebliebene Signalkaskade involviert sein.

Im Zytoskelett der Kardiomyozyte liegt Melusin in der Z-Linie der Sarkomere in unmittelbarer Nähe zum *costamer*. Das *costamer* ist ein Strukturkomplex aus Integrin, Vinculin, Talin, FAK, der an den Verbindungspunkten zwischen Zytoskelett und Zellmembran liegt (siehe Abb. 1.8.). Melusin ist hier zwischen dem Integrin und dem Zytoskelett eingelagert. Integrine sind transmembranäre Rezeptoren zur ECM. Sie übermitteln unter anderem einen mechanischen Reiz in ein biochemisches Signal, das intrazellulär weitergegeben werden kann (BARKI-HARRINGTON und ROCKMAN 2003).

Der Melusin-KO zeigt unter physiologischen Bedingungen keine funktionellen, strukturellen Veränderungen noch eine unveränderte Überlebenszeit. Unter Druckbelastung des Melusin-KO zeigte sich die Phosphorylierung der Proteinkinasen Akt und GSK3 β vermindert. Es wird daher vermutet, dass der Integrin-Melusin-Komplex in die Hypertrophiekaskade Akt/GSK3 β bei Druckbelastung involviert ist (BRANCACCIO et al. 2003b; DE ACETIS et al. 2005; DONKER et al. 2007). Darüber hinaus konnte durch den Melusinverlust im druckbelasteten Modell (TAC) eine vorzeitige exzentrische Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels und ein vorzeitiger letaler Ausgang nachgewiesen werden (siehe Abb. 1.9.). Die Eigenständigkeit eines - nur unter Druckbelastung durch Melusin vermittelten Signals - konnte durch einem neurohumoralen Stimulationstest mit Angiotensin II und Norepinephrin

belegt werden. Der Melusin-KO sowie die WT-Kontrolle zeigten beide ein identisches hypertrophes *remodelling*, jedoch blieben die durch Melusin vermittelten Proteinkinasen GSK3 β und Akt unverändert (vermindert phosphoryliert) im Melusin-KO. Melusin scheint daher spezifisch unter Druckbelastung in die Signalverarbeitung der Hypertrophiekaskade einzugreifen (HARADA et al. 1999; BRANCACCIO et al. 2003b; BRANCACCIO et al. 2006).

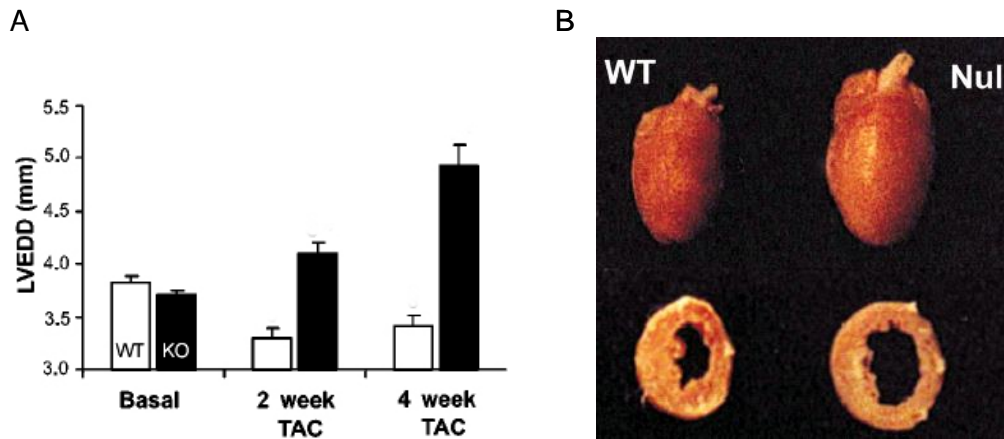


Abb. 1.9. A/B

(A) Dargestellt sind die echokardiographischen Messungen des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD in mm) als Maß für die Dilatation, unter basal, nach zwei und vier Wochen TAC-Intervention der Melusin-KO-Maus.

(B) Makroskopische Darstellung der Herzen (oben) und des linken Ventrikels im Querschnitt (unten) im Melusin-KO rechts und der WT-Kontrolle links.

(Nach BRANCACCIO et al. 2003b, Seite 71. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autorin.)

In einer Melusin überexprimierenden Maus (Melusin-TG) konnte gezeigt werden, dass unter physiologischer Belastung eine leichte Hypertrophie induziert wird, jedoch bei hämodynamisch relevanter Druckbelastung durch TAC, eine verstärkte Hypertrophie im Melusin-TG nachweisbar ist. Dies zeigte sich durch ein verlängertes Intervall konzentrischer Hypertrophie mit verzögerter Dilatation des linken Ventrikels. Darüber hinaus sind im Melusin-TG-Tier keine vermehrten Apoptosemarker wie TUNEL-positive Zellen oder Fibrosemarker wie das profibrotische Zytokin *transforming growth factor* (TGF β_1) nachweisbar (DE ACETIS et al. 2005; BRANCACCIO et al. 2006). Erhöhte Phosphorylierungsgrade der Proteinkinasen GSK3 β , Akt und ERK1/2 im druckbelasteten Melusin-TG-Modell bestätigten die Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeiten der Melusin-KO-Maus.

Daher wird vermutet, dass Melusin die konzentrische Hypertrophie im kompensierten Zustand unter Druckbelastung entscheidend beeinflusst. Dabei werden die Signalkaskaden über GSK3 β , Akt und ERK1/2 genutzt. Weiterhin scheint Melusin einen positiven Einfluss auf das kardiale *remodelling* durch Fibrose und Apoptose zu besitzen. Inwiefern Melusin ein protektiver Faktor der kardialen Funktion ist, bleibt allerdings unklar (TARONE und LEMBO 2003).

1.6.2. T-cap (Telethonin)

T-cap ist mit 19 kDa ein eher kleines Protein, und es gibt keine zu dieser Proteinstruktur bekannte Homologe. Die Lokalisation von T-cap ist die Angrenzungsstelle der Sarkomere in der Z-Linie. Hierbei ist es mit dem Aminoende von Titin verbunden. Titin überspannt das halbe Sarkomer und hat in der Z-Linie Bindungsstellen zu α -Aktin. T-cap erhält seinen Namen durch sein Aufsitzen am Ende von Titin (GREGORIO et al. 1998). Durch Mutationstudien konnte das T-cap Gen in den Zusammenhang mit der Pathogenese der Schultergürteldystrophie Typ 2G (MOREIRA et al. 2000) und der DCM (KNÖLL et al. 2002; HAYASHI et al. 2004) gebracht werden.

Zu den Interaktionspartnern der Z-Linienregion zählen das *muscle-LIM-protein* (MLP) und Calsarcin (FREY und OLSON 2002). Die MLP-Mutation (W4R) führt zur DCM, da hier die T-cap/MLP Interaktion verloren geht (HAYASHI et al. 2004). Weiterhin ist eine DCM verursachende MLP-Mutation mit gestörter T-cap/ α -Aktinin2 Interaktion beschrieben. Dies weist auf eine Beteiligung der Komponenten T-cap, MLP, Calsarcin und α -Aktinin2 an einem Sensor hin, der einen mechanischen Reiz im Bereich der Z-Linie aufnehmen könnte. Vermutet wird ein unabhängig arbeitender intrazellulärer Dehnungsrezeptor.

Als Interaktionspartnern von T-cap wird die Verbindung zum K^+ -Kanal I_{Ks} über dessen Untereinheit minK vermutet (FURUKAWA et al. 2001). Hiermit könnte ein Mechanosensor des dezentralisierten Modells vorliegen, der über die kontraktilen Elemente zur unmittelbaren Beeinflussung der Ionenströme und damit dem AP führen könnte. Die genauen Signalwege der intrazellulären Mechanosensorik, welche die Z-Linien Proteine involviert und die Hypertrophie einleiten sind noch nicht geklärt (KNÖLL et al. 2003).

1.7. Fragestellungen der Arbeit

Allgemein sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften von T-cap-KO und dem hämodynamisch belasteten Melusin-TG-Tieren hinsichtlich der elektromechanischen Kopplung und der AP untersucht werden. Die untersuchten Proteine T-cap und Melusin sind wahrscheinlich in die Mechanosensorik des Kardiomyozyten involviert. T-cap durch die vielseitige Interaktion mit den Proteinen der Z-Linie (KNÖLL et al. 2003) und wohl möglich dem K^+ -Kanal I_{Ks} (FURUKAWA et al. 2001). Melusin über eine direkte Verbindung zu den Signalträgern der Zellmembran, den Integrinen (BRANCACCIO et al. 2006). Dies scheint beide Komponenten zunehmend in den Kontext eines intrazellulären Mechanosensors zu rücken.

Stehen die beiden Proteine im Zentrum der Transformation eines mechanischen Dehnungsreizes in ein biochemisches Signal? Können die untersuchten Proteine somit Einfluss auf

elektrophysiologische Prozesse, wie das AP und die elektromechanische Kopplung nehmen? Hierdurch ließe sich ein Schritt der Hypertrophiesignale im Kardiomyozyten erklären.

1.7.1. Fragestellung zu den elektrophysiologischen Änderungen im T-cap-KO-Modell

1.) Kann im AP des T-cap-KO's eine verlängerte Repolarisationsdauer aufgrund eines veränderten K⁺-Stroms I_{Ks} dargestellt werden, wenn T-cap als vermuteter Interaktionspartner des K⁺-Kanals I_{Ks} ausgeschaltet ist (FURUKAWA et al. 2001; KNÖLL et al. 2003)?

2.) Ist die vermutete Verlängerung der Repolarisationsdauer im Oberflächen-EKG mithilfe der QT_c-Zeit nachweisbar und können arrhythmische Phänomene ausgemacht werden? Kann der T-cap-Verlust hierdurch den *long-QT-syndrome* zugeordnet werden?

3.) Wie stellt sich das *EC-Coupling* durch den Verlust von T-cap dar, und kann eine Modulation des *EC-Coupling* die Hypothese von T-cap als Komponente eines intrazellulären Mechanosensor konstatieren?

1.7.2. Fragestellung zu den drei hämodynamisch belasteten Melusin-TG-Modellen

1.) Welche Änderungen zeigen die drei Interventionsmodelle der hämodynamischen Belastung (TAC/ MI/ Swim)? Das heißt: weisen die Anpassungsvorgänge der Ca²⁺-Homöostase auf eine Hypertrophie oder auf eine Herzinsuffizienz hin?

2.) Wird der postulierte protektive Melusineffekt einer gutartigen (adaptiven) Hypertrophie, mit verzögertem Übergang zur Herzinsuffizienz in der druckbelasteten TAC-Intervention (DE ACETIS et al. 2005; BRANCACCIO et al. 2006) durch die Anpassungsvorgänge im *EC-Coupling* unterstützt? Das heißt: können verbesserte kontraktile Eigenschaften wie erhöhte Kontraktilität, verstärkte Ca²⁺-Amplitude und schnellere Relaxationszeiten im Melusin-TG-Modell nachgewiesen?

3.) Kann der postulierte Melusineffekt einer gutartigen (adaptiven) Hypertrophie mit verzögertem Übergang zur Herzinsuffizienz auf das hämodynamisch belastete MI-Modell und die trainierten Tiere übertragen werden?

2. Material und Methoden

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Methoden dienen der elektrophysiologischen Beschreibung von Kardiomyozyten. Zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften wurden die Kardiomyozyten isoliert, damit konnte eine Untersuchung auf Einzelzellebene erfolgen. Nach der Isolation wurden die Methoden der *patch-clamp*-Technik und der Fluoreszenzmikroskopie angewandt, welche eine detaillierte Aussage über AP-Eigenschaften und das *EC-Coupling* ermöglichen. Zuvor wurde vom T-cap-KO-Tier vor der Isolation ein EKG angefertigt, um die Erregungseigenschaften *in vivo* darzustellen.

Die hier aufgeführten Tierexperimente entsprechen den Tierschutzbestimmungen der örtlichen Behörde (Tierversuchsanzeige vom 19. Mai 2006 zur „Durchführung von Eingriffen an lebenden Tieren“ Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 Tierschutzgesetz, Aktenzeichen: 33.42502/§9-029/06, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/ Oldenburg, Anzeigender Dr. Bernhard Unsöld) und wurden unter Einhaltung der Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH Publikationsnummer 85-23, 1996 überarbeitet) angefertigt.

Die Melusin-TG-Maus entstand auf dem Hintergrund der C57BL6 Tierreihe aus der Arbeitsgruppe von G. Tarone (BRANCACCIO et al. 2003b). Die Untersuchung der Melusin-TG-Tiere erfolgte im Alter von 9 bis 10 Wochen, jeweils 2 Wochen nach Intervention (TAC, MI), beziehungsweise nach 4 Wochen Schwimmtraining (Swim). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die weibliche Melusin-TG-Maus. Im Rahmen des EUGeneHeart Projektes, zur Erarbeitung der Mechanismen, welche der Entstehung der Herzmuskelschwäche zugrunde liegen, wurden die männlichen Tiere in einer weiteren Arbeitsgruppe untersucht.

Das T-cap-KO-Modell entstand auf dem Hintergrund der Black Swiss Tierreihe von K. R. Chien aus der Arbeitsgruppe R. Knöll (KNÖLL et al. 2002; KNÖLL et al. 2003). Die Tiere wurden in einem Alter von 26 bis 40 Wochen verwendet.

2.1. Das Elektrokardiogramm

2.1.1. Allgemeine Darstellung der Elektrokardiographie

Das EKG ist eine graphische Darstellung der Herzaktion. Dieser Aufzeichnung liegen verschiedene elektrische Potentialdifferenzen während der Erregungsausbreitung am Myokard zu Grunde. 1842 wurden elektrische Phänomene der Herzaktion postuliert. Die Erstbeschreibung mittels EKG erfolgte 1906 durch Willem EINTHOVEN, der die bis heute gebräuchliche Beschreibung der Auslenkungen des EKG's prägte (EINTHOVEN 1906). Das konventionelle EKG, auch Oberflächen-EKG genannt, hat zwölf Ableitungen: sechs Extremitätenableitungen nach EINTHOVEN und GOLDBERGER und sechs Brustwandablei-

tungen nach WILSON (präkordiale Ableitungen). Die Elektroden nehmen das auf die Körperoberfläche übertragene elektrische Potential des Herzmuskels als bipolares Signal, also zwischen zwei Elektroden (Ableitungen I; II; III nach EINTHOVEN) oder unipolar zu einer Referenzelektrode (Ableitungen aVR, aVL, aVF nach GOLDBERGER und V_1 bis V_6 nach WILSON), auf.

Die PQ-Strecke ist die Überleitungszeit vom Vorhof auf die Herzkammern. Der Verlauf der ST-Strecke kann ischämische Ereignisse am Myokard nachweisen. Das QT-Intervall beurteilt die Erregungsrückbildung. Ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Erregungsrückbildung ist die APD. Die Berechnung der frequenzkorrigierten QT_c -Zeit erlaubt die Beurteilung von verlängerten Repolarisationszeiten.

2.1.2. Das murine Elektrokardiogramm

Das Oberflächen-EKG ist eine aussagekräftige Untersuchungsmethode, um Abberationen der elektrischen Signale genveränderter Mäuse zu erkennen (MITCHELL et al. 1998; BERUL 2003). Die EKG-Aufzeichnung erfolgte am narkotisierten Tier. Alle Vorgänge am lebenden Individuum wurden unter Anleitung durch einen approbierten Arzt durchgeführt. Am vorbereiteten Arbeitsplatz wurde das Narkosetup bereitgestellt, welches sich wie folgt zusammensetzt: Ein Mikroventilator (MiniVent[®] Typ 845), der auf eine Atemfrequenz von 350 min^{-1} und ein Atemzugvolumen von $250 \mu\text{l}$ eingestellt wurde. Weiterhin wurde der Sauerstoffzufluss ($100 \% \text{O}_2$) an den Narkosegasverdampfer (Dräger[®] Isofluranverdampfer 19.3) angeschlossen und ein initialer Isofluranpegel (Forene[®]) von 4 Vol% festgelegt. Der Abluftschlauch des Nichtrückatemsystems wurde unter den Abzug gebracht. Neben der selbst modellierten Inhalationsmaske zur Beatmung wurde noch kleine Streifen von selbstklebenden Fixationsmaterial (LeukoSilk[®]) benötigt. Das EKG-Gerät (Schiller[®] Typ CS-6/12/RS) wurde mit einer Vorlaufgeschwindigkeit von $100 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ und einer Amplitudenverstärkung von $40 \text{ mm} \cdot \text{mV}^{-1}$ aufnahmebereit positioniert. Das Aufzeichnungsintervall wurde manuell gewählt und Artefakte automatisch gefiltert.

Das Versuchstier wurde durch eine spezielle Haltungstechnik zwischen Zeigefinger und Daumen der linken Hand am Genick gepackt und das proximale Schwanzende in den maximal flexierten Ring- und Kleinfinger derselben Hand sicher gehalten. Es erfolgte durch Überstülpen der Atemmaske eine luftdichte Anbringung auf die Schnauze. Die erforderliche Narkosetiefe wurde durch aufmerksame Beobachtung der Körperreaktionen ermittelt, wobei vor allem auf Bewegungslosigkeit und Schnappatmung geachtet wurde. Der Sedierungszustand wurde nach circa 2 min erreicht und es konnte mit der Fixierung des Versuchstieres in Rückenlage, mit den bereitgelegten LeukoSilk[®]-Pflaster, auf einer ebenen Unterlage fortgefahren werden. Die vorher mit 2 % Xylocain-Gel (Astra Zeneca[®]/ Lidocain) präparierten Nadelelektroden wurden unter vorsichtigem Vorschub, intrakutan in die Extremitäten

eingeführt. Vor der EKG-Aufzeichnung wurde das Narkosegas unter Beobachtung der Narkosetiefe auf 1,5 bis 2 Vol% Isofluran reduziert, um eine Überdosierung zu vermeiden.

Die Elektroden wurden nach der bekannten Reihenfolge angebracht, so dass die Potentiale wie folgt abgenommen wurden: aVL linker Vorderlauf; aVR rechter Vorderlauf; aVF linker Hinterlauf; Erdung rechter Hinterlauf (GOLDBERGER-Ableitung) und die Ableitungen I zwischen linkem Vorderlauf und rechtem Vorderlauf; Ableitung II zwischen linkem Hinterlauf und rechtem Vorderlauf; Ableitung III zwischen linkem Hinterlauf und linkem Vorderlauf (EINTHOVEN-Ableitung).

Die EKG-Aufzeichnung konnte gestartet werden, wenn im Display des Geräts eine artefaktfreie Potentialänderung zu erkennen war. Es wurde für 10 s mit $100 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ zur besseren Intervallauswertung - und zusätzlich mit einer Vorlaufgeschwindigkeit von $10 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ für 25 s - zur besseren Übersicht des Rhythmus im Verlauf - aufgezeichnet.

Der EKG-Ausdruck wurde manuell nach der Dauer der P-Welle, dem QRS-Komplex und den Intervallen PQ und ST ausgewertet. Die EKG-Parameter wurden aus dem Mittel von 10 abgelesenen Kontraktionen bestimmt. Die frequenzkorrigierte QT_c -Zeit nach der BAZET-Formel wurde durch die von MITCHELL et al (1998) für die Maus etablierte Formel bestimmt. Die Formel berücksichtigt die in diesem Tier höhere Herzfrequenz.

$$QT_c [s] = \frac{QT}{\sqrt{\frac{RR}{100}}} \quad \text{Formel 2.1.}$$

Zur Auswertung der Zeitintervalle wurden die Veröffentlichungen von KORTE et al. (2002) und MC LERIE et al. (2003) zu Hilfe genommen.

2.2. Myozytenisolation

Die Myozytenisolation dient der Gewinnung von Einzelzellen aus dem Myokard der Maus. Das Herz wird freipräpariert und aus dem Situs entnommen. Anschließend wird mit der LANGENDORFF-Perfusion das extrahierte Herz über die Aorta retrograd perfundiert. Die dabei durch die Koronargefäße fließende Verdauungslösung enthält Enzyme zur Dissoziation der ECM zur Auftrennung des Zellverbands. Anschließend wurden die Ventrikel von den Vorhöfen dissoziiert und nun als Einzelzellen der weiteren Messung zur Verfügung gestellt.

2.2.1. Entnahme des Herzens

Die Myozytenisolation wurde an das AFCS-Procedur-Protokoll (O'CONNELL und NI 2002) adaptiert und in das bereits etablierte Setup unserer Arbeitsgruppe (MAIER et al. 2003) integriert.

Am vorbereiteten Arbeitsplatz wurde die Maus in einer luftdichten Inhalationskammer mit 800 µl Isofluran (Forene®) narkotisiert. Die Reaktionslosigkeit und das Einsetzen der Schnappatmung zeigten eine ausreichende Narkosetiefe zur atlantoaxialen Dislokation an. Zur Extraktion des murinen Herzens wurde die Maus an den Extremitäten auf einer stabilen Styroporunterlage in Rückenlage fixiert. Mit der anatomischen Pinzette wurde das Abdomen am *Umbilicus* angehoben. Durch zwei Scherenschnitte, die nach lateral zur Medio-klavikularlinie am *Arcus costae* führten, wurde der Präparationsweg zum Thorax freigelegt. Anschließend konnte die Eröffnung der Pleurahöhle und des Mediastinums über eine ventrale Schnittführung entlang des *Diaphragma phrenicum*s erreicht werden. Unter anhaltenden kranialen Pinzettenzug der zuvor abgetrennten Bauchwand konnte unter medioaxillärer Schnittführung der ventrale Brustkorb abgehoben werden. Das Mediastinum mit Herz-Gefäßband konnte jetzt frei eingesehen werden. Nach Abpräparieren von Lunge und Thymusfettkörper vom Herz konnte die intrakardiale Injektion von 50 IE Heparin (Liquemin®) erfolgen. Das applizierte Heparin diente der Prophylaxe von thrombotischem Material in den kardialen Höhlen und Koronarien. Die endgültige Extraktion des Herzens wurde durch ein Absetzen an den großen Gefäßen erreicht.

Das entnommene Herz wurde unter dem Binokular auf eine stumpfe 18 G Kanüle aufgezogen und eine Perfusion der Koronarien - retrograd über den Aortenstumpf - eingeleitet. Die Verifikation der erfolgreichen Kanülierung mit intraaortaler und nicht intrakardialer Lage, konnte anhand des Auswaschens von Erythrozyten aus den Koronargefäßen erkannt werden. Das Ventrikelmyokard blasste weißlich aus. Nach vorsichtiger Fixierung mit einem 3.0 Prolene Faden (Mersilene EH6483) und einer Bulldog Klemme (Fine Science Tools) auf der Kanüle, konnte das Präparat an die LANGENDORFF-Anlage angeschlossen werden. Die Kanülierung wurde zur Verlängerung der Ischämiezeit in gekühlter Isolationstyrode vorgenommen.

2.2.2. Die LANGENDORFF-Perfusion zur Gewinnung einzelner Myozyten

Mit der 1895 etablierten retrograden Perfusion nach LANGENDORFF wurde die Messung am schlagenden Herzen möglich. Der Perfusionsvorgang wurde an die Myozytenisolation adaptiert. Bei 37°C wird mit konstanter Flussgeschwindigkeit eine definierte Menge Enzymlösung in das Myokard verabreicht.

Die LANGENDORFF-Perfusionsanlage wurde initial mit destilliertem Wasser und anschließend mit Isolationstyrode gespült. Das kanülierte Herz wurde unter gleichmäßigem *flow* von 3 ml*min⁻¹ vorerst für 4 min über die Koronararterien mit Isolationstyrode ausgewaschen, um einen optimalen Durchfluss der Enzymlösung zu gewährleisten. Die *Liberase Blendzyme 1* und Trypsin beinhaltende Enzymlösung diente der Aufspaltung interzellulärer Verbindungen in der ECM. Der enzymatische Verdau wurde bis zu einem typischen Konsistenz- und Farbwechsel des myokardialen Gewebes fortgeführt! Am Ende

des Verdau nahm das Herz eine tropfenartig hängende Form mit milchglasiger Oberfläche an. Anschließend konnte das Herz von der Anlage abgenommen werden und mit einem Schnitt unterhalb des Sulcus coronaris von der Kanüle abgetrennt werden. Dabei erfolgte gleichzeitig eine Abtrennung der Atrien. Das gewonnene ventrikuläre Myokard wurde in einem Becherglas mit Stopplösung aufgefangen und einer weiteren mechanischen Zerkleinerung zugeführt. Das erhaltene Zellgemisch wurde vorsichtig durch ein Nylongaze (Porengröße 200 μm) in ein Falconröhrchen überführt und von den groben Geweberesten abgesondert.

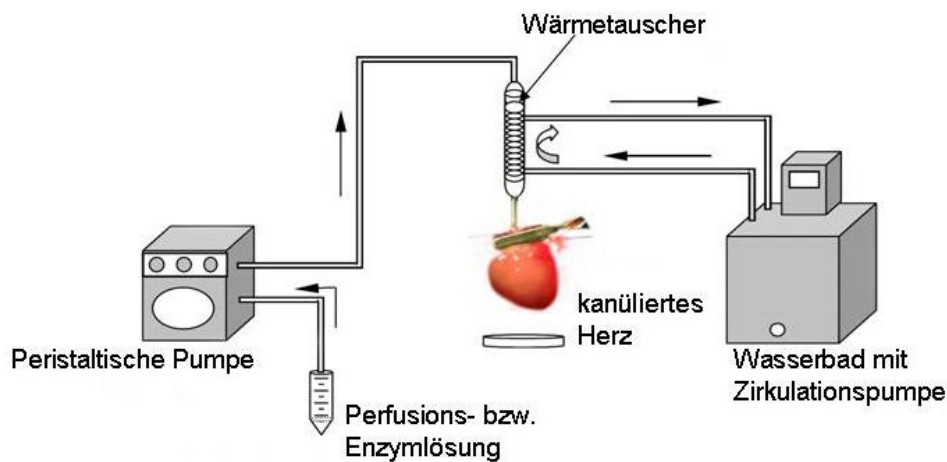


Abb. 2.1.

Schematische Darstellung der LANGENDORFF-Perfusionsanlage. Auf der linken Bildseite ist das offene System zur Perfusion und Verdau des Herzens dargestellt. In der Bildmitte ist das kanülierte Herz an die Anlage angeschlossen. Rechts im Bild steht das Wasserbad mit dem geschlossenen Kreislauf zur Erwärmung der perfundierten Lösungen auf 37°C. (Nach O'CONNELL und NI 2002 modifizierte Abb., Seite 12)

Abschließend konnte nach circa fünfminütiger Sedimentation der Ca^{2+} -Aufbau eingeleitet werden. Durch die langsame sukzessive Sedimentation in den aufsteigenden Ca^{2+} -Lösungen von 125 μM , 250 μM zu 500 μM Ca^{2+} -Ionen konnten die Einzelzellen nach dem Verdau vorsichtig wieder an die für die Experimente notwendige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gewöhnt werden (so genannter Ca^{2+} -Aufbau). Dieser allmähliche Ca^{2+} -Aufbau der Kardiomyozyten verhinderte den Tod der Zellen durch den abrupten Übergang von der Kalzium-armen Enzymlösung zur Messlösung. Die Zellen sind, anders als im Falle des schlagartigen Ca^{2+} -Entzugs, gegenüber dem Anstieg der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sensibel, dabei handelt es sich um das so genannte Ca^{2+} -Paradoxon (ZIMMERMAN und HÜLSMANN 1966). Die Zellausbeute wurde durch optische Kontrolle vor dem Messen erfasst und lag im Bereich von 70-80 % vitaler Zellen.

2.2.3. Verwendete Lösungen zur Isolation

Die verwendeten Lösungen wurden innerhalb einer Woche verbraucht und vor jeder Isolation auf Verunreinigung kontrolliert, um eine möglichst optimale Voraussetzung für qualitativ hochwertige Zellen zu erhalten. Die genannten Lösungen wurden bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,46 mit NaOH justiert.

Tab.
2.1.**Isolationstyrode**

ohne Kalzium

Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
NaCl	113 mM	Fluka 71378
KCl	4,7 mM	Merck 1.04933.0500
KH ₂ PO ₄	0,6 mM	Sigma P-5379
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6 mM	Merck 6580
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mM	Fluka 63140
Phenol-Rot	0,032 mM	Sigma P-5530
NaHCO ₃	12 mM	Sigma S-5761
KHCO ₃	10 mM	Sigma P-9144
HEPES	10 mM	Sigma H-4034
Taurine	30 mM	Sigma T-0625
Glucose	5,5 mM	Roth X9970.2
Butanedionmonoxim (BDM)	500 mM	Sigma B-0753

gelöst in Aqua dest.; bei 37°C auf pH=7,46 mit NaOH justiert

Tab.
2.2.**Enzymlösung**

Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Liberase Blendzyme 1	7,5 mg/ml	Roche 1988417
Trypsin 2,5 % (10-fach)	0,6 %	Invitrogen 15090046
CaCl ₂	0,0125 mM	Fluka 21115

gelöst in Isolationstyrode; bei 37°C auf pH=7,46 mit NaOH justiert

Tab.
2.3.**Stopplösung**

Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Kälberserum (BCS)	10 %	Sigma 12133C
CaCl ₂	0,0125 mM	Fluka 21115

gelöst in Isolationstyrode; bei RT auf pH=7,46 mit NaOH justiert

Tab.
2.4.

Kalziumaufbau		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
1. Kälberserum (BCS)	5 %	Sigma 12133C
CaCl ₂	0,125 mM	Fluka 21115
2. Kälberserum (BCS)	5 %	Sigma 12133C
CaCl ₂	0,25 mM	Fluka 21115
3. Kälberserum (BCS)	5 %	Sigma 12133C
CaCl ₂	0,5 mM	Fluka 21115

gelöst in Isolationstyrode; bei RT auf pH=7,46 mit NaOH justiert

2.3. Die *patch-clamp*-Technik

Die *patch-clamp*-Technik dient der Untersuchung von Membranpotentialen und Ionenströmen. Mit dem isolierten Aufsetzen einer Elektrode auf die Zellmembran und dem Abdichten dieser Verbindung wird die Messung der vorliegenden Ionenströme oder auch die Summe dieser Ionenströme, das AP, ermöglicht.

Wegbereiter dieser Analyseverfahren sind Erwin Neher und Bert Sakmann, die das Vorgehen mit dieser Technik erstmals beschrieben (NEHER und SAKMANN 1976). Die zwei wesentlichen Neuerungen waren das Modulieren einer minimalen *patch*-Pipette mit einer Öffnung von wenigen Mikro- bis Nanometern (0,5 bis 1 µm) und das Unterdrücken des Hintergrundrauschens der elektrischen Apparaturen, durch das Erstellen eines *gigaseal*. Das heißt durch eine Abdichtung des elektrischen Kontakts im Bereich eines Widerstandes von mehreren Gigaohm. Erst durch diesen Vorgang ist die Voraussetzung geschaffen, die minimalen Ströme der Zellen im Picoamperebereich (1 pA= 10⁻¹² A) zu messen.

2.3.1. Allgemeiner Überblick der Anlage

In einem Faraday'schen Käfig (2) ist zur Abschirmung von elektrischen und elektromagnetischen Störsignalen die Feinelektronik (3; 5) positioniert. Auf einem schwingungsgedämpften Tisch (1) ist das inverse Mikroskop (3) - gegen Erschütterungen aus der Umgebung geschützt - aufgebracht. Auf dem Objektisch (6) des Mikroskops sind Halterungen für die Versuchskammern eingelassen. Auf dem Objektisch sind Mikromanipulator (4) mit Pipettenhalter und *patch-clamp*-Vorverstärker (5) installiert. Die Messelektrode liegt in der *patch*-Pipette am Pipettenhalter (siehe Abb. 2.2.).

Die Erfassung der elektrophysiologischen Charakteristika der ganzen Zelle kann nach der Membranruptur beginnen (*whole cell*-Konfiguration). Die Datenakquisition erfolgt am Vorverstärker (5), von dem das Signal zum Hauptverstärker (8) übermittelt wird. Der Vorverstärker

ist der Kontaktvermittler zwischen der, die Zellmembran touchierende Messelektrode und der zur Weiterverarbeitung dienenden Medien.

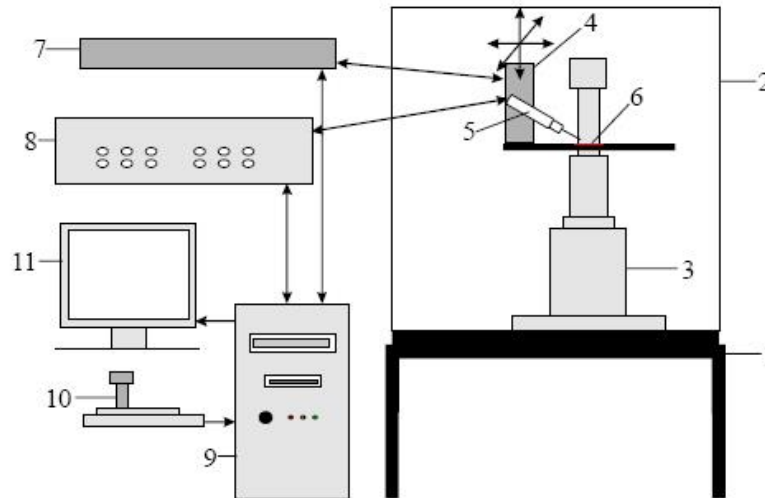


Abb. 2.2.

Schematischer Aufbau der *patch-clamp*-Anlage: 1. Schwingungsgedämpfter Tisch; 2. Faraday'scher Käfig; 3. inverse Mikroskop; 4. Mikromanipulator (Motoreinheit); 5. Vorverstärker mit Pipettenhalter und *patch*-Pipette; 6. Objektisch mit Versuchskammern; 7. Mikromanipulator (Steuereinheit); 8. Hauptverstärker mit AD/DA Wandler; 9. Computer, 10 Joystick 11. Bildschirm. (Nach KOHLHAAS 2006, Seite 54. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Autors.)

Der Membranstrom wird indirekt durch einen ihm entgegen gerichteten Kompensationsstrom gemessen. Der Kompensationsstrom ist identisch zum Membranstrom. Im Schaltkreis des Vorverstärkers wird das durch den *operational amplifier* (OPA) ermöglicht, der gleichzeitig eine Spannung generiert und den Kompensationsstrom misst. Diese Strom-Spannungswandlung im OPA ist proportional und steht für die elektrischen Eigenschaften der Zelle.

Die analogen Stromsignale werden an der Steuereinheit kalibriert und zum Hauptverstärker (8) weitergegeben. In diesem erfolgt die Filterung, Verstärkung und Digitalisierung des Signals. Der Hauptverstärker beziehungsweise AD/DA-Wandler nimmt das Signal umso genauer auf, je höher die Aufzeichnungsgeschwindigkeit ist. Um dabei ein möglichst genaue Datenerhebung zu ermöglichen sollte die Abtastungsfrequenz mindestens doppelt so hoch sein, wie die maximale Veränderungsgeschwindigkeit des gemessenen Signals, das so genannte NYQUIST-Kriterium.

Die *patch-clamp-software* am *personal computer* (9; 11) stellt die Daten oszillographisch dar und speichert sie für die spätere Analyse. Mit *software*-unterstützten Programmen können gezielt Stimulationsprotokollen an den Einzelzellen durchgeführt werden.

2.3.2. Anwendungsmöglichkeiten der Technik

Die *patch*-Pipetten werden im Pipettenziehgerät, dem so genannten *puller*, mit dem benötigten Widerstand hergestellt. Die Pipettenöffnung bestimmt im Wesentlichen den Widerstand der *patch*-Pipette und kann durch Ziehgeschwindigkeit, Hitzeapplikation und

Zugkraft im *puller* eingestellt werden. Mit der im Pipettenhalter eingelegten und mit Experimentalflüssigkeit gefüllten Pipette wird an die Zellmembran via Mikromanipulator herangefahren. Durch Aufsetzen der Pipettenspitze auf die Zellmembran wird der *loose-patch*-Zustand erreicht. Hierbei ist aufgrund der großen *leak*-Ströme nur eine ungenaue Messung zu erzielen. Der *leak*-Strom ist ein, an der Pipettenöffnung in das umgebende Badmedium vorbei fließender Verluststrom.

Zur Messung der Membranspannung im Millivoltbereich wird das *gigaseal* angestrebt. Hierbei wird durch einen geringen Sog die Membran fest an die Pipettenöffnung adaptiert. Die *leak*-Ströme werden nahezu vollständig eliminiert, und die Messung erlangt höchste Präzision. Diese Konfiguration wird als *cell attached* bezeichnet.

Nach dem Einreißen der Zellmembran unterhalb der Pipette steht die Elektrode in direktem Kontakt mit dem Zytosol. Dies erlaubt eine Erfassung von Strömen und Potentialen über die gesamte Zelle (*whole cell*-Konfiguration). Nach der Zellmembranruptur sind *voltage clamp* und *current clamp*-Messungen möglich. Im *current clamp* wird der Strom konstant gehalten und die Potentialdifferenzen analysiert.

Weitere Konfigurationen zwischen Pipette und Zellmembran, wie die *outside-out* und *inside-out*, richten sich an spezielle Fragestellungen zu Effektoren an der Zellmembran.

(Nach HAMILL et al. 1981; NUMBERGER und DRAGUHN 1996; SAKMANN und NEHER 1984)

2.3.3. Aufbau der durchgeführten *patch-clamp*-Experimente

Die Untersuchungen wurden mit den aus der Myozytenisolation gewonnenen Einzelzellen durchgeführt. Dazu wurden die Myozyten, nach dem Ca^{2+} -Aufbau bis 0,5 mM Ca^{2+} -Ionen, in die mit 1,7 μl Laminin (Sigma L2020) beschichteten Messkammern ausplattiert und für 15 min zur Fixierung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Ruhezeit wurde die Isolationstyrode (Tab. 2.1.) gegen die betreffende Badlösung (Tab. 2.5.) mit 1 mM Ca^{2+} -Ionen vorsichtig ausgewaschen.

Die dünnwandigen Borosilikat-*patch*-Pipetten (Hugo Sachs Elektronik / March-Hugstetten, Artikel Nr. 30-0052) wurden im Pipetteziehgerät (DMZ Universal Puller von Zeitz-Instruments GmbH) gezogen. Die *puller*-Einstellungen wurden so gewählt, dass der Pipettenwiderstand zwischen 2,5 bis 3,5 M Ω lag.

Es wurde ein inverses Mikroskop (Nikon Diaphot 300) verwendet, an dessen Objektisch der Vorverstärker (EPC 10 von HEKA) samt Pipettenhalter angebracht war. Dieser ist auf einen Mikromanipulator (von Eppendorf mit MIM 4 Steuereinheit und POS 2.1 *software*, beides von HEKA) verbunden. Der dem Vorverstärker folgende Hauptverstärker (EPC 10 von HEKA) wurde am Computer angeschlossen, auf dem die *software* (Patch Master 2.0 von HEKA) installiert war.

Die *patch*-Pipette wurde mit der Pipettenlösung (Tab. 2.6.) gefüllt. Über die chlorierte Silberdrahtelektrode ist die Pipettenlösung mit dem Vorverstärker verbunden. Ein minimaler Überdruck in der Pipette verhinderte die Verschmutzung an deren Spitze beim Eintauchen in die Badlösung und erleichtert das *seal*. Folgend konnte mit dem Joystick der Mikromanipulator gesteuert werden und an die Zellmembran herangefahren werden.

Unter optischer Kontrolle wurde die Pipettenspitze in das Badmedium eingetaucht. Weitere Annäherung an die Zelloberfläche wurde unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Nach mikrometernahem Stopp vor der Zellmembran wurde nun mit dem Testspannungspuls am Oszilloskop, als Anhaltspunkt des Pipetten-Zellabstands, das weitere Heranfahren kontrolliert. Das *gigaseal* wurde durch Ablassen des zuvor angelegten Überdrucks und kurzem Sog erreicht. Der *seal*-Erfolg konnte durch den auf der Nulllinie liegenden Spannungspuls und dem elektrischen Widerstand in hohem Gigaohmbereich geprüft werden. Die Membranruptur wurde durch den ruckartigen Sog erzielt und die Messung im *whole cell*-Modus konnte beginnen. Das Messprotokoll wurde gestartet, wenn das *gigaseal* stabil blieb und nach circa 5 min das Zytoplasma an die Pipettenlösung adaptiert war.

2.3.3.1. Aktionspotentialaufzeichnung und -auswertung

Die AP wurden im current clamp Modus aufgezeichnet. Je 20 AP wurden mit einem Wiederholungsintervall von jeweils 0,5 s; 1 s; 2 s und 4 s ausgelöst. Der Stimulationsstrom wurde mit 1000 pA und die Stimulationsdauer mit 7 ms festgelegt. Für die Abtastfrequenz wurden 4 kHz gewählt. Als zweites Protokoll zur Aufnahme von möglichen spontanen AP wurde 4 s lang das Membranpotential noch passiv registriert.

Die Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgte *software*-unterstützt. Am Patch Master 2.0 wurden die AP als IgorPro-Dateien ausgelesen und mithilfe des abf-Utility (ABF File Utility von Justin Lee) zu abf-Dateien konvertiert. Der zeitliche Verlauf der AP wurde in Clampfit 8 (Axon Instruments) ausgewertet. Es wurden jeweils Mittelwerte aus 20 AP gebildet.

Die AP-Auswertung erfolgte nach den Repolarisationszeiten. Hierbei wurden die Repolarisationszeiten (RT_{30} ; RT_{50} ; RT_{80} ; RT_{90}) vom 30; 50; 80 und 90 %igen Abfall vom *peak* (Maximalwert der Amplitude) bis zur vollständigen Repolarisation ermittelt. Weiterhin wurde die maximale Anstiegsgeschwindigkeit, die Anstiegsdauer sowie die Dauer des AP's (APD) bestimmt.

2.3.3.2. Verwendete Pipetten- und Badlösung

Die Lösungen wurden vor den Experimenten frisch angesetzt beziehungsweise aus Aliquots (bei -20°C gelagert) aufgetaut.

Tab.
2.5.**Badlösung**

Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
KCl	4 mM	Merck 1.04933.0500
NaCl	140 mM	Fluka 71378
MgCl ₂	1 mM	Merck 8.14733.0100
HEPES	5 mM	Sigma H 4034
Glucose	10 mM	Roth X997.2
CaCl ₂	1 mM	Fluka 21115

gelöst in ddH₂O; bei RT auf pH=7,4 mit NaOH justiertTab.
2.6.**Pipettenlösung**

Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
L-Aspartic Acid (K ⁺ -Salz)	120 mM	Sigma A-6558
KCl	8 mM	Merck 1.04933.0500
NaCl	7 mM	Fluka 71378
MgCl ₂	1 mM	Merck 8.14733.0100
Mg-ATP	5 mM	Sigma A-9187
HEPES	10 mM	Sigma H-4034

gelöst in ddH₂O; auf pH=7,2 mit KOH justiert**2.4. Epifluoreszenzmikroskopie**

Der Fluoreszenzeffekt wird durch das JABLONSKI-Diagramm veranschaulicht. Ein Molekül kann die ihm zugeführte Energie anhand der spezifischen Absorptionswellenlänge aufnehmen und damit auf ein höheres Energieniveau wechseln. Das Molekül hält diese Energie nur kurz und wechselt dann wieder auf sein Ausgangsenergieniveau zurück. Das dabei emittierte Licht ist energieärmer, als das zuvor aufgenommene Absorptionslicht. Die sich ergebende Differenz zwischen der Wellenlänge des absorbierten Lichts und des emittierten Lichts ist die so genannte STOKES-Differenz (LAKOWICZ 1983).

2.4.1. Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie in der Elektrophysiologie

Die Fluoreszenzfarbstoffe können im sichtbaren Bereich des kurzwelligen Lichts verwendet werden. Die Fluoreszenzindikatoren (-farbstoffe) lassen sich in zwei Gruppen, die Ratiometrischen und Nicht-Ratiometrischen unterteilen. Ihnen gemeinsam ist die Bindung von freien Ionen im Zytosol als Chelatkomplex. Die Fluoreszenz ist von dem zytosolischen Ca²⁺-Ion in ionisierter Form abhängig. Die STOKES-Differenz erlaubt das Herausfiltern des

emittierten Lichts. Damit ist die Möglichkeit gegeben, Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen im Zytosol zu verfolgen. Das heißt bei einer Änderung der Ionenkonzentration ändert sich das fluoreszierende Signal (MINTA et al. 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht-ratiometrischen Farbstoffe verwendet. Deren Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Konzentration der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol. Da jedoch die Menge der Farbstoffbeladung in den verschiedenen Zellen unterschiedlich ist, erfolgt eine semiquantitative Aussage der Ca^{2+} -Konzentration.

Chemisch stellen sich die nicht-ratiometrischen Indikatoren als Rhodamin- oder Fluorescein-Derivate dar. Für den in dieser Arbeit verwendeten Fluorophor - Fluo-3 - zur Darstellung von Ca^{2+} -Ionen, bedeutet das chemisch genau: Es ist eine Fluorescein-1;2-bis(2-amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat Säure mit einer 2;7-dichloro-3;6-dihydroxyxanthon Substitution. Der Farbstoff bindet das Ca^{2+} -Ion selektiv als Chelatkomplex (TSIEN 1980). Ein intrazellulärer Einsatz des Fluo-3-Farbstoffs konnte von KAO et al. (1989) demonstriert werden. Hierbei diffundieren die Farbstoffmoleküle als Ester in das Zytosol und wird nach Hydrolyse dieser Esterbindung wirksam. Der Komplex kann jetzt Ca^{2+} -Ionen binden aber nicht mehr aus der Zelle austreten. Die heute gebräuchliche Form von Fluo-3 ist ein Azetoxymethylester (AM also Fluo-3 AM). Der Farbstoff trägt folgende Eigenschaften: Ein Exzitationsspektrum von 490 bis 510 nm, die Emissionswellenlänge bei 526 nm in hydrolysierte Form. Die Dissoziationskonstante (K_d), als Gleichgewichtszustand der Reaktionsprodukte, beträgt 390 nM. Das Molekulargewicht ist mit $1130 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ beschrieben.

2.4.2. Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Zur Epifluoreszenzmikroskopie wird ein inverses Mikroskop verwendet, das in einem mit Rotlicht abgedunkelten Raum zum Schutz des Fluorophors steht. Der Strahlenverlauf beginnt mit dem Anregungslicht der externen UV-Lampe (1, siehe Abb. 2.3.), wobei die spezifischen Wellenlängenspektren durch einen Filtersatz (2) an der Anlage selektiert werden (Filtersatz für Fluo-3: $480 \pm 15 \text{ nm}$). Im Mikroskop wurde das Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel (505 nm *long pass*) (5) zum Objekt (3) gelenkt. Vom Objekt emittiertes Licht und das sichtbare Durchlicht (695 nm *long pass*) werden vom Objektiv aufgefangen und entlang des Strahlengangs diesmal durch den Spiegel (5) hindurch zu den Photomultipliern und der Kamera (10 und 11) geführt. Der dichroitische Spiegel erlaubt es, die kurzwelligen Anregungsmedien zu reflektieren, jedoch die langwelligen Emissionsspektren und das Durchlicht für die Kamera durchzulassen. Nach erfolgter Trennung der beiden Wellenlängen wird das Lichtsignal zu den nachstehenden Aufnahmegeräten weitergeleitet. Außerhalb des Mikroskops werden die Wellenlängen für das sichtbare Licht, zur Kamera und den Photomultiplier zur Datenakquisition im Computer umgelenkt. Dies erfolgt durch einen weiteren dichroitischen Spiegel (685 nm *long pass*) (7) und einen einfachen Spiegel (8). Die Anlage ist komplett kommerziell von ION OPTIX Corporation verfügbar.

Das Fluoreszenzmikroskop besteht aus der Xenon-Bogenlampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Incorporation, Japan) in der das Anregungslicht generiert wird und über ein flexibles Lichtleiterkabel das Mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000) erreicht.

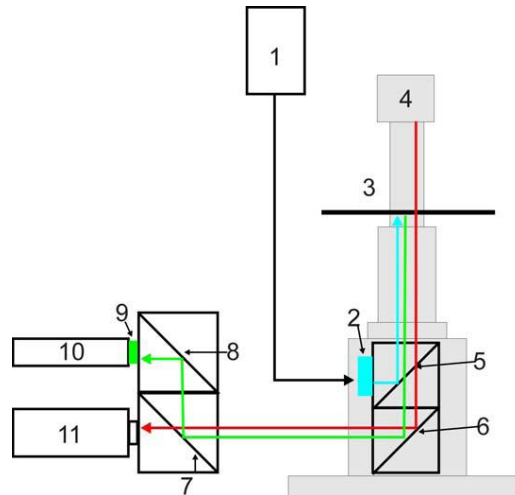


Abb. 2.3.

Schematische Darstellung der Epifluoreszenzmessungen mit Fluo-3, AM: 1. UV-Lampe und Hyper Switch; 2. Filter (480 ± 15 nm); 3. Untersuchungsobjekt; 4. Rotlichtlampe mit Filter (695 nm *long pass*); 5. Dichroitischer Spiegel (505 nm *long pass*); 6. Spiegel; 7. Dichroitischer Spiegel (685 nm *long pass*); 8. Spiegel; 7. und 8. *Cell frame adapter*; 9. Filter (535 ± 20 nm); 10. Photomultiplier und 11. Kamera (Nach KOHLHAAS 2006, Seite 66. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Autors.)

Mit dem *cell frame adapter* (7; 8) können die Einzelzellen beziehungsweise deren ausgestrahltes Licht, anhand von Blenden, zur Messung ausgewählt werden. Die Photomultiplier nehmen das Fluoreszenzsignal auf und transformieren es in ein verstärktes Spannungssignal. Dieses analoge Signal wird im Fluoreszenz-System-Interface digitalisiert. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit ION Wizard Acquire Version 4 (*software* von ION OPTIX).

In der Videomikroskopie wird die Sarkomerlänge durch die *software* per Bildanalyse bestimmt (Myozytenkamera von MyoCam™). Ein Stimulator (MyoPacer von ION OPTIX) zur Anregung der Zellkontraktion, die Stimulationselektroden, Heizung und ein Temperatursensor waren in der Messkammer angebracht und zählen zum vollständigen Setup des Protokolls der Epifluoreszenzmessung.

2.4.3. Messung mit der Epifluoreszenzmikroskopie und Versuchsanordnungen

In dieser Arbeit wurden T-cap-KO sowie Melusin-TG-Tiere mit der Epifluoreszenztechnik untersucht. Zuerst wurden die Kardiomyozyten isoliert und nach dem Ca^{2+} -Aufbau in den lamininbeschichteten Zellkammern ausplattiert. Die folgenden Schritte der Epifluoreszenzmessung wurden in einem abgedunkelten Raum vorgenommen. Nach der Anheftung der Zellen über 5 min konnte das Isolationsmedium zur Farbstoffbeladung gegen $200\ \mu\text{l}$ der $10\ \mu\text{M}$ Fluo-3-Farbstofflösung (mit $1\ \text{mM}$ Ca^{2+} -Ionen, siehe Tab. 2.11.) ausgetauscht und für

15 min inkubiert werden. Vor der Messung wurde die Farbstofflösung aus der Zellkammer durch 5 min Superfusion ausgewaschen. Die Messkammertemperatur durch die Heizung wurde auf 35°C justiert. Bis zur Verwendung der Zellen wurden diese in Isolationstyrode (0,5 mM Ca²⁺-Ionen) bei RT aufbewahrt (siehe Tab. 2.4.).

Die Untersuchung des *EC-Coupling* wurde durch drei verschiedene Stimulationsprotokolle durchgeführt. Die Protokolle sind *Force Frequency* (FF), *Post Rest* (PR) und der *caffeine*-Stoß. Das FF-Protokoll untersucht die Fluoreszenztransienten und die Zellverkürzung bei verschiedenen Stimulationsprotokollen. Dazu wurden die Zellen in der Messkammer mit dem MyoPacer durch nacheinander aufsteigenden Frequenzen über 1, 2, 4 und 8 Hz stimuliert, bis sie jeweils einen gleich bleibenden Kontraktionszustand (*steady state*) erreichten.

Anschließend wurde das PR-Protokoll zur Bestimmung der Wiederaufnahmekapazität der SR-Ca²⁺-Speicher durchgeführt. In der diastolischen Pause sind die SERCA-Funktion und das SR-*leak* über die RyR für den SR-Ca²⁺-Gehalt bestimmend. Die 1 Hz Stimulation wurde bei der PR für jeweils 10 s, 30 s oder 60 s unterbrochen. Die erste stimulierte Kontraktion nach der Pause wurde mit der vorangegangenen bei 1 Hz *steady state* für die weitere Auswertung verglichen.

Die Bestimmung der Aktivität des NCX's und des SR-Ca²⁺-Gehalts konnte mit einmaligem 10 mM *caffeine*-Stoß (siehe Tab. 2.8.) erfolgen. Dadurch wurde der RyR komplett geöffnet, worauf sich das SR vollständig entleerte. Die zytosolische Ca²⁺-Elimination resultiert unter *caffeine*-Einfluss deswegen ausschließlich über den NCX nach extrazellulär bei noch geöffneten RyR.

2.4.4. Datenauswertung

Die digitalisierten Daten wurden mit ION Wizard (von ION OPTIX) aufgezeichnet und ausgewertet. Vor Auswertung der Fluoreszenzsignale musste die Hintergrundfluoreszenz von der Einzelaufzeichnung subtrahiert werden. Aus den photometrischen sowie video-mikroskopischen Signalen von mindestens zehn Einzelkontraktionen wurde ein Mittelwert erstellt (Ausnahme: PR und *caffeine* nur erste Kontraktion nach der Pause).

Bei den Fluoreszenztransienten wurden die *baseline* als tiefster Punkt der Diastole sowie der *peak* als höchste Fluoreszenzintensität bestimmt. Der Quotient $\Delta F/F_0$ dieser beiden Werte ergibt ein Maß für die semiquantitativen Ca²⁺-Konzentration des Zytosols, bezogen auf die diastolische Ca²⁺-Konzentration. Die Relaxationszeit, als Zeit bis zur Eliminierung der zytosolischen Ca²⁺-Ionen, wurde bei 50; 80 und 90 %igem Abfall der maximalen Fluoreszenz bestimmt. Der Abfall des Ca²⁺-Transienten ($\tau_{Ca^{2+}}$ [s]) wurde als monoexponentielle Funktion durch die *software* berechnet.

Das *Fractional Release* (FR) als relatives Maß für die während einer regulären Kontraktion aus dem SR freigesetzten Ca²⁺-Menge, wurde wie folgt bestimmt:

$$FR[\%] = \frac{(\Delta F/F_0)_{1Hz}}{(\Delta F/F_0)_{Caff}} * 100$$

Formel 2.2.

$(\Delta F/F_0)_{1Hz}$ ist die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten bei 1 Hz; $(\Delta F/F_0)_{Caff}$ ist die Ca^{2+} -Amplitude des *caffeine*-induzierten Ca^{2+} -Transienten, der den SR- Ca^{2+} -Gehalt darstellt.

Die Auswertung der Sarkomerlänge und deren Verkürzung in der Systole (*shortening*) erfolgten prozentual, bezogen auf die diastolische Ruhezelllänge (RZL). Auch wurde hier die Zeit ermittelt bis zum Erreichen der 50; 80 und 90 %igen Ausgangslänge von der Verkürzung aus.

2.4.5. Versuchslösungen zur Epifluoreszenz

Tab.
2.7.

Messtyrode		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
NaCl	140 mM	Fluka 71378
KCl	4 mM	Merck 1.04933.0500
MgCl ₂	1 mM	Merck 8.14733.0100
HEPES	5 mM	Sigma H-4034
Glucose	10 mM	Roth X997.2
CaCl ₂	1 mM	Fluka 21115

gelöst in Aqua dest.; bei RT auf pH=7,54 mit NaOH justiert

Tab.
2.8.

Messtyrode mit Koffein		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Caffeine	10 mM	Sigma C-53

gelöst in Messtyrode; bei RT auf pH=7,54 mit NaOH justiert

Tab.
2.9.

Farbstofflösung Fluo-3 Stock		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Fluo-3 (AM)	1 mM	TefLabs 0116

gelöst in DMSO

Tab.
2.10.

Pluronic-Lösung		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Pluronic	20 % w/v	Sigma P-2443

gelöst in DMSO

Tab.
2.11.

Farbstofflösung		
Fluo-3		
Substanz	Konzentration	Erzeuger und Bestellnr.
Pluronic-Lösung 20 % w/v	0,02 % w/v	siehe Tab. 2.10.
Fluo-3 AM	0,01 mM	siehe Tab. 2.9.
CaCl ₂	1 mM	Fluka 21115

gelöst in Messtyrode; bei RT

2.5. Liste der verwendeten Substanzen

Tab.
2.12.

Kernsubstanzen		
Übersicht		
Substanz		Erzeuger und Bestellnr.
zu 2.1. Elektrokardiographie		
Isofluran		Servopharma
Xylocain-Gel 2%		Astra Zeneca
zu 2.2. Myozytenisolation		
unfraktioniertes Heparin		Roche Pharma
Liberase Blendzyme 1		Roche 1988417
Trypsin 2,5 % (10-fach)		Invitrogen 15090046
Butanedionmonoxim (BDM)		Sigma B-0753
bovine calf serum (BCS)		Sigma 12133C
Laminin		Sigma L-2020
zu 2.3. Patch Clamp		
L-Aspartic Acid (K ⁺ -Salz)		Sigma A-6558
Mg-ATP		Sigma A-9187
zu 2.4. Epifluoreszenz		
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid-Lösung)		Fluka 41640
Fluo-3 AM		TafLabs 0116
Pluronic 20 %		Sigma P-2442
Caffeine		Aldrich C-53

2.6. Statistik

Die Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2003 zusammengefasst. Hier wurden die Daten den entsprechenden Gruppen zugeteilt und die Mittelwerte, Standardabweichung und SEM (*standard error of the mean*, der Standardfehler) ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat 3.5. Für nicht-wiederholte Messwerte konnte der t-Test herangezogen werden. Mit dem 2-Wege-Anova RM konnten die

Messwerte aus sich wiederholenden Messwerten (longitudinale Daten) verglichen werden. Der Post-Hoc-Test erfolgte dabei nach Student-Newman-Keul.

Mit dem Ergebnis der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde das Signifikanzkriterium festgesetzt. Die erwähnten Daten sind entweder als Originalregistrierungen dargestellt oder als SEM angegeben. Die graphische Aufzeichnung konnte anhand von GraphPadPrism 3.0 und Microsoft Office Excel 2003 erstellt werden.

3. Ergebnisse

3.1. T-cap-KO-Charakteristika

3.1.1. Elektrokardiographische Beschreibung

Für den Wildtyp (WT) konnte eine Anzahl von $n=7$ und für den T-cap-Knock Out (KO) $n=8$ Tiere gemessen werden. Das Alter der Tiere lag zwischen 26 und 40 Wochen. Die Rhythmus- und Frequenzauswertung des T-cap-KO's zeigte einen durchgehenden Sinusrhythmus ohne supraventrikuläre, ventrikuläre Extrasystolen, Tachykardien oder Pausen. Dieses Ergebnis entspricht den als WT-Kontrolle hinzugezogenen Tieren. Die Herzfrequenz konnte unverändert mit 493 ± 21 bpm für den WT versus 483 ± 11 bpm im T-cap-KO gemessen werden ($p=0,84$; siehe Abb. 3.2.A).

Die Zeiten für die Vorhoferregung (P-Welle), Überleitungszeit (PQ-Intervall) und Kammererregung (QRS) konnten wie folgt dargestellt werden. Die P-Welle mit $13,9\pm 1,3$ ms im WT vs. $16,2\pm 1,7$ ms im T-cap-KO zeigte keine signifikante Differenz bei $p=0,37$. Das PQ-Intervall lag im WT bei $47,5\pm 3,0$ ms zu $46,1\pm 2,5$ ms im T-cap-KO ($p=0,62$). Der Vergleich des QRS-Komplexes mit $26,8\pm 4,4$ ms für den WT vs. $21,9\pm 0,6$ ms im T-cap-KO stellten sich unverändert dar ($p=0,25$). Somit ließen sich unveränderte Vorhoferregung, Überleitungszeit und Kammererregung im Oberflächen-EKG des T-cap-KO's darstellen (siehe Tab. 3.1).

	P (ms)	PQ (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)	RR (ms)	HF (min^{-1})
WT (n=7)							
Mittelwert \pm S.E.M.	13,8 \pm 1,3	47,6 \pm 3,0	26,8 \pm 4,4	55,7 \pm 1,3	50,4 \pm 1,1	123,0 \pm 5,6	493 \pm 21
T-cap (n=8)							
Mittelwert \pm S.E.M.	16,2 \pm 1,7	46,1 \pm 2,5	21,9 \pm 0,6	56,6 \pm 1,0	50,8 \pm 0,9	124,7 \pm 2,8	483 \pm 11
t-Test	P=0,37 n.s.	P=0,62 n.s.	P=0,25 n.s.	P=0,62 n.s.	P=0,68 n.s.	P=0,98 n.s.	P=0,84 n.s.

Tab. 3.1.

Tabelle der abgenommenen Zeitintervalle am Oberflächen-EKG der T-cap-KO-Tiere vs. WT. Die ermittelten Parameter zeigten keine Unterschiede in den beiden Gruppen.

Die Erregungsrückbildung, verdeutlicht anhand des QT-Intervalls, stellte sich wie folgt dar. Das QT-Intervall im WT mit $55,7\pm 1,3$ ms vs. $56,6\pm 1,0$ ms für den T-cap-KO ($p=0,62$) sowie die frequenzkorrigierte QT_c-Zeit mit $50,4\pm 1,1$ ms für den WT vs. $50,8\pm 0,9$ ms für den T-cap-KO ($p=0,68$) stellten sich ebenfalls nicht unterschiedlich dar (siehe Tab. 3.1.; siehe Abb. 3.2.B).

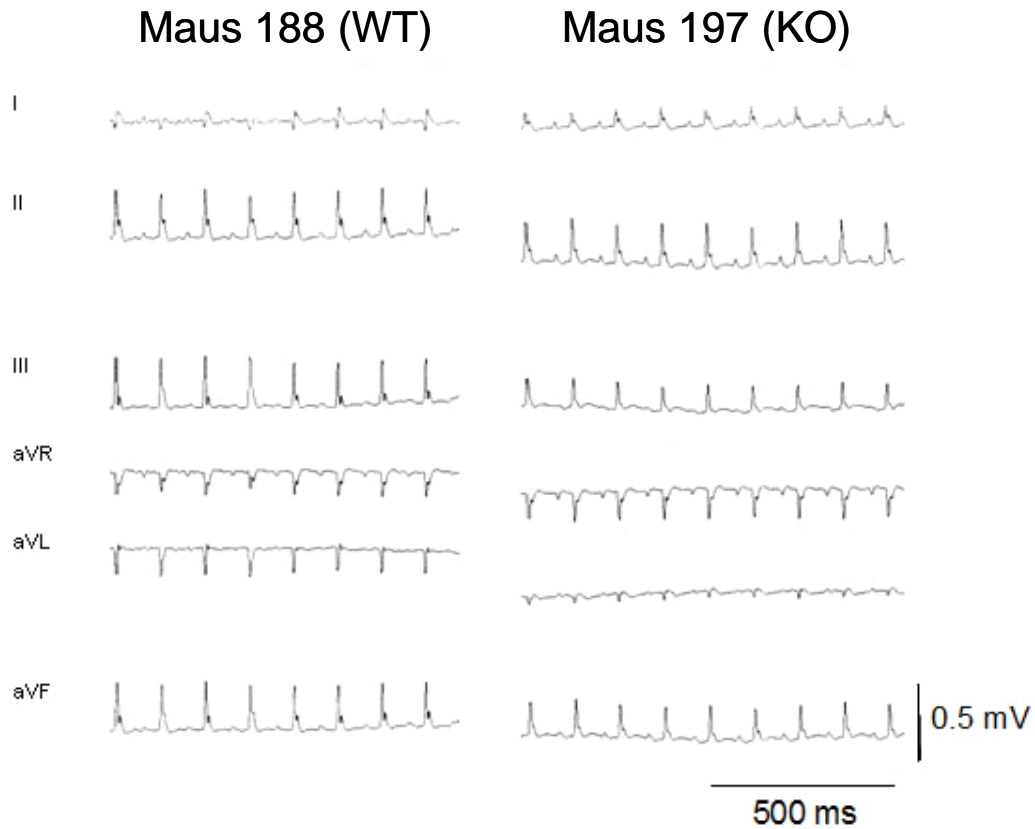


Abb. 3.1.

Originalregistrierungen einer EKG-Aufzeichnung im T-cap-KO (Maus 197) und der WT-Kontrolle (Maus 188). Die graphische Gegenüberstellung zeigt ähnliche Erregungsbildungs- und Erregungsrückbildungseigenschaften.

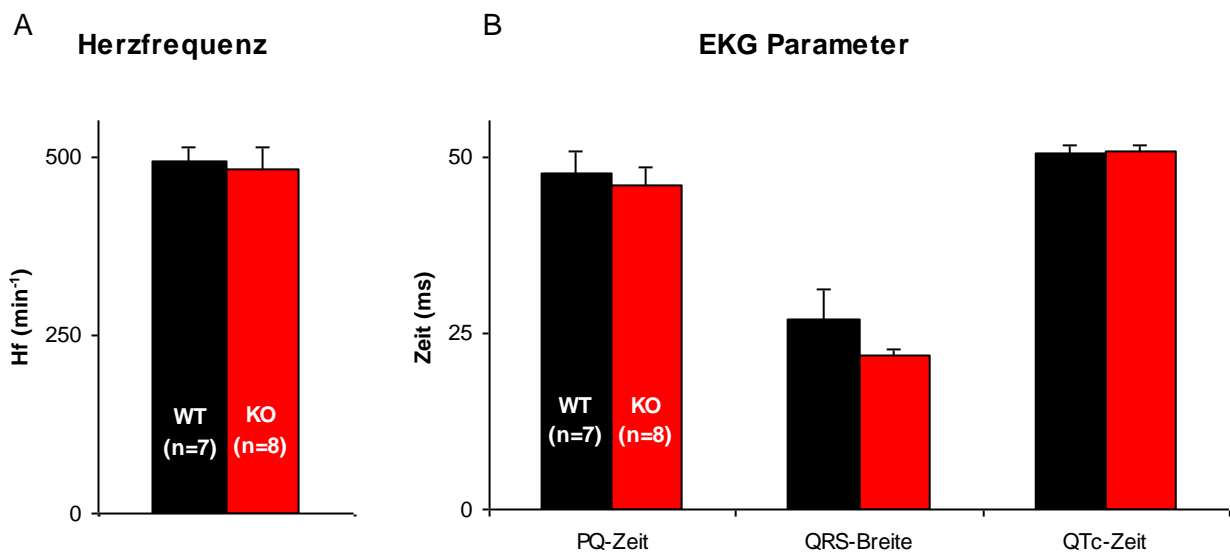


Abb. 3.2. A/B

Die Abbildung zeigt die Herzfrequenz (A) und die Parameter des Kammerkomplexes im Oberflächen-EKG der Maus (B). Es sind keine signifikanten Abweichungen aufgetreten im T-cap-KO vs. Kontrolle. (A) Herzfrequenz: WT 494 ± 21 bpm vs. T-cap-KO 483 ± 11 bpm ($p=0,84$); (B) PQ: WT $47,5 \pm 3,0$ ms vs. T-cap-KO $46,1 \pm 2,5$ ms ($p=0,62$); QRS: WT $26,8 \pm 4,4$ ms vs. T-cap-KO $21,9 \pm 0,6$ ms ($p=0,25$); QTc-Zeit: WT $50,8 \pm 1,1$ ms vs. T-cap-KO $50,8 \pm 0,9$ ms ($p=0,68$).

3.1.2. Das ventrikuläre AP der Kardiomyozyten

3.1.2.1. Das Ruhemembranpotential und die Amplitude

Das Ruhemembranpotential und die Amplitude wurden bei verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 0,5 Hz konnte für das Ruhemembranpotential und die Amplitude im WT eine Anzahl von $n=20$ und für den KO $n=19$, für 1 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=21$ und für den KO $n=18$, für 2 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=20$ und für den KO $n=18$ und für 4 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=19$ und für den KO $n=17$ gemessen werden.

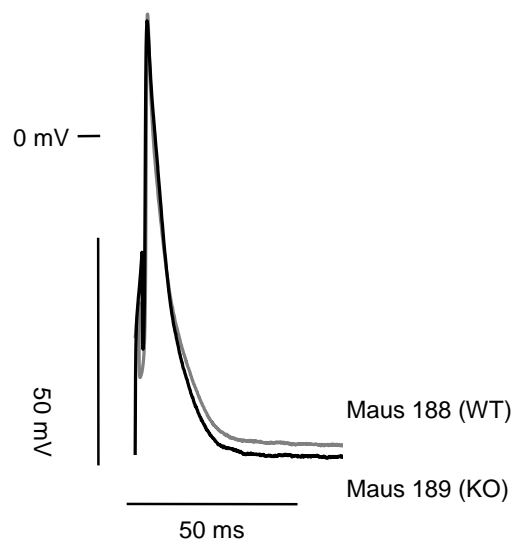


Abb. 3.3.

In der Abbildung ist jeweils ein originalregistriertes AP der T-cap-KO-Maus (schwarz) mit dem der WT-Kontrolle (grau) überlagert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Erläuterungen zu den getesteten Parametern *peak*, Amplitude, Ruhemembranpotential und Repolarisationszeit siehe Text.

In den Einzelfrequenzen zeigten sich bei 0,5 Hz; 1 Hz; 2 Hz und 4 Hz keine signifikanten Unterschiede im Ruhemembranpotential im Vergleich zwischen dem WT und dem T-cap-KO (0,5 Hz: WT $-73,9 \pm 1,0$ mV vs. T-cap-KO $-73,6 \pm 0,8$ mV, $p=0,81$; 1 Hz: WT $-73,6 \pm 1,0$ mV vs. T-cap-KO $-74,3 \pm 0,9$ mV, $p=0,62$; 2 Hz: WT $-74,2 \pm 1,2$ mV vs. T-cap-KO $-74,9 \pm 1,2$ mV, $p=0,72$; 4 Hz: WT $-74,3 \pm 1,1$ mV vs. T-cap-KO $-76,4 \pm 1,2$ mV, $p=0,20$; siehe Abb. 3.4.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen dem WT und dem T-cap-KO ($p=0,17$).

Der *peak* des AP's stellte sich in den Einzelfrequenzen von 0,5 bis 4 Hz zwischen WT und T-cap-KO nicht signifikant dar (0,5 Hz: WT $24,0 \pm 3,3$ mV vs. T-cap-KO $19,2 \pm 3,3$ mV, $p=0,31$; 1 Hz: WT $21,6 \pm 2,8$ mV vs. T-cap-KO $18,8 \pm 3,2$ mV, $p=0,52$; 2 Hz: WT $21,4 \pm 3,0$ mV vs. T-cap-KO $18,0 \pm 3,2$ mV, $p=0,44$; 4 Hz: WT $23,1 \pm 2,8$ mV vs. T-cap-KO $20,5 \pm 3,3$ mV, $p=0,55$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen dem WT und dem T-cap-KO ($p=0,40$).

Für die Amplitude zeigten sich in den Einzelfrequenzen von 0,5 bis 4 Hz keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen dem WT und dem T-cap-KO dar (0,5 Hz: WT $97,9 \pm 3,2$ mV vs. T-cap-KO $92,8 \pm 3,2$ mV, $p=0,27$; 1 Hz: WT $95,2 \pm 2,8$ mV vs. T-cap-KO $93,1 \pm 3,3$ mV, $p=0,63$; 2 Hz: WT $95,6 \pm 2,8$ mV vs. T-cap-KO $92,8 \pm 3,2$ mV, $p=0,52$; 4 Hz: WT $97,4 \pm 2,7$ mV vs. T-cap-KO $97,0 \pm 3,5$ mV, $p=0,92$; siehe Abb. 3.4.B). Im 2-Wege- Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen dem WT und dem T-cap-KO ($p=0,53$).

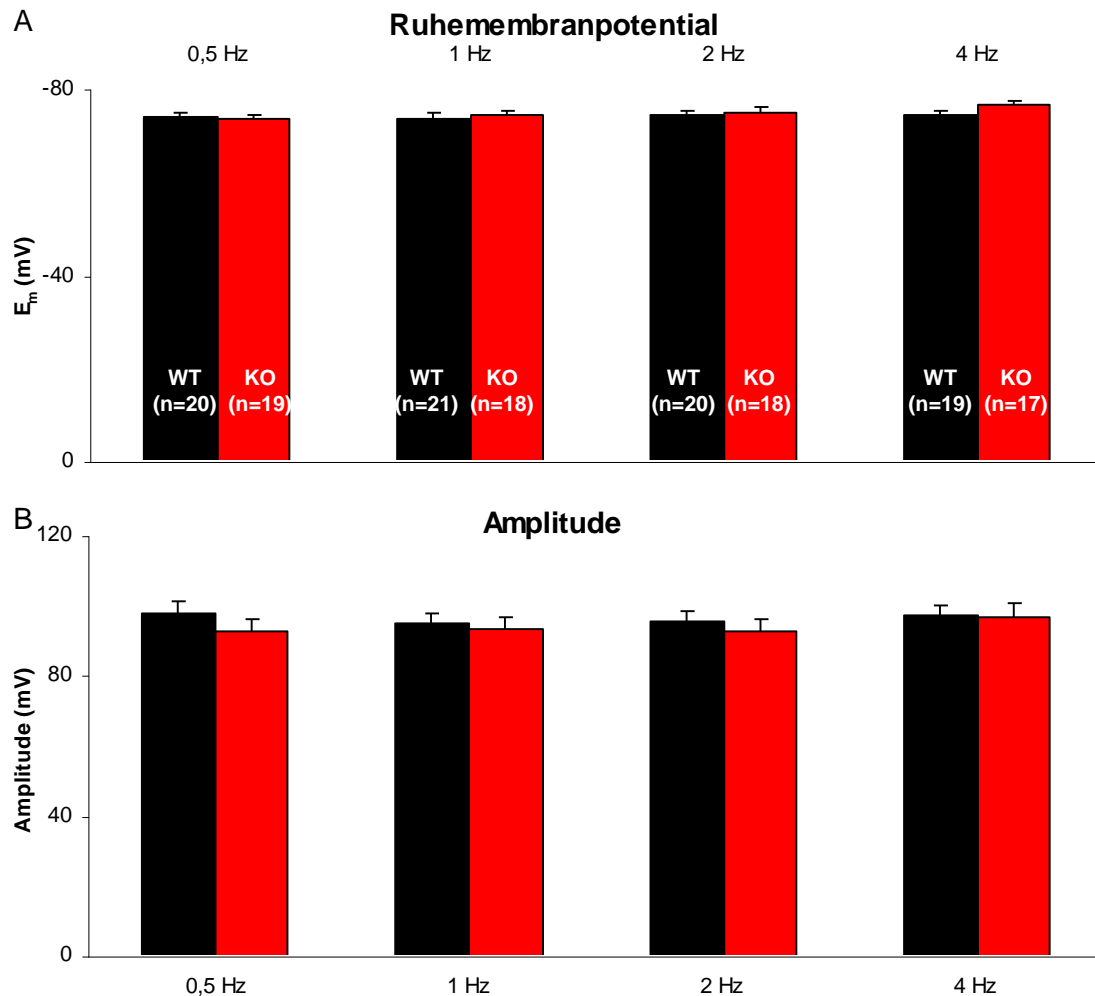


Abb. 3.4. A/B

Graphische Darstellung des Ruhemembranpotentials (E_m) und der Amplitude über die vier Einzelfrequenzen im T-cap-KO vs. WT-Kontrolle. Keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen von von 0,5 bis 4 Hz. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen T-cap-KO vs. WT-Kontrolle ($p>0,05$).

3.1.2.2. Die Repolarisationsphase

Die Repolarisationsdauer (RT_{30} ; RT_{50} ; RT_{80} ; RT_{90}) wurde wie folgt gemessen: Für 0,5 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=20$ und für den KO $n=19$; für 1 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=21$ und für den KO $n=18$; für 2 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=20$ und für den KO $n=18$; für 4 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=19$ und für den KO $n=17$ gemessen

werden. Mit hintereinander steigender Stimulationsfrequenz reduzierte sich die Anzahl messbarer Zellen des WT und vor allem des T-cap-KO.

Repolarisationszeit in ms			0,5 Hz	1 Hz	2 Hz	4 Hz	Anova RM
RT30	WT	Mittelwerte±SEM	1,7±0,2	1,7±0,2	1,7±0,2	1,6±0,2	P = 0,06
	T-cap KO		2,9±0,7	2,4±0,6	2,3±0,6	2,4±0,6	
			P = 0,10	P = 0,26	P = 0,25	P = 0,16	
RT50	WT	Mittelwerte±SEM	3,4±0,5	3,4±0,5	3,3±0,4	3,2±0,4	P = 0,16
	T-cap KO		4,7±1,0	4,1±0,9	3,9±0,8	4,2±0,9	
			P = 0,23	P = 0,50	P = 0,49	P = 0,30	
RT80	WT	Mittelwerte±SEM	9,6±1,3	11,3±2,4	11,3±2,4	11,5±2,4	P = 0,80
	T-cap KO		10,2±1,7	9,3±1,6	9,2±1,5	9,4±1,6	
			P = 0,78	P = 0,52	P = 0,48	P = 0,53	
RT90	WT	Mittelwerte±SEM	15,2±1,9	17,5±3,1	17,6±3,2	17,9±3,7	P = 0,54
	T-cap KO		14,9±2,3	14,0±2,1	14,0±2,0	13,7±1,9	
			P = 0,93	P = 0,37	P = 0,35	P = 0,34	

Tab 3.2.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und SEM für die Repolarisationszeit für den 30; 50; 80 und 90 %igen Abfall vom *peak* für die jeweilige Stimulationsfrequenz. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im T-cap-KO vs. Kontrolle in den Einzelfrequenzen von 0,5 - 4 Hz ($p > 0,05$) sowie im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen über alle Einzelfrequenzen hinweg (Anova RM $p > 0,05$).

Repolarisationszeit in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz

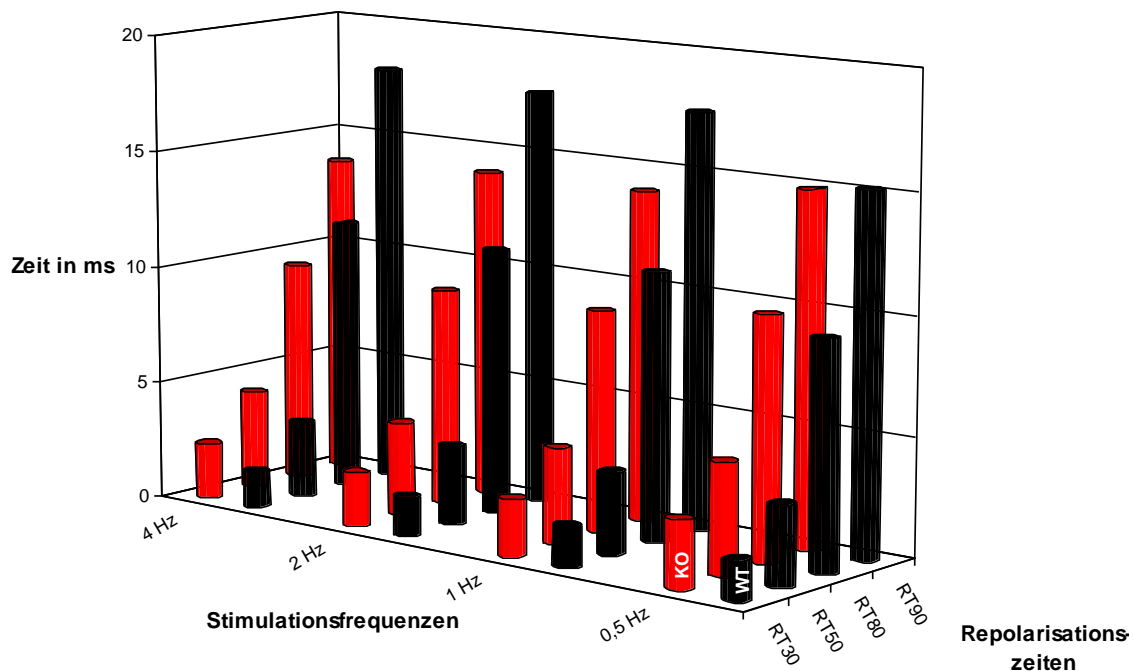


Abb. 3.5.

Die Abbildung zeigt die Repolarisationszeit für den 30; 50; 80 und 90 %igen Abfall vom *peak* für die jeweilige Stimulationsfrequenz. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im T-cap-KO vs. Kontrolle in den Einzelfrequenzen von 0,5 - 4 Hz ($p > 0,05$) sowie im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen über alle Einzelfrequenzen hinweg (Anova RM $p > 0,05$).

Hinsichtlich der Repolarisationsdauer RT_{30} konnten in den Einzelfrequenzen keine signifikanten Veränderungen im T-cap-KO gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p = 0,06$). Hinsichtlich der

Repolarisationsdauer RT_{50} konnten in den Einzelfrequenzen keine signifikanten Veränderungen im T-cap-KO gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,16$). Hinsichtlich der Repolarisationsdauer RT_{80} konnten in den Einzelfrequenzen keine signifikanten Veränderungen im T-cap-KO gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,80$). Hinsichtlich der Repolarisationsdauer RT_{90} konnten in den Einzelfrequenzen keine signifikanten Veränderungen im T-cap-KO gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,54$; siehe Tab. 3.2. und Abb. 3.5.). Die Untersuchung der AP im T-cap-KO gegenüber der WT-Kontrolle ergab für die Repolarisationsdauer weder in der frühen Repolarisationsphase (RT_{30} ; RT_{50}), noch in der späten Repolarisationsphase (RT_{80} ; RT_{90}) einen signifikanten Unterschied. Die Überlagerung von zwei originalregistrierten AP der T-cap-KO-Maus und des WT's zeigen ein nahezu identisches AP (siehe Abb. 3.3.).

3.1.3. Das *EC-Coupling*

In der Epifluoreszenzmikroskopie wurden Sarkomerlängen, systolische Zellverkürzung (*shortening*) und Ca^{2+} -Homöostase der T-cap-KO-Tiere gegenüber der WT-Kontrolle verglichen.

3.1.3.1. Sarkomerlänge, Ca^{2+} -Transient und Zellverkürzung

Die Sarkomerlänge, der Ca^{2+} -Transient und die Zellverkürzung wurden nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. In der FF ergaben sich für 1 Hz im WT eine Anzahl von $n=18$ und für den KO $n=19$; für 2 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=18$ und für den KO $n=20$ gemessen werden. Für 4 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=16$ und für den KO $n=18$ und für 8 Hz konnte im WT eine Anzahl von $n=10$ und für den KO $n=7$ gemessen werden. Die videomikroskopisch bestimmte diastolische Sarkomerlänge in den Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz Stimulation unterscheidet sich nicht signifikant im T-cap-KO vs. Kontrolle (1 Hz: WT $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. T-cap-KO $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$ $p=0,25$; 2 Hz: WT $1,74 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. T-cap-KO $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$ $p=0,43$; 4 Hz: WT $1,74 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. T-cap-KO $1,74 \pm 0,01 \mu\text{m}$ $p=0,88$; 8 Hz: WT $1,73 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. T-cap-KO $1,72 \pm 0,01 \mu\text{m}$ $p=0,61$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,38$).

Hinsichtlich des *shortening* in den Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz Stimulation unterscheidet sich der T-cap-KO vs. Kontrolle nicht signifikant (1 Hz: WT $3,3 \pm 0,2 \%RZL$ vs. T-cap-KO $2,4 \pm 0,2 \%RZL$ $p=0,05$; 2 Hz: WT $3,0 \pm 0,2 \%RZL$ vs. T-cap-KO $2,4 \pm 0,2 \%RZL$ $p=0,17$; 4 Hz:

WT $2,7 \pm 0,2$ %RZL vs. T-cap-KO $2,2 \pm 0,2$ %RZL $p=0,29$; 8 Hz: WT $1,8 \pm 0,3$ %RZL vs. T-cap-KO $1,4 \pm 0,4$ %RZL $p=0,65$; siehe Abb. 3.6. A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,13$).

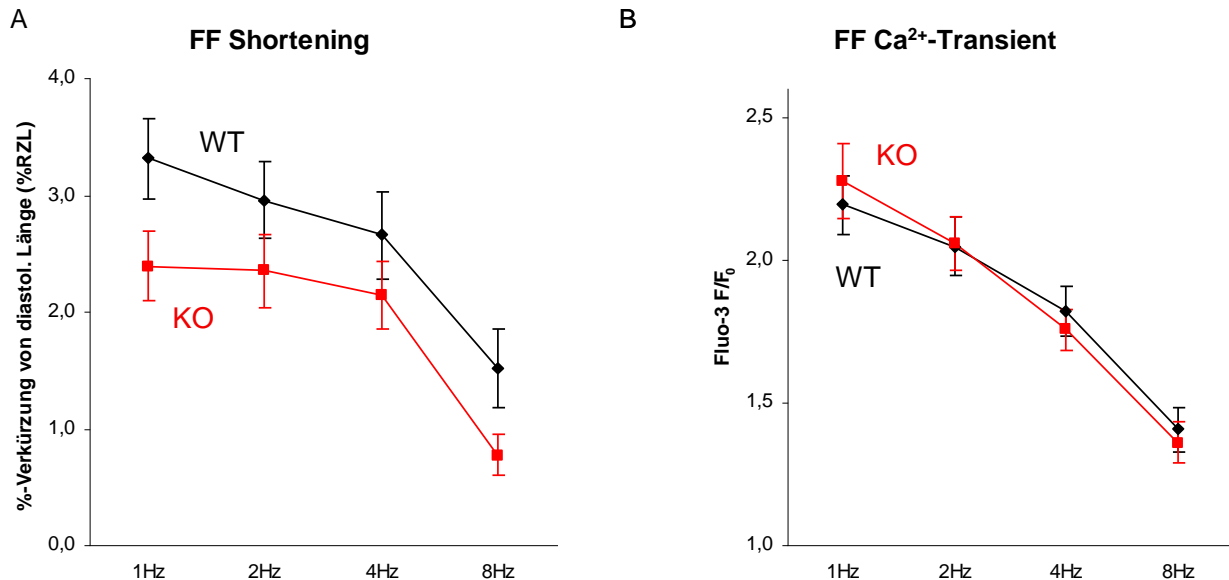


Abb. 3.6. A/B

Darstellung des *shortening* (A) und Ca²⁺-Transients (B) in der FF. Für beide Parameter unterscheidet sich der T-cap-KO in den Einzelfrequenzen nicht signifikant vom WT ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Vergleich für wiederholte Messungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich *shortening* und Ca²⁺-Transients zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p > 0,05$).

Der T-cap-KO hat keine negative Kraft-Frequenzbeziehung bei steigender Frequenz. Die Kraft-Frequenzbeziehung im WT ist zwischen 2 bis 8 Hz signifikant negativ (signifikant abfallender Ca²⁺-Transient bei zunehmender Frequenz Post-Hoc $p < 0,05$).

Der Ca²⁺-Transient (F/F_0) der Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz Stimulation unterscheidet sich nicht signifikant im T-cap-KO vs. WT-Kontrolle (F/F_0 1 Hz: WT $2,2 \pm 0,1$ F/F_0 vs. T-cap-KO $2,3 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,60$; F/F_0 2 Hz: WT $2,1 \pm 0,1$ F/F_0 vs. T-cap-KO $2,1 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,93$; F/F_0 4 Hz: WT $1,8 \pm 0,1$ F/F_0 vs. T-cap-KO $1,7 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,53$; F/F_0 8 Hz: WT $1,5 \pm 0,1$ F/F_0 vs. T-cap-KO $1,4 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,88$; siehe Abb. 3.6.B). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,93$).

Die Relaxationsparameter rt_{50} , rt_{80} , rt_{90} als Abfall des Ca²⁺-Transients und Zellverkürzung, geben an wie schnell das Ca²⁺-Ion aus dem Zytosol eliminiert (Ca²⁺-Eliminationszeit), beziehungsweise wie schnell die diastolische Sarkomerlänge (Relaxationszeit) wieder erreicht wird. Die Ca²⁺-Eliminationszeiten und Relaxationszeiten wurden nach den vier Stimulationsfrequenzen von 1 bis 8 Hz ausgewertet.

In den Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz zeigte sich für die Ca²⁺-Eliminationszeit rt_{50} bei 2 Hz eine signifikante Verlängerung im T-cap-KO. In den Frequenzen 1 Hz, 4 Hz und 8 Hz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT und T-cap-KO festgestellt werden (rt_{50} 2 Hz: WT $99,5 \pm 4,7$ ms vs. T-cap-KO $116,7 \pm 5,4$ ms $p=0,02$; siehe Abb. 3.7.A; siehe Tab. 3.3). Im 2-

Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied für die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{50} zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,12$).

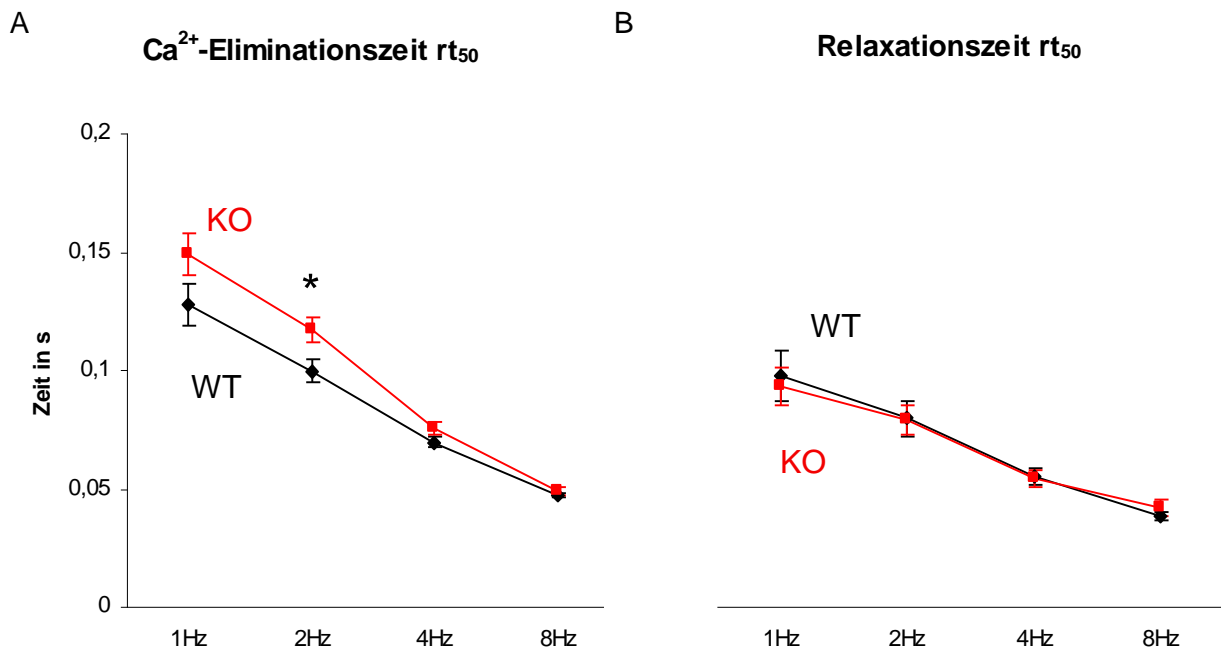


Abb. 3.7. A/B

Dargestellt sind der Relaxationsparameter rt_{50} für den Abfall des Ca^{2+} -Transienten und das *shortening*. Bei 2 Hz signifikant langsamere Ca^{2+} -Eliminierung im T-cap-KO (* signifikant vs. WT). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im T-cap-KO zur Kontrolle für die Ca^{2+} -Eliminationszeit und die Relaxationszeit (A: Anova RM $p=0,12$; B: Anova RM $p=0,50$).

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	127,4 \pm 8,8	99,5 \pm 4,7	69,4 \pm 2,3	46,5 \pm 0,9	
	Anzahl	18	18	16	10	
T-cap KO	Mittelwerte \pm SEM	148,4 \pm 9,0	116,7 \pm 5,4	75,1 \pm 2,6	48,7 \pm 1,6	
	Anzahl	19	20	18	7	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,10	P=0,02	P=0,11	P=0,21	P=0,12

Tab. 3.3.

Dargestellt ist die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{50} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

In den Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz stellte sich die Relaxationszeit rt_{50} für den T-cap-KO gegenüber der Kontrolle unverändert dar (siehe Abb. 3.7.B; siehe Tab. 3.4). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied in der Relaxationszeit rt_{50} zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,50$).

Relaxationszeit rt_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	92,5 \pm 10,4	75,5 \pm 7,0	52,3 \pm 3,5	36,2 \pm 1,7	
	Anzahl	18	18	16	10	
T-cap KO	Mittelwerte \pm SEM	88,3 \pm 7,8	74,7 \pm 5,8	51,3 \pm 3,1	39,1 \pm 3,4	
	Anzahl	19	20	18	7	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,74	P=0,93	P=0,84	P=0,41	P=0,50

Tab. 3.4.

Dargestellt ist die Relaxationszeit rt_{50} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

In den Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz zeigte sich für die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} bei 2 Hz eine signifikante Verlängerung im T-cap-KO gegenüber der WT-Kontrolle. In den Einzelfrequenzen 1 Hz, 4 Hz und 8 Hz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT und T-cap-KO festgestellt werden (rt_{80} 2 Hz: WT 203,3 \pm 11,2 ms vs. T-cap-KO 237,6 \pm 9,9 ms $p=0,02$; siehe Tab. 3.5). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,13$). Die Abbildung für die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} ist im Anhang 5.1.1. Abb. 5.1.A gezeigt.

Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	270,3 \pm 21,9	203,3 \pm 11,2	128,5 \pm 3,6	74,1 \pm 1,6	
	Mittelwerte \pm SEM	325,0 \pm 20,2	237,6 \pm 9,9	137,9 \pm 4,6	80,0 \pm 3,1	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,07	P=0,02	P=0,11	P=0,08	P=0,13

Tab. 3.5.

Dargestellt ist die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

Die Relaxationszeit rt_{80} in den Einzelfrequenzen stellt sich für den T-cap-KO gegenüber der Kontrolle unverändert dar (siehe Tab. 3.6). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,90$). Die Abbildung für die Relaxationszeit rt_{80} ist im Anhang 5.1.1. Abb. 5.1.B gezeigt.

Relaxationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	216,1 \pm 23,8	163,4 \pm 12,1	97,3 \pm 4,9	54,3 \pm 2,1	
	Mittelwerte \pm SEM	225,0 \pm 19,1	170,1 \pm 11,9	98,0 \pm 6,1	59,0 \pm 3,4	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,76	P=0,69	P=0,93	P=0,23	P=0,90

Tab. 3.6.

Dargestellt ist die Relaxationszeit rt_{80} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

In den Einzelfrequenzen zeigte sich für die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} bei 2 Hz eine signifikante Verlängerung im T-cap-KO versus WT-Kontrolle. In den Einzelfrequenzen 1 Hz, 4 Hz und 8 Hz konnte dieser signifikante Unterschied nicht dargestellt werden zwischen den beiden Gruppen (rt_{90} 2 Hz: WT 271,4 \pm 14,2 ms vs. T-cap-KO 313,8 \pm 11,9 ms $p=0,02$; siehe Tab. 3.7). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzel-

frequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Anova RM $p=0,08$). Die Abbildung für die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} ist im Anhang 5.1.1. Abb. 5.1.C gezeigt.

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	376,5 \pm 3,2	271,4 \pm 14,2	158,4 \pm 4,4	85,0 \pm 2,4	
T-cap KO	Mittelwerte \pm SEM	470,1 \pm 35,4	313,8 \pm 11,9	167,3 \pm 5,6	91,7 \pm 3,5	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,06	P=0,02	P=0,22	P=0,12	P=0,08

Tab. 3.7.

Dargestellt ist die Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

Die Relaxationszeit rt_{90} stellte sich in den Einzelfrequenzen für den T-cap-KO gegenüber der Kontrolle unverändert dar (siehe Tab. 3.8). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Anova RM $p=0,80$). Die Abbildung für die Relaxationszeit rt_{90} ist im Anhang 5.1.1. Abb. 5.1.D gezeigt.

Relaxationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT	Mittelwerte \pm SEM	325,8 \pm 33,8	227,3 \pm 14,1	126,3 \pm 4,9	63,4 \pm 2,1	
T-cap KO	Mittelwerte \pm SEM	346,5 \pm 28,5	243,9 \pm 11,6	131,7 \pm 5,5	69,3 \pm 3,2	
		t-Test				Anova RM
WT vs T-cap KO		P=0,63	P=0,36	P=0,47	P=0,12	P=0,80

Tab. 3.8.

Dargestellt ist die Relaxationszeit rt_{90} in den Einzelfrequenzen der FF. Erläuterungen siehe Text.

3.1.3.2. Post Rest

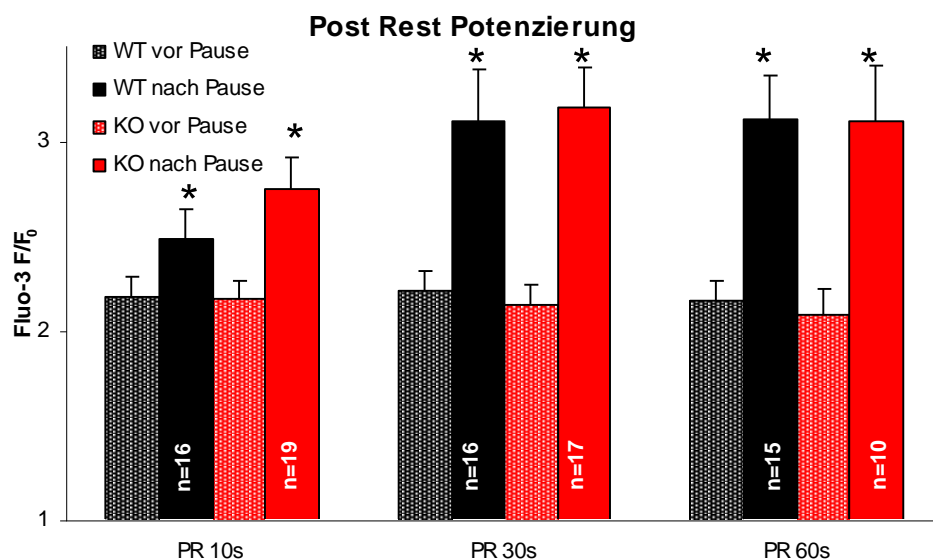


Abb. 3.8.

Darstellung der Ca^{2+} -Transienten in der PR. Die PR 10; 30 und 60 zeigten keine signifikanten Unterschiede im T-cap-KO gegenüber der WT-Kontrolle ($p>0,05$). Gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz Stimulation (*steady state*) besteht eine signifikante Zunahme der Ca^{2+} -Transienten im PR (* $p<0,05$).

Die PR stellt die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's dar. Hinsichtlich des Ca^{2+} -Transienten vor der Pause im *steady state* bei 1 Hz konnte kein signifikanter Unterschied im T-cap-KO vs. WT festgestellt werden (F/F_0 1 Hz: WT vs. T-cap-KO $p>0,05$).

Für die PR 10 konnte im WT eine Anzahl von $n=16$ und für den KO eine Anzahl von $n=19$ gemessen werden. Die PR 10 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen T-cap-KO $2,6\pm 0,2 F/F_0$ und dem WT $2,5\pm 0,2 F/F_0$ ($p=0,27$; siehe Abb. 3.8.). Für die PR 30 konnte im WT eine Anzahl von $n=16$ und für den KO $n=17$ gemessen werden. Die PR 30 zeigte sich im WT mit $3,1\pm 0,3 F/F_0$ und im T-cap-KO mit $3,2\pm 0,2 F/F_0$ als nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,83$; siehe Abb. 3.8.). Für die PR 60 konnte im WT eine Anzahl von $n=15$ und für den KO $n=10$ gemessen werden. Die PR 60 ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen dem WT $3,1\pm 0,2 F/F_0$ und dem T-cap-KO $3,1\pm 0,3 F/F_0$ ($p=0,98$; siehe Abb. 3.8.).

3.1.3.3. Caffeine-Protokoll

Für das *caffeine*-Protokoll konnte im WT eine Anzahl von $n=14$ und für den T-cap-KO eine Anzahl von $n=14$ gemessen werden. Die Bestimmung des SR- Ca^{2+} -Gehalts mittels *caffeine*-Protokoll ergab für die Fluoreszenzintensität F/F_0 nach dem *caffeine*-Stoß im T-cap-KO $3,9\pm 0,2 F/F_0$ vs. WT $3,4\pm 0,3 F/F_0$. Der SR- Ca^{2+} -Gehalt bzw. die Amplitude des Ca^{2+} -Transient nach *caffeine* unterscheidet sich bei einem Signifikanzniveau von $p=0,11$ nicht signifikant (siehe Abb. 3.9.A).

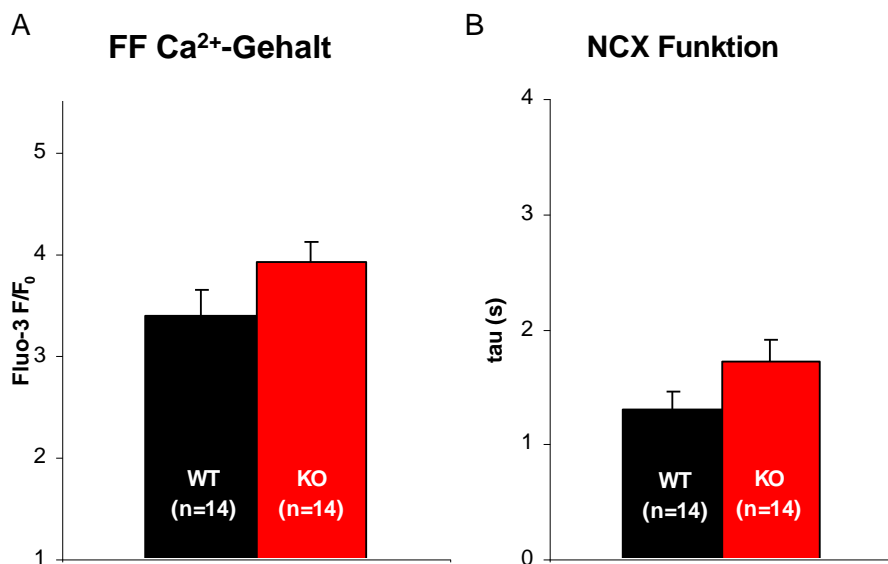


Abb. 3.9. A/B

Dargestellt sind die Ergebnisse aus dem *caffeine*-Protokoll. Der Fluoreszenztransient nach dem *caffeine*-Stoß lässt Aussagen über den SR- Ca^{2+} -Gehalt und die NCX-Aktivität zu. Für beide Parameter ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem T-cap-KO und der Kontrolle darstellen ($p>0,05$).

Das FR beschreibt die Freisetzung von SR- Ca^{2+} bei 1 Hz in Relation zum SR-Gesamt- Ca^{2+} -Gehalt, das heißt, wie viel Prozent des SR- Ca^{2+} -Gehalts bei einer 1 Hz Kontraktion ausgeschüttet wurden. Das FR im T-cap-KO konnte mit $62,7\pm 3,7\%$ vs. WT mit $63,8\pm 3,4\%$

bestimmt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen T-cap-KO und Kontrolle bezüglich der FR ($p=0,84$). Bezüglich der NCX-Aktivität, die sich durch die Zeitkonstante τ [s] aus dem *caffeine*-Protokoll darstellen lässt, konnte in der T-cap-KO Gruppe keine Veränderung gegenüber der WT-Kontrolle festgestellt werden (τ : WT $1,3\pm 0,2$ s vs. KO $1,7\pm 0,2$ s $p=0,13$; siehe Abb. 3.9.B).

3.2. Melusin-TG-Charakteristika

Die Epifluoreszenzmessung der drei hämodynamisch unterschiedlich belasteten Tiermodelle erfolgte zwei Wochen nach der Intervention bei Myokardinfarkt (MI) oder Aortenkonstriktion (TAC) sowie nach vier Wochen Schwimmen (Swim). Es wurden weibliche Tiere untersucht. Zur Kontrolle des Interventionseinflusses wurde eine Sham-OP durchgeführt. Die Sham-OP ist eine Scheinintervention. Hierbei wird die Operation durchgeführt ohne den Myokardinfarkt beziehungsweise die Aortenkonstriktion zu erzeugen. Die Sham-Kontrolle der Swim-Intervention stand in bauchhohem Wasser. In den Vorarbeiten von DE ACETIS et al. (2005) konnte das Melusin-TG-Modell unter Basalbedingungen (ohne Intervention) als nicht unterschiedlich zum WT-Sham dargestellt werden.

3.2.1. Ergebnis der Myokardinfarkt-Intervention (MI)

Folge der MI-Intervention ist eine systolische Ventrikelfunktionsstörung durch den Verlust von Myokard. Dieser wurde künstlich erzeugt, indem die linke Koronararterie unterbunden wurde, so dass ein circa 40 %-Ausfall des linksventrikulären Myokards entstand. Die Verwendung von operierten Mäusen ist eine etablierte Methode in der Herzforschung (TARNAVSKI et al. 2004). Die Messung erfolgte an Einzelzellen des linksventrikulären nicht-infarzierten Myokards.

Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=57$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=57$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=56$; für den WT-MI $n=46$ und für den TG-MI $n=55$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=43$; für den WT-MI $n=34$ und für den TG-MI $n=25$ gemessen. In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigten sich bei 1 Hz; 2 Hz; 4 Hz und 8 Hz zur diastolischen Sarkomerlänge keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-MI bzw. WT-MI vs. TG-MI (siehe Tab. 3.9.). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Interventions- bzw. Genotypgruppen (Anova RM $p>0,05$).

Sarkomerlänge in μm		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	1,72 \pm 0,01	1,72 \pm 0,01	1,70 \pm 0,01	1,67 \pm 0,01	
	Anzahl	58	58	56	43	
WT-MI	Mittelwerte \pm SEM	1,72 \pm 0,01	1,71 \pm 0,01	1,70 \pm 0,01	1,67 \pm 0,01	
	Anzahl	48	48	46	34	
TG-MI	Mittelwerte \pm SEM	1,73 \pm 0,01	1,73 \pm 0,01	1,71 \pm 0,01	1,68 \pm 0,01	
	Anzahl	57	57	55	25	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-MI		0,76	0,72	0,78	0,91	0,76
WT-MI vs TG-MI		0,24	0,27	0,30	0,61	0,24

Tab. 3.9.

Dargestellt sind die diastolischen Sarkomerlängen der FF in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz. Es zeigten sich kein signifikanter Unterschied in der Sarkomerlänge bei der Intervention WT-MI vs. Kontrolle WT-Sham. Der Genotyp TG-MI unterscheidet sich nicht signifikant vom WT-MI.

Der Ca^{2+} -Transient F/F_0 der FF wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=58$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=58$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=56$; für den WT-MI $n=46$ und für den TG-MI $n=56$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=43$; für den WT-MI $n=34$ und für den TG-MI $n=26$ gemessen.

In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigten sich bei 1 Hz; 2 Hz; 4 Hz und 8 Hz zu den Ca^{2+} -Transienten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-MI bzw. dem Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI (F/F_0 1 Hz: WT-Sham $2,6\pm 0,1 F/F_0$ vs. WT-MI $2,6\pm 0,1 F/F_0$ $p=0,74$ bzw. WT-MI vs. TG-MI $2,7\pm 0,1 F/F_0$ $p=0,76$; siehe Abb. 3.10.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-MI (Anova RM $p=0,39$) bzw. Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI (Anova RM $p=0,94$). Die Ca^{2+} -Transienten jeder einzelnen Gruppe fallen mit zunehmender Frequenz signifikant ab (Post-Hoc $p<0,05$).

Die Zellverkürzung (*shortening*) wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=57$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=57$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=56$; für den WT-MI $n=46$ und für den TG-MI $n=55$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=43$; für den WT-MI $n=34$ und für den TG-MI $n=25$ gemessen. In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigte sich bei 2 Hz und 4 Hz eine signifikant verstärkte Kontraktion im WT-MI vs. WT-Sham (2 Hz: WT-Sham $3,4\pm 0,3$ %RZL vs. WT-MI $4,6\pm 0,4$ %RZL $p=0,01$ Post-Hoc $p<0,05$; 4 Hz: WT-Sham $3,4\pm 0,3$ %RZL vs. WT-MI $4,8\pm 0,4$ %RZL $p=0,01$ Post-Hoc $p<0,05$; siehe Abb. 3.10.B). Bei 1 Hz und 8 Hz konnte dieser Unterschied nicht im Interventionstier WT-MI nachgewiesen werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle

Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-MI vs. WT-Sham (Anova RM $p=0,02$).

In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigten sich bei 2 Hz eine signifikant verstärkte Kontraktion im Genotypvergleich TG-MI vs. WT-MI (2 Hz: WT-MI vs. TG-MI $5,7\pm 0,4$ %RZL $p=0,046$ Post-Hoc $p<0,05$ siehe Abb. 3.10.B). Bei 1 Hz; 4 Hz und 8 Hz konnte dieser Unterschied nicht gefunden werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg eine tendenziell verbesserte Kontraktion im TG-MI vs. WT-MI (Anova RM $p=0,06$).

In der Abb. 3.11 dargestellte Originalregistrierungen der Epifluoreszenz für die Ca^{2+} -Transienten und das *shortening* verdeutlichen die stärkere Kontraktion im MI Interventionstier bei gleichgroßem Ca^{2+} -Transienten.

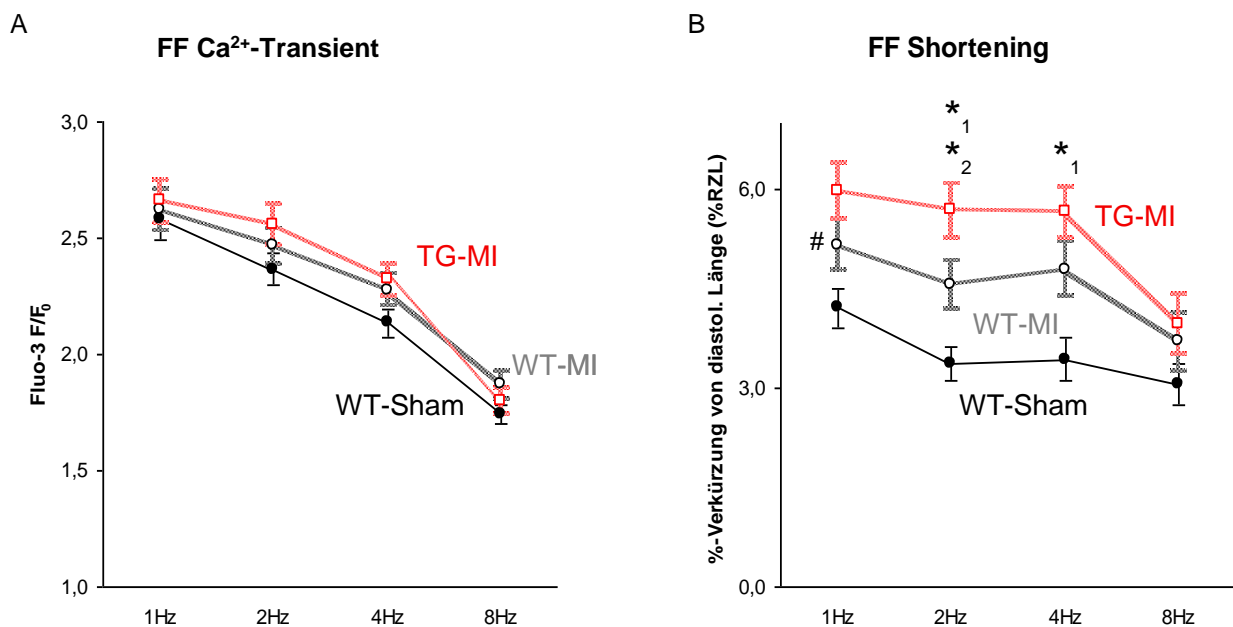


Abb. 3.10. A/B

Dargestellt sind die Ca^{2+} -Transienten und das *shortening* aus der FF. Der Interventionsvergleich erfolgte durch die Gegenüberstellung vom WT-Sham (schwarz) vs. WT-MI (schwarz schraffiert). Der Genotypvergleich erfolgte durch die Gegenüberstellung vom WT-MI (schwarz schraffiert) vs. TG-MI (rot schraffiert).

(A) Die Ca^{2+} -Transienten zeigten keinen signifikanten Unterschied in der MI-Interventions- bzw. der Genotypgruppe in den Einzelfrequenzen sowie über alle Einzelfrequenzen hinweg ($p>0,05$; Anova RM $p>0,05$).

(B) Das *shortening* ist signifikant verstärkt in den MI-Interventionstieren gegenüber dem WT-Sham bei 2 Hz und 4 Hz (*¹ signifikant WT-Sham vs. WT-MI $p<0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich in der Interventionsgruppe WT-MI eine signifikant verstärkte Kontraktion vs. WT-Sham (# Anova RM $p<0,05$). Im Genotypvergleich ist das *shortening* im TG-MI signifikant verstärkt gegenüber dem WT-MI bei 2 Hz (*² signifikant WT-MI vs. TG-MI $p<0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg im TG-MI eine tendenziell verstärkte Kontraktion vs. WT-MI (Anova RM $p=0,06$).

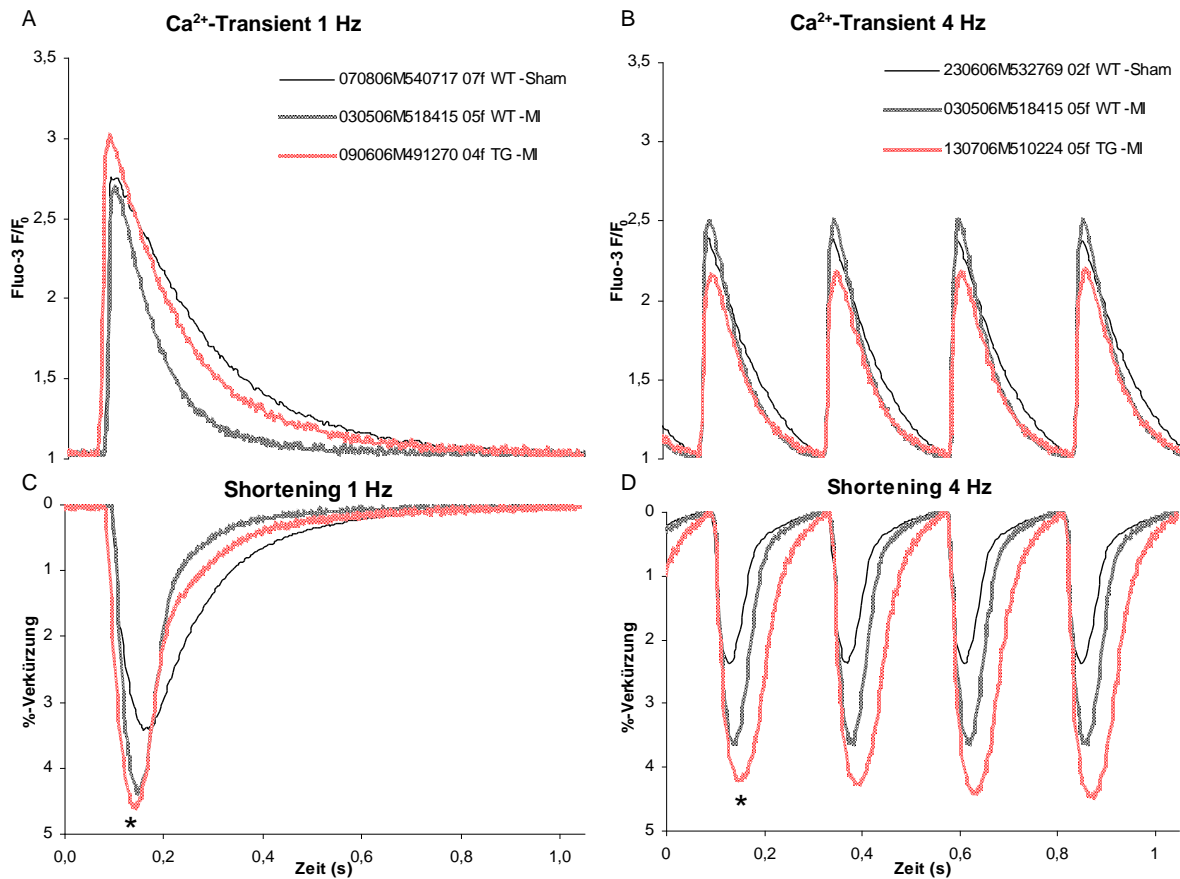


Abb. 3.11. A/ B/ C/ D

Dargestellt sind die originalregistrierten Ca^{2+} -Transienten und *shortening* der Epifluoreszenzmessung für 1 Hz (A und C) und 4 Hz (B und D). Das verbesserte *shortening* im MI-Interventionstier (* Anova RM $p < 0,05$) bei gleichgroßem Ca^{2+} -Transienten sowie die tendenziell stärkere Kontraktion im Genotyp Melusin-TG (Anova RM $p = 0,055$).

Die Relaxationsparameter rt_{50} , rt_{80} und rt_{90} wurden nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=58$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=58$; für den WT-MI $n=48$ und für den TG-MI $n=58$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=56$; für den WT-MI $n=46$ und für den TG-MI $n=56$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=43$; für den WT-MI $n=34$ und für den TG-MI $n=26$ gemessen.

Hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich der MI-Interventionsgruppe vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Infarkts erkannt werden. Der Abfall des Ca^{2+} -Transienten ist signifikant schneller im Interventionsvergleich WT-MI vs. WT-Sham (siehe Tab. 3.10.; siehe Abb. 3.12.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-MI (Anova RM $p < 0,001$).

Im Genotypvergleich unterscheidet sich der TG-MI hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} in den Einzelfrequenzen nicht signifikant von der Kontrolle WT-MI (siehe Tab. 3.10.; siehe Abb. 3.12.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle

Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI (Anova RM $p=0,52$).

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	235,5 \pm 8,4	189,9 \pm 4,8	126,0 \pm 1,7	73,7 \pm 0,5
	Anzahl	58	58	56	43
WT-MI	Mittelwerte \pm SEM	192,8 \pm 8,9	159,3 \pm 5,7	111,3 \pm 2,5	69,9 \pm 0,7
	Anzahl	48	48	46	34
TG-MI	Mittelwerte \pm SEM	203,0 \pm 7,2	167,0 \pm 4,6	116,7 \pm 1,9	70,9 \pm 0,6
	Anzahl	57	57	55	25

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-MI	0,0007	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001
WT-MI vs TG-MI	0,37	0,29	0,09	0,30	0,52

Tab. 3.10.

Tabellarische Darstellung der Ca²⁺-Eliminationszeit rt_{80} im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-MI und dem Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI.

Die Relaxationszeit rt_{80} konnte in den Einzelfrequenzen bei 1 Hz und 2 Hz die MI-Interventionsgruppen signifikant schneller zur Kontrolle WT-Sham gemessen werden. Dieser Unterschied zeigte sich in den höheren Frequenzen nicht (1 Hz: WT-Sham 188,5 \pm 13,4 ms vs. WT-MI 148,1 \pm 13,3 ms $p=0,04$ Post-Hoc $p<0,05$; 2 Hz: WT-Sham 154,4 \pm 7,8 ms vs. WT-MI 122,4 \pm 8,8 ms $p=0,01$ Post-Hoc $p<0,05$; siehe Tab. 3.11.; siehe Abb. 3.12.B.). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-MI (Anova RM $p=0,045$).

Relaxationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	188,5 \pm 13,4	154,4 \pm 7,8	92,8 \pm 4,4	53,3 \pm 2,0
	Anzahl	58	58	56	43
WT-MI	Mittelwerte \pm SEM	148,1 \pm 13,3	122,4 \pm 8,8	81,2 \pm 4,5	51,2 \pm 1,8
	Anzahl	48	48	46	34
TG-MI	Mittelwerte \pm SEM	129,4 \pm 9,1	107,4 \pm 7,1	72,2 \pm 3,7	49,8 \pm 1,5
	Anzahl	57	57	55	25

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-MI	0,04	0,01	0,07	0,46	0,045
WT-MI vs TG-MI	0,24	0,18	0,12	0,56	0,12

Tab. 3.11.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{80} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-MI und den Genotypen WT-MI vs. TG-MI. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Relaxationszeit rt_{80} im Interventionstier WT-MI vs. WT-Sham bei 1 Hz und 2 Hz. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-MI vs. WT-Sham ($p<0,05$). Kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich TG-MI vs. WT-MI.

Für die Relaxationzeit rt_{80} konnte in den Einzelfrequenzen 1 Hz bis 8 Hz kein signifikanter Unterschied im Genotypenvergleich zwischen WT-MI und dem TG-MI gefunden werden (siehe Tab. 3.11.; siehe Abb. 3.12.B.). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-MI vs. TG-MI (Anova RM $p=0,12$).

Die Daten und Graphen der Relaxationsparameter rt_{50} und rt_{90} für die Ca^{2+} -Eliminationszeit und Relaxationszeit sind im Anhang 5.2.1.1. und 5.2.1.2. zu finden. Diese liefern vergleichbare Aussagen zu den dargestellten Relaxationsparametern rt_{80} .

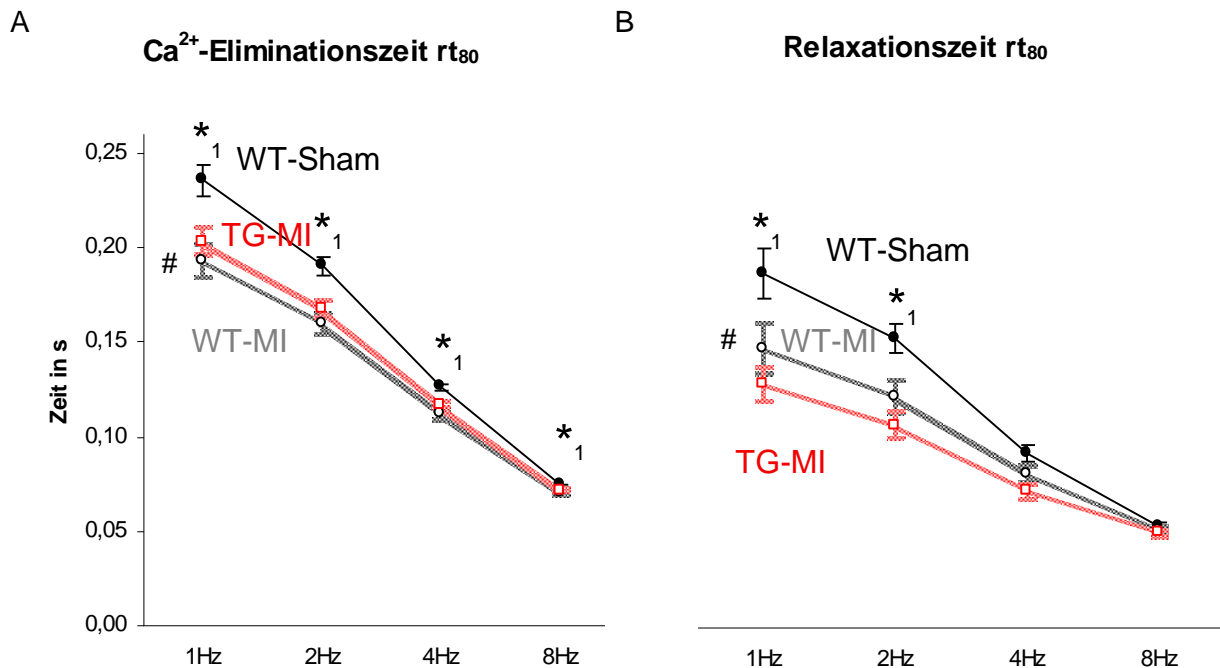


Abb. 3.12. A/B

(A) Bezüglich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} unterscheidet sich die MI-Intervention signifikant von der Kontrolle WT-Sham in den Einzelfrequenzen 1-8 Hz (*¹ signifikant WT-Sham vs. WT-MI $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich im Interventionstier WT-MI eine signifikant verkürzte Ca^{2+} -Eliminationszeit vs. WT-Sham (# signifikant Anova RM $p < 0,05$). Der Genotyp Melusin-TG unterscheidet sich nicht signifikant in der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} .

(B) Die Relaxationszeit rt_{80} ist im MI-Interventionstier signifikant schneller bei 1 und 2 Hz (*¹ WT-Sham vs. WT-MI $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich im Interventionstier WT-MI eine signifikant verkürzte Relaxationszeit vs. WT-Sham (# signifikant Anova RM $p < 0,05$). Der Genotyp Melusin-TG unterscheidet sich nicht signifikant in der Relaxationszeit rt_{80} .

Im PR-Protokoll wurde die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's untersucht. Für das PR 10 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=54$; für den WT-MI $n=41$ und für den TG-MI $n=49$; für das PR 30 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=36$; für den WT-MI $n=24$ und für den TG-MI $n=34$; für das PR 60 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=26$; für den WT-MI $n=14$ und für den TG-MI $n=25$ gemessen.

Das PR 10 und PR 30 ist signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz ($p < 0,05$). Die prozentuale Änderung zur Ausgangslage stellt sich bei der PR 10 wie folgt dar: WT-Sham $122,2 \pm 1,6$ %; WT-MI $118,8 \pm 1,9$ % und im TG-MI $117,2 \pm 1,7$ %. Die prozentuale Änderung zur Ausgangslage stellt sich bei der PR 30 wie folgt dar: WT-Sham $137,9 \pm 2,9$ %; WT-MI $122,0 \pm 3,4$ % und im TG-MI $128,4 \pm 3,5$ %. Das PR 10 und PR 30 unterscheidet sich nicht signifikant im Interventions- und Genotypvergleich (PR 10 F/F_0 : WT-Sham $3,3 \pm 0,1$ F/F_0 vs. WT-MI $3,2 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,63$; WT-MI vs. TG-MI $3,2 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,96$; PR 30 F/F_0 : WT-Sham $3,5 \pm 0,2$ F/F_0 vs. WT-MI $3,1 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,09$; WT-MI vs. TG-MI $3,5 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,21$; siehe Abb. 3.13.). Die PR 60 ist im Anhang 5.2.1.3. dargestellt.

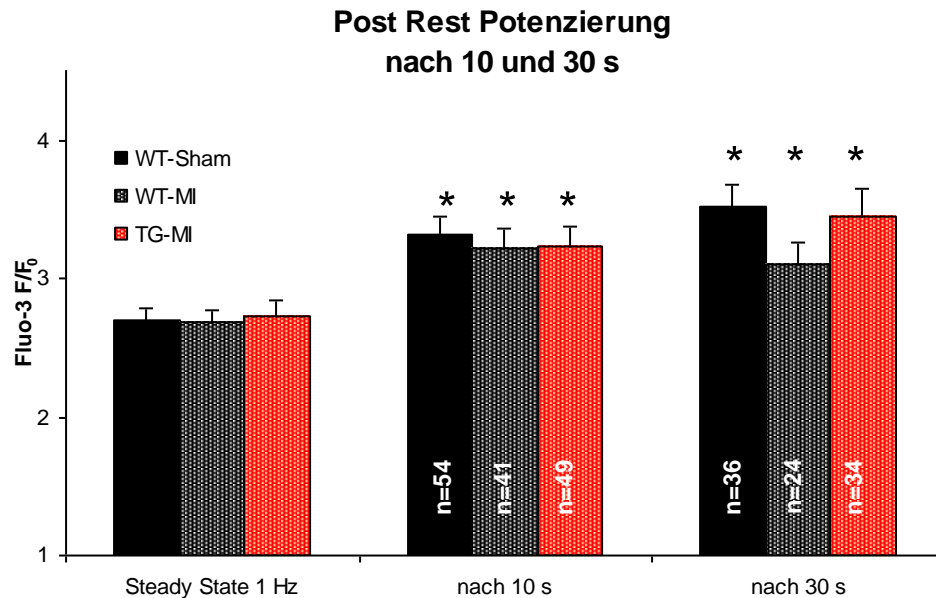


Abb. 3.13.

Darstellung PR 10 und PR 30. Die Ca^{2+} -Transienten sind signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz (* $p < 0,05$). Das PR 10 und PR 30 der Interventionstiere WT-MI unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrolle WT-Sham ($p > 0,05$). Das PR 10 und PR 30 des Genotyps TG-MI unterscheidet sich nicht signifikant zur Kontrolle WT-MI ($p > 0,05$).

Im *caffeine*-Protokoll wurde für den WT-Sham eine Anzahl von $n=40$, für den WT-MI $n=33$ und im TG-MI $n=49$ gemessen. Das *caffeine*-Protokoll zur Messung von SR- Ca^{2+} -Gehalt, NCX-Funktion und FR ergab folgende Ergebnisse: Die MI-Intervention unterscheidet sich nicht in der Amplitude des *caffeine*-induzierten Ca^{2+} -Transienten, welcher den SR- Ca^{2+} -Gehalt bestimmt (F/F_0 WT-Sham $4,2 \pm 0,2$ vs. WT-MI $3,8 \pm 0,2$ $p=0,10$; WT-MI vs. TG-MI $3,8 \pm 0,1$ $p=0,88$; siehe Abb. 3.14.A). Das FR konnte im WT-Sham mit $68,6 \pm 1,9\%$, im WT-MI mit $79,8 \pm 1,9\%$ und im TG-MI mit $81,5 \pm 1,7\%$ dargestellt werden. Das FR ist im Interventionsvergleich WT-MI signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle WT-Sham ($p < 0,001$ siehe Abb. 3.14.C). Das FR ist im Interventionstier TG-MI signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle WT-Sham ($p < 0,001$ siehe Abb. 3.14.C). Der Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI zeigte keinen signifikanten Unterschied im FR ($p=0,52$; siehe Abb. 3.14.C). Die NCX-Funktion wird durch die Zeitkonstante τ [s] ermittelt. Im WT-Sham war τ $1,5 \pm 0,1$ s, im WT-MI $1,1 \pm 0,1$ s und im TG-MI $1,3 \pm 0,1$ s. Im Interventionstier WT-MI war τ mit $1,1 \pm 0,1$ s signifikant vermindert gegenüber der Kontrolle WT-Sham ($p=0,01$; siehe Abb. 3.14.B). Im Interventionstier TG-MI $1,3 \pm 0,1$ s konnte τ vermindert, jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle WT-Sham dargestellt werden ($p=0,08$; siehe Abb. 3.14.B). Im Genotypvergleich konnte die τ -Funktion nicht signifikant unterschiedlich festgestellt werden (TG-MI vs. WT-MI $p=0,14$; siehe Abb. 3.14.B). Hiermit konnte eine signifikant erhöht NCX-Funktion nur in den Interventionsgruppen (WT-MI und TG-MI) gegenüber der Kontrolle WT-Sham dargestellt werden.

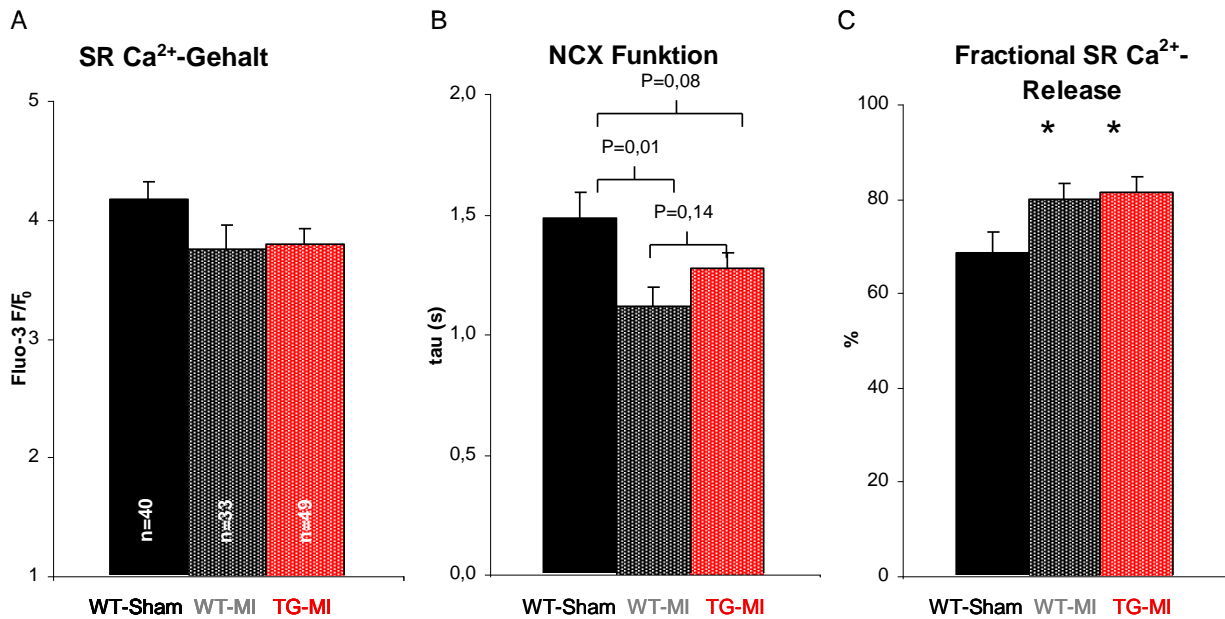


Abb. 3.14. A/ B/ C

(A) Der SR-Ca²⁺-Gehalt ist in den Interventionsgruppen leicht, jedoch nicht signifikant vermindert (WT-Sham vs. WT-MI, bzw. vs. TG-MI p>0,05). Der Genotyp TG-MI unterscheidet sich nicht von der Kontrolle WT-MI (p>0,05). (B) Die Aktivität des NCX's ist den Interventionsgruppen vs. Kontrolle WT-Sham erhöht, im WT-MI signifikant (p<0,05). Der Genotyp TG-MI unterscheidet sich nicht von der Kontrolle WT-MI (p>0,05). (C) Das FR ist in den Interventionsgruppen signifikant erhöht (* signifikant WT-Sham vs. WT-MI p<0,001; bzw. vs. TG-MI p<0,001). Der Genotyp TG-MI unterscheidet sich nicht von der Kontrolle WT-MI (p>0,05).

3.2.2. Ergebnis der Intervention Aortenkonstriktion (TAC)

Die stenosierte Aorta wurde operativ durch die Ligatur der Aortenwurzel erreicht. Hierdurch wird ein Modell mit supra-avalvulärer Aortenkonstriktion erzeugt, das eine Druckbelastung für das linksventrikuläre Myokard darstellt. Die *transversal aortic coarctation* (TAC)-Intervention ist ein pathophysiologisches Modell der hämodynamischen Belastung (TARNAVSKI et al. 2004). Die Untersuchung der weiblichen Tiere erfolgte zwei Wochen nach TAC-Intervention. Die Sarkomerlängen wurden nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet (siehe Tab. 3.12.).

Sarkomerlänge in µm		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	1,76±0,01	1,75±0,01	1,74±0,01	1,72±0,01
	Anzahl	49	49	48	31
WT-TAC	Mittelwerte±SEM	1,74±0,01	1,73±0,01	1,72±0,01	1,72±0,01
	Anzahl	49	49	47	24
TG-TAC	Mittelwerte±SEM	1,71±0,01	1,71±0,01	1,69±0,01	1,67±0,02
	Anzahl	55	54	51	28

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC	0,04	0,046	0,06	0,81	0,08
WT-TAC vs TG-TAC	0,04	0,054	0,03	0,02	0,02

Tab. 3.12.

Tabelle für die diastolische Sarkomerlänge in den Frequenzen 1-8 Hz der FF. Signifikant reduzierte Sarkomere bei 1-2 Hz in der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte im Interventionstier WT-MI kein signifikanter Unterschied vs. WT-Sham (Anova RM p<0,05). Im Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC bei 1; 4 und 8 Hz signifikant reduzierte Sarkomerlänge. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied im Genotyp TG-TAC vs. WT-TAC (Anova RM p<0,05).

In den Einzelfrequenzen der FF von 1-8 Hz konnten signifikant reduzierte Sarkomere bei 1-2 Hz in der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham dargestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-TAC vs. WT-Sham (Anova RM $p=0,08$). Im Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC konnten in den Einzelfrequenzen 1; 4 und 8 Hz signifikant reduzierte Sarkomerlängen nachgewiesen werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg ein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC (Anova RM $p=0,02$).

Der Ca^{2+} -Transient der FF wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=49$; für den WT-TAC $n=49$ und für den TG-TAC $n=55$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=49$; für den WT-TAC $n=49$ und für den TG-TAC $n=54$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=48$; für den WT-TAC $n=47$ und für den TG-TAC $n=52$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=31$; für den WT-TAC $n=24$ und für den TG-TAC $n=29$ gemessen.

Die Ca^{2+} -Transienten der FF zeigten von 1 bis 8 Hz keine signifikanten Unterschiede im Interventionsvergleich zwischen WT-Sham vs. WT-TAC bzw. dem Genotypvergleich WT-TAC vs. TG-TAC (F/F_0 1 Hz: WT-Sham $2,3\pm 0,1$ F/F_0 vs. WT-TAC $2,3\pm 0,1$ F/F_0 $p=0,62$ bzw. WT-TAC vs. TG-TAC $2,2\pm 0,1$ F/F_0 $p=0,43$; F/F_0 ; siehe Abb. 3.15.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-TAC (Anova RM $p=0,34$) und dem Genotypvergleich WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p=0,65$).

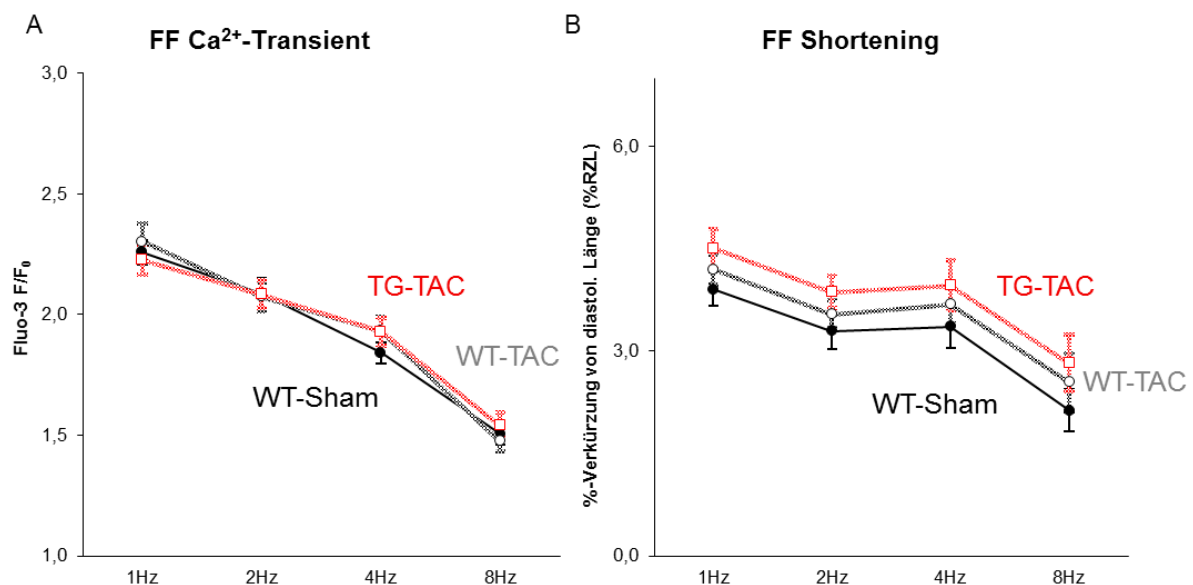


Abb. 3.15. A/B

Dargestellt sind die Ca^{2+} -Transienten (A) und das *shortening* (B) in den Einzelfrequenzen der FF im TAC-Modell. Der Interventionsvergleich WT-TAC vs. WT-Sham sowie der Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied in den benannten Gruppen (Anova RM $p>0,05$).

Die Zellverkürzung wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=49; für den WT-TAC n=49 und für den TG-TAC n=55; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=49; für den WT-TAC n=49 und für den TG-TAC n=54; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=48; für den WT-TAC n=47 und für den TG-TAC n=51; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=31; für den WT-TAC n=24 und für den TG-TAC n=28 gemessen. Das *shortening* zeigte in allen Einzelfrequenzen des FF-Protokolls keine signifikanten Unterschiede im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-TAC bzw. dem Genotypvergleich WT-TAC vs. TG-TAC (F/F0 1 Hz: WT-Sham $3,9 \pm 0,2$ %RZL vs. WT-TAC $4,2 \pm 0,2$ %RZL $p=0,38$ bzw. WT-TAC vs. TG-TAC $4,5 \pm 0,3$ %RZL $p=0,40$; siehe Abb. 3.15.B). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-TAC und dem Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC (Anova RM $p=0,29$ bzw. WT-TAC vs. TG-TAC Anova RM $p=0,34$).

Die 80 %-Relaxation (rt_{80}) zeigte bezüglich der Ca^{2+} -Elimination folgende Werte:

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	261,0 \pm 10,0	199,6 \pm 5,8	127,8 \pm 2,8	75,7 \pm 0,8	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte \pm SEM	242,6 \pm 13,6	183,7 \pm 8,0	123,8 \pm 3,1	72,1 \pm 3,2	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte \pm SEM	225,1 \pm 10,4	180,3 \pm 6,3	122,1 \pm 2,7	72,2 \pm 1,0	
	Anzahl	55	54	52	29	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,28	0,11	0,33	0,23	0,23
WT-TAC vs TG-TAC		0,30	0,74	0,69	0,97	0,47

Tab. 3.13

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-TAC und den Genotypen WT-TAC vs. TG-TAC. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p>0,05$).

Hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-TAC mit dem WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge der Aortenkonstriktion erkannt werden (siehe Tab. 3.13; siehe Abb. 3.16.A). Hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich des Genotyps TG-TAC vs. WT-TAC in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz erkannt werden (siehe Tab. 3.13; siehe Abb. 3.16.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-TAC (Anova RM $p=0,23$) bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p=0,47$).

Die 80 %-Relaxation (rt_{80}) der Zellverkürzung zeigte folgende Werte:

Relaxationszeit S rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	168,7 \pm 12,0	138,6 \pm 8,6	86,5 \pm 4,3	55,9 \pm 1,3	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte \pm SEM	171,5 \pm 14,0	138,9 \pm 8,5	82,5 \pm 4,3	50,5 \pm 1,9	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte \pm SEM	172,4 \pm 14,0	139,6 \pm 9,1	78,2 \pm 4,6	51,3 \pm 1,7	
	Anzahl	55	54	51	28	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,88	0,98	0,51	0,02	0,96
WT-TAC vs TG-TAC		0,96	0,96	0,50	0,78	0,79

Tab. 3.14.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{80} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-TAC und dem Genotypen WT-TAC vs. TG-TAC. In der Einzelfrequenz von 8 Hz zeigte sich eine signifikant schnellere Relaxation im WT-TAC vs. WT-Sham ($p < 0,05$). In den Einzelfrequenzen von 1-4 Hz zeigte sich keine signifikant schnellere Relaxation im WT-TAC vs. WT-Sham. Bezüglich des Genotyps zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der rt_{80} der Zellverkürzung ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p > 0,05$).

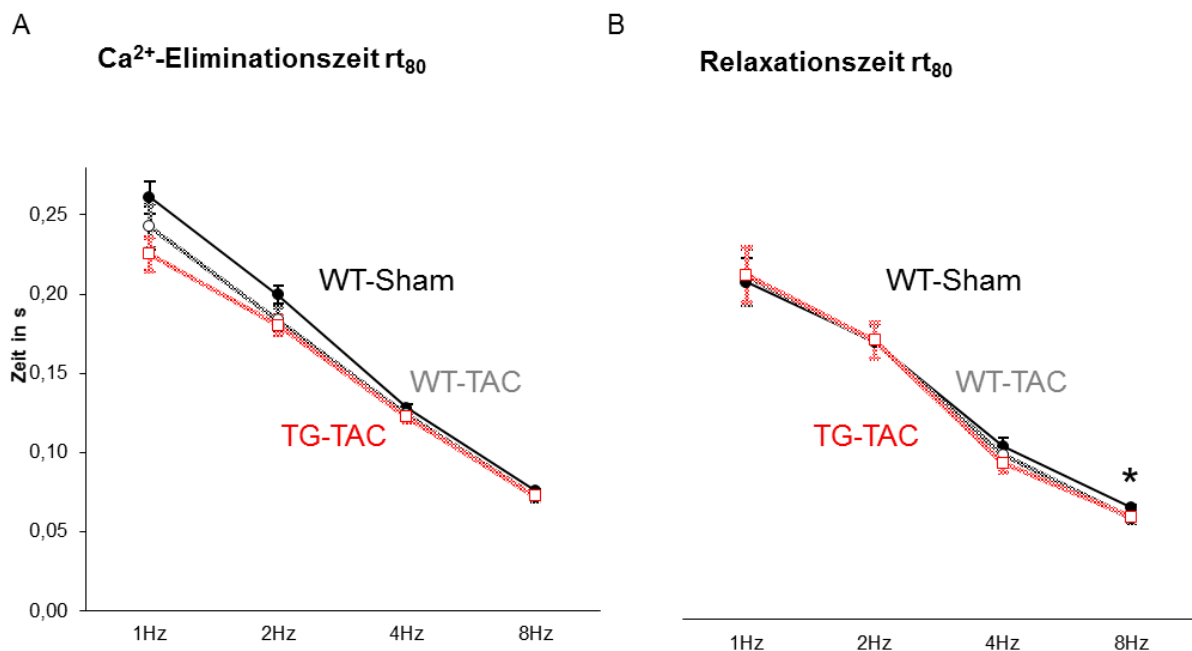


Abb. 3.16. A/B

Darstellung der Relaxationsparameter rt_{80} für die Ca^{2+} -Elimination und Relaxationszeit.

(A) Im Vergleich der Einzelfrequenzen zeigte sich in der Ca^{2+} -Elimination kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich und Genotypvergleich.

(B) Im Vergleich der Einzelfrequenzen zeigte sich bei 8 Hz eine signifikant schnellere Relaxation der Zellverkürzung im Interventionstier WT-TAC vs. WT-Sham (* WT-Sham vs. WT-TAC $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen 1-4 Hz. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p > 0,05$).

Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{80} zeigte sich bei der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham bei 8 Hz eine signifikant schnellere Relaxation ($p < 0,02$; siehe Abb. 3.16.B). In den niedrigeren Frequenzen 1-4 Hz zeigte sich diese Verkürzung nicht signifikant im WT-TAC vs. WT-Sham. Im Genotypvergleich der Relaxationszeit rt_{80} zwischen WT-TAC vs. TG-TAC konnte in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz keine signifikante Veränderung dargestellt werden. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle

Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC (Anova RM $p=0,96$) bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p=0,79$; siehe Abb. 3.16.B).

Die rt_{50} und rt_{90} Werte für Ca^{2+} -Elimination und Relaxation der Zellverkürzung sind im Anhang 5.2.2.1 und 5.2.2.2. dargestellt. Diese zeigen vergleichbare Werte zu den Relaxationsparametern rt_{80} .

Im PR-Protokoll wurde für das PR 10 im WT-Sham eine Anzahl von $n=34$; für den WT-TAC $n=41$ und für den TG-TAC $n=45$ gemessen. Für das PR 30 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=33$; für den WT-TAC $n=27$ und für den TG-TAC $n=31$ gemessen. Für das PR 60 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=30$; für den WT-TAC $n=21$ und für den TG-TAC $n=19$ gemessen.

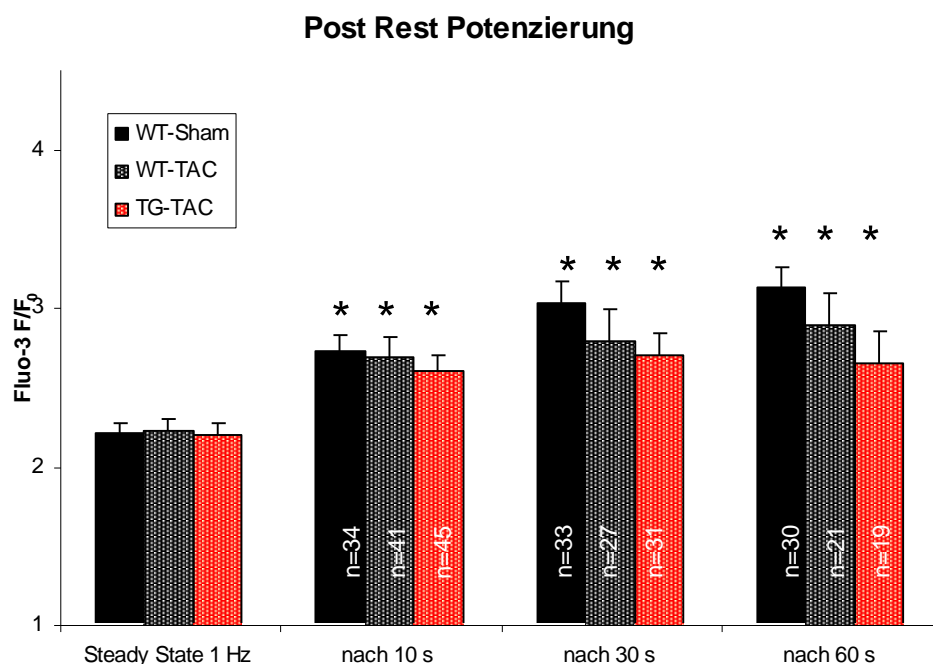


Abb. 3.17.

Darstellung der Ca^{2+} -Transienten des PR-Protokolls. Die Ca^{2+} -Transienten nach der Pause sind signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz (* $p<0,05$). Die PR 10; 30 und 60 unterscheiden sich im Interventionsvergleich WT-TAC vs. WT-Sham und im Genotypvergleich TG-MI vs. WT-MI nicht signifikant ($p>0,05$).

Die Ca^{2+} -Transienten der PR 10; 30 und 60 sind signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz ($p<0,05$). Die PR 10; 30 und 60 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-TAC und dem Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC (PR 10 F/F_0 : WT-Sham $2,7\pm 0,1 F/F_0$ vs. WT-TAC $2,7\pm 0,1 F/F_0$ $p=0,84$; WT-TAC vs. TG-TAC $p=0,58$; PR 30 F/F_0 : WT-Sham $3,0\pm 0,1 F/F_0$ vs. WT-TAC $2,8\pm 0,2 F/F_0$ $p=0,32$; WT-TAC vs. TG-TAC $p=0,69$; PR 60 F/F_0 : WT-Sham $3,1\pm 0,1 F/F_0$ vs. WT-TAC $2,9\pm 0,2 F/F_0$ $p=0,29$; WT-TAC vs. TG-TAC $p=0,39$; siehe Abb. 3.17).

Die prozentuale Änderung zur Ausgangslage bei 1 Hz stellte sich in der PR 10 wie folgt dar: WT-Sham $123,5\pm 2,6\%$; WT-TAC $120,8\pm 2,9\%$ und im TG-TAC $117,2\pm 2,4\%$. In der PR 30

wie folgt: WT-Sham $137,2 \pm 3,8$ %; WT-TAC $132,6 \pm 5,4$ % und im TG-TAC $122,2 \pm 3,2$ %, und in der PR 60 wie folgt: WT-Sham $143,7 \pm 4,1$ %; WT-TAC $135,9 \pm 5,3$ % und im TG-TAC $124,6 \pm 5,3$ % (siehe Abb. 3.18).

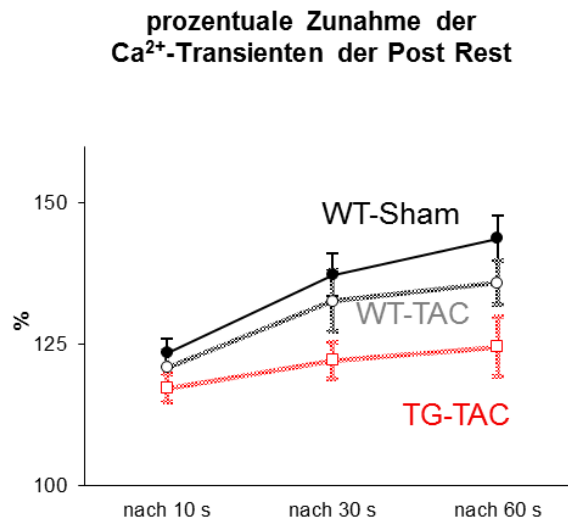


Abb. 3.18.

Darstellung der prozentualen Zunahme der Amplitude der Ca²⁺-Transienten während des PR –Protokolls gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz.

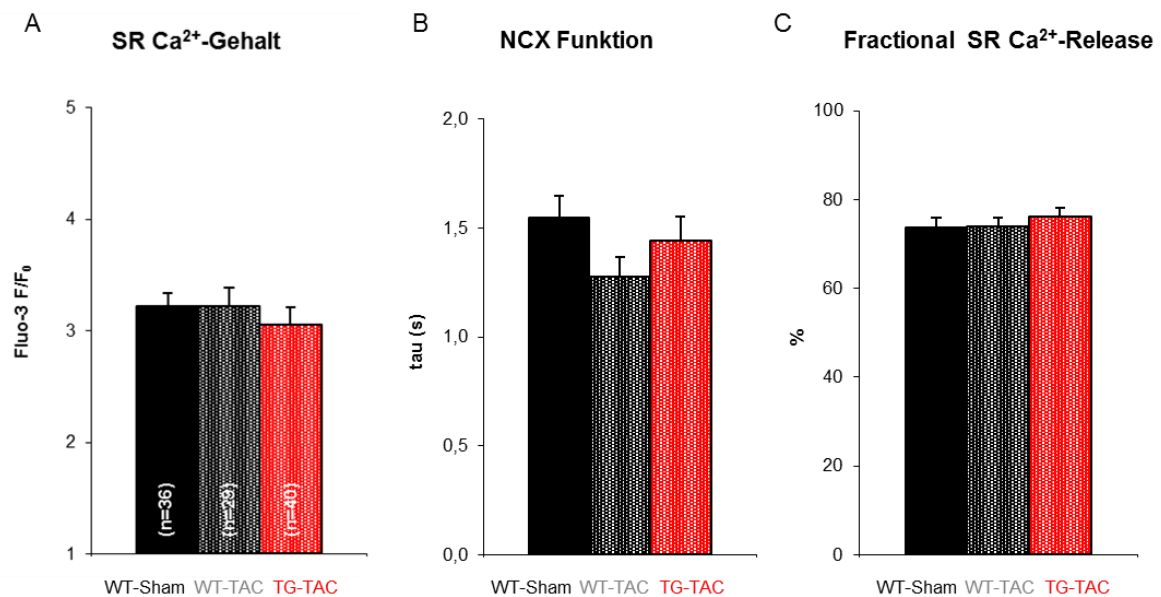


Abb. 3.19 A/ B/ C

(A) Der SR-Ca²⁺-Gehalt zeigte sich im Interventionsvergleich und im Genotypvergleich nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$).

(B) Die Aktivität des NCX's ist tendenziell erhöht in der Interventionsgruppe WT-TAC vs. Kontrolle WT-Sham, jedoch nicht signifikant ($p = 0,051$). Der Genotyp TG-TAC unterscheidet sich in der Aktivität des NCX's von der Kontrolle WT-TAC nicht signifikant ($p > 0,05$).

(C) Das FR ist nicht signifikant verändert im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-TAC und dem Genotypvergleich WT-TAC vs. TG-TAC ($p > 0,05$).

Im *caffeine*-Protokoll konnte für den WT-Sham eine Anzahl von $n=36$, für den WT-TAC $n=29$ und im TG-MI $n=40$ gemessen werden. Die TAC-Intervention unterscheidet sich nicht in der Amplitude des *caffeine*-induzierten Ca²⁺-Transienten, welcher den SR-Ca²⁺-Gehalt bestimmt (F/F_0 WT-Sham $3,2 \pm 0,1$ F/F_0 vs. WT-TAC $3,2 \pm 0,2$ F/F_0 $p = 0,99$; WT-TAC vs. TG-TAC $3,1 \pm 0,2$

F/F₀ p=0,49; siehe Abb. 3.19.A). Das FR zeigte in der Interventionsgruppe WT-Sham 73,7±2,3 % vs. WT-TAC 73,8±2,0 % (p=0,97) und im Vergleich der Genotypen WT-TAC vs. TG-TAC 76,2±2,1 % (p=0,43) keine signifikanten Unterschiede (p>0,05; siehe Abb. 3.19.C). Die NCX-Funktion wird durch die Zeitkonstante τ [s] abgeschätzt. Sie zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Interventionsgruppen und im Vergleich der Genotypen (τ : WT-Sham 1,5±0,1 s vs. WT-TAC 1,3±0,1 s p=0,051; WT-TAC vs. TG-TAC 1,4±0,1 s p=0,26; siehe Abb. 3.19.B).

3.2.3. Ergebnis der trainierten Tiere (Swim)

Die trainierten Swim-Interventionstiere stellen eine physiologische Adaption des Herzmuskels an erhöhte Belastung dar (EVANGELISTA et al. 2003; DE BONO et al. 2006). Die Experimente zielten auf das Verständnis der Hypertrophiesignale und Involvierung von Melusin in den Prozess der physiologischen Adaption (benigne Adaption). Das Training erfolgte vier Wochen für die WT-Swim- und TG-Swim-Gruppe. Die Sham-Gruppe stand in bauchhohen zum Stehen geeigneten Bad, zum Ausschluss des Placeboeffekts (BEECHER, 1961).

Die Sarkomerlängen wurden nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet.

Sarkomerlänge in μm		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	1,74±0,01	1,74±0,01	1,72±0,01	1,68±0,01	
	Anzahl	53	53	53	31	
WT-Swim	Mittelwerte±SEM	1,75±0,01	1,75±0,01	1,73±0,01	1,70±0,01	
	Anzahl	65	65	64	33	
TG-Swim	Mittelwerte±SEM	1,75±0,01	1,74±0,01	1,72±0,01	1,68±0,01	
	Anzahl	49	49	49	28	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim		0,46	0,52	0,51	0,35	0,60
WT-Swim vs TG-Swim		0,76	0,82	0,47	0,24	0,53

Tab. 3.15.

Tabelle für die diastolische Sarkomerlänge in den Frequenzen 1-8 Hz der FF. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Intervention WT-Sham vs. WT-Swim und im Vergleich der Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim, sowohl in den Einzelfrequenzen (p>0,05) als auch über alle Einzelfrequenzen hinweg (Anova RM p>0,05).

Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=65 und für den TG-Swim n=49 gemessen werden. Für 2 Hz konnte im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=65 und für den TG-Swim n=49 gemessen werden. Für 4 Hz konnte im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=64 und für den TG-Swim n=49 gemessen werden. Für 8 Hz konnte im WT-Sham eine Anzahl von n=31; für den WT-Swim n=33 und für den TG-Swim n=28 gemessen werden.

In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigten sich bei 1 Hz; 2 Hz; 4 Hz und 8 Hz zur diastolischen Sarkomerlänge keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (siehe Tab. 3.15). Im 2-Wege-Anova für wiederholte

Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Interventions- bzw. den Genotypgruppen (Anova RM $p > 0,05$).

Der Ca^{2+} -Transient der FF wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=53$; für den WT-Swim $n=65$ und für den TG-Swim $n=49$; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=53$; für den WT-Swim $n=65$ und für den TG-Swim $n=49$; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=53$; für den WT-Swim $n=64$ und für den TG-Swim $n=48$; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=31$; für den WT-Swim $n=33$ und für den TG-Swim $n=27$ gemessen.

Die Ca^{2+} -Transienten des FF-Protokolls zeigten über alle Einzelfrequenzen keine signifikanten Unterschiede im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim und im Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim (F/F_0 1 Hz: WT-Sham $2,4 \pm 0,1 F/F_0$ vs. WT-Swim $2,5 \pm 0,1 F/F_0$ $p=0,80$ bzw. WT-Swim vs. TG-Swim $2,3 \pm 0,1 F/F_0$ $p=0,18$; siehe Abb. 3.20.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,15$) und dem Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,24$). Die Ca^{2+} -Transienten der WT-Sham fallen mit zunehmender Frequenz signifikant ab (Post-Hoc $p < 0,05$). Die Ca^{2+} -Transienten der WT-Swim und TG-Swim fallen mit zunehmender Frequenz nicht signifikant ab (Post-Hoc $p > 0,05$).

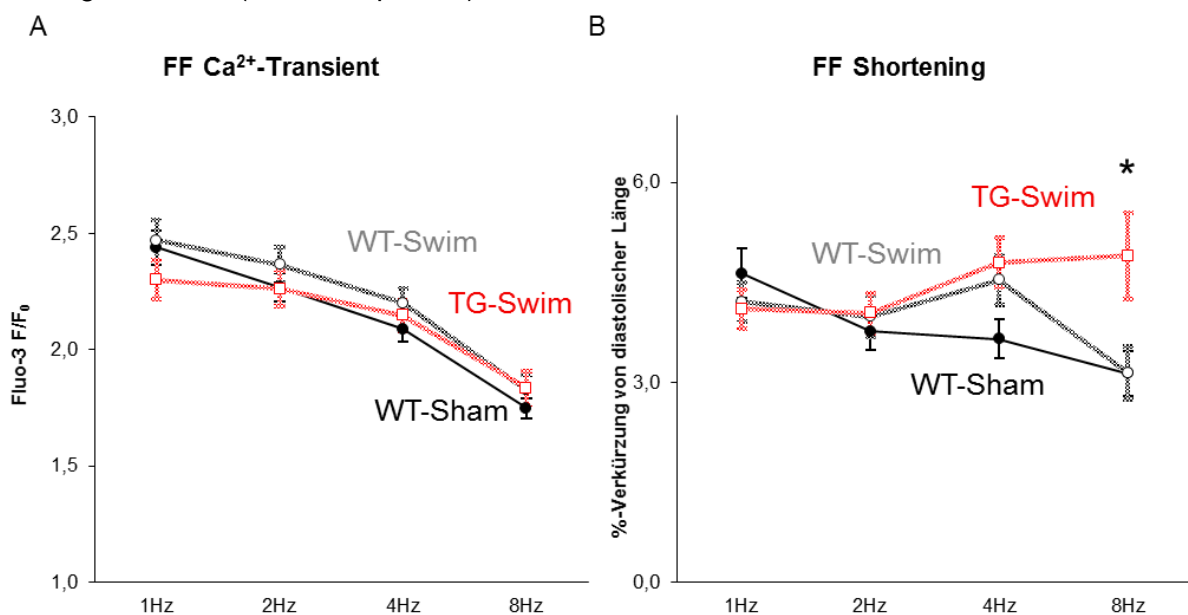


Abb. 3.20. A/B

(A) Dargestellt sind die Ca^{2+} -Transienten und das *shortening* aus dem FF-Protokoll. Die Ca^{2+} -Transienten wiesen keinen signifikanten Unterschied, im Vergleich der Intervention WT-Sham vs. WT-Swim und im Vergleich der Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim, sowohl in den Einzelfrequenzen ($p > 0,05$) als auch über alle Einzelfrequenzen hinweg (Anova RM $p > 0,05$) auf.

(B) Das *shortening* wies keinen signifikanten Unterschied zwischen der Intervention WT-Sham vs. WT-Swim in den Einzelfrequenzen ($p > 0,05$) und über alle Einzelfrequenzen hinweg auf (Anova RM $p > 0,05$). Das *shortening* wies von 1-4 Hz keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim auf ($p > 0,05$). Bei 8 Hz wies der Genotypvergleich für TG-Swim eine signifikant stärkere Kontraktion gegenüber der Kontrolle WT-Swim auf (* $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

Das *shortening* wurde nach den verschiedenen Frequenzen ausgewertet. Für 1 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=65 und für den TG-Swim n=49; für 2 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=65 und für den TG-Swim n=49; für 4 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=53; für den WT-Swim n=64 und für den TG-Swim n=49; für 8 Hz wurde im WT-Sham eine Anzahl von n=31; für den WT-Swim n=33 und für den TG-Swim n=28 gemessen.

In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigte sich von 1 bis 8 Hz kein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-Swim vs. WT-Sham (1 Hz: WT-Sham $4,6 \pm 0,4$ %RZL vs. WT-Swim $4,2 \pm 0,3$ %RZL $p=0,36$; siehe Abb. 3.20.B). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,44$).

In den Einzelfrequenzen des FF-Protokolls zeigte sich von 1 bis 4 Hz kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim (1 Hz: WT-Sham $4,6 \pm 0,4$ %RZL vs. TG-Swim $4,1 \pm 0,3$ %RZL $p=0,80$; 2 Hz: WT-Sham $3,8 \pm 0,3$ %RZL vs. TG-Swim $4,0 \pm 0,3$ %RZL $p=0,90$; 4 Hz: WT-Sham $3,7 \pm 0,3$ %RZL vs. TG-Swim $4,8 \pm 0,4$ %RZL $p=0,63$; siehe Abb. 3.20.A). In der Einzelfrequenz von 8 Hz zeigte sich eine signifikant stärkere Kontraktion im Genotyp TG-Swim vs. Kontrolle WT-Sham (8 Hz: WT-Sham $3,1 \pm 0,3$ %RZL vs. TG-Swim $4,9 \pm 0,7$ %RZL $p=0,02$ Post-Hoc $p<0,05$; siehe Abb. 3.20.A). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,15$). Das *shortening* nimmt in der Interventionsgruppe und dem Genotyp nicht über die gesamte Stimulationsfrequenz signifikant zu bzw. ab (Post-Hoc $p>0,05$).

Die 80 %-Relaxation (rt_{80}) der Ca^{2+} -Elimination zeigte folgende Werte:

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	221,1 \pm 7,5	181,7 \pm 4,6	122,8 \pm 2,1	72,9 \pm 0,7	
	Anzahl	53	53	53	31	
WT-Swim	Mittelwerte \pm SEM	218,5 \pm 7,2	176,7 \pm 5,1	118,6 \pm 2,0	71,3 \pm 0,8	
	Anzahl	65	65	64	33	
TG-Swim	Mittelwerte \pm SEM	217,0 \pm 11,2	177,4 \pm 6,3	117,5 \pm 2,4	68,6 \pm 0,9	
	Anzahl	49	49	48	27	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim		0,80	0,47	0,15	0,13	0,53
WT-Swim vs TG-Swim		0,91	0,92	0,73	0,03	0,95

Tab. 3.16.

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{80} der in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim ($p>0,05$). In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich bei 8 Hz signifikanten Unterschiede in den Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim ($p<0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigten sich über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p>0,05$).

Hinsichtlich der Ca^{2+} -Elimination rt_{80} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-Swim mit dem WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Trainings erkannt werden ($p>0,05$; siehe Tab. 3.9.; siehe Abb. 3.20.A). Hinsichtlich

der Ca^{2+} -Elimination rt_{80} konnte eine signifikant schnellere Ca^{2+} -Elimination im Genotyp TG-Swim vs. Kontrolle WT-Swim bei 8 Hz erkannt werden ($p=0,03$; siehe Tab. 3.16.), bei den niedrigeren Frequenzen zeigte sich dieser signifikante Unterschied nicht ($p>0,05$). In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich dieser signifikante Unterschied des Genotyps TG-Swim vs. WT-Sham bei 8 Hz nicht (Post-Hoc $p=0,89$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,53$) bzw. dem WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,95$; siehe Abb. 3.21.).

Die 80 %-Relaxationzeit (rt_{80}) zeigte folgende Werte:

Relaxationszeit S rt_{80} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	161,9 \pm 10,5	140,2 \pm 7,6	90,3 \pm 3,5	50,5 \pm 2,2
	Anzahl	53	53	53	31
WT-Swim	Mittelwerte \pm SEM	167,1 \pm 9,3	136,9 \pm 6,8	84,8 \pm 3,5	53,4 \pm 1,4
	Anzahl	65	65	64	33
TG-Swim	Mittelwerte \pm SEM	164,6 \pm 14,6	127,2 \pm 7,5	74,2 \pm 3,5	48,5 \pm 1,7
	Anzahl	49	49	49	28

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim	0,71	0,74	0,27	0,27	0,76
WT-Swim vs TG-Swim	0,88	0,34	0,04	0,03	0,22

Tab. 3.17.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{80} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim ($p>0,05$). In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich bei 4 Hz und 8 Hz signifikanten Unterschiede in den Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim ($p<0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigten sich über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p>0,05$).

Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{80} der Zellverkürzung konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-Swim vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Trainings erkannt werden (siehe Tab. 3.17.; siehe Abb. 3.21.B). Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{80} der Zellverkürzung konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 4 Hz und 8 Hz erkannt werden (siehe Tab. 3.17). In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich dieser signifikante Unterschied des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 4 Hz (Post-Hoc $p=0,35$) und 8 Hz (Post-Hoc $p=0,22$) nicht. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,76$) bzw. dem WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,22$; siehe Abb. 3.21.B). Die Relaxationsparameter rt_{50} und rt_{90} sind im Anhang 5.2.3.1. und 5.2.3.2. dargestellt.

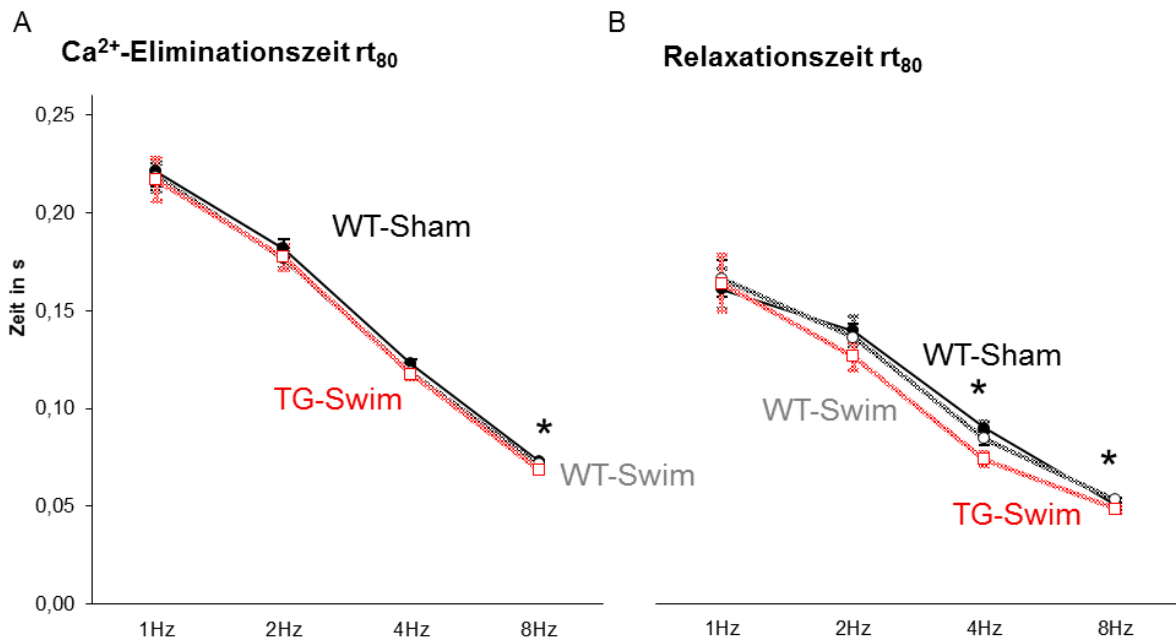


Abb. 3.21. A/B

(A) Darstellung der Relaxationsparameter rt_{80} für die Ca²⁺-Elimination. Der Interventionsvergleich zeigte in den Einzelfrequenzen keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich der Genotypen zeigte sich in den Einzelfrequenzen eine signifikant schnellere Ca²⁺-Elimination im TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz (* WT-Swim vs. TG-Swim $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

(B) Darstellung der Relaxationsparameter rt_{80} für die Zellverkürzung. Der Interventionsvergleich zeigte keinen signifikanten in den Einzelfrequenzen. Im Genotypvergleich zeigte sich eine signifikant schnellere Relaxation von TG-Swim vs. WT-Swim bei 4 Hz und 8 Hz (*WT-Swim vs. TG-Swim $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

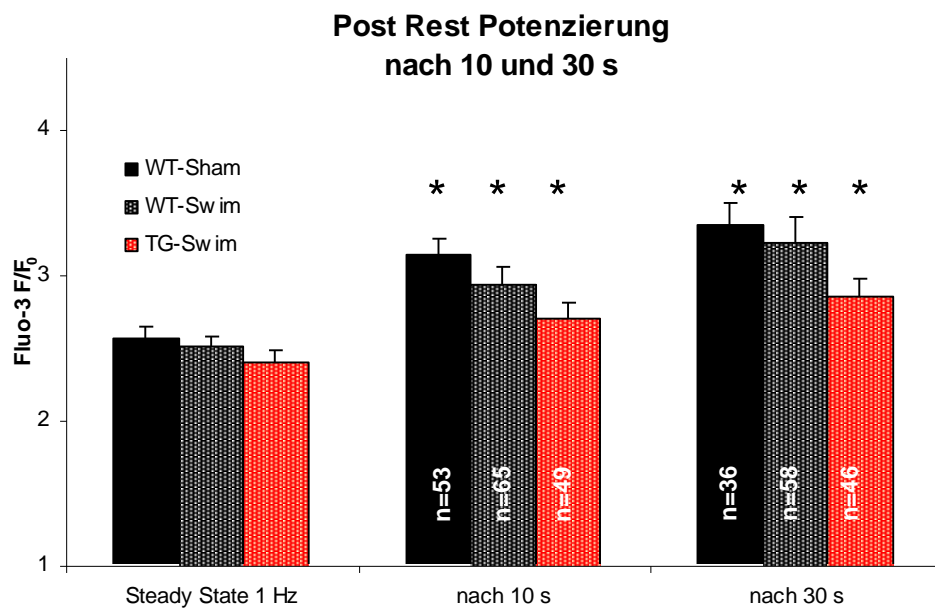


Abb. 3.22.

Dargestellt sind die Ca²⁺-Transienten vor und nach der 10 s bzw. 30 s Pause der PR-Beziehung. Zur Ausgangslage 1 Hz zeigte sich eine signifikante Zunahme des Ca²⁺-Transienten (* $p < 0,05$). Die PR 10 und PR 30 unterscheiden sich in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim nicht signifikant ($p > 0,05$).

Im PR-Protokoll wurde für das PR 10 im WT-Sham eine Anzahl von $n=53$; für den WT-Swim $n=65$ und für den TG-Swim $n=49$; für das PR 30 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=36$; für den WT-Swim $n=58$ und für den TG-Swim $n=46$; für das PR 60 wurde im WT-Sham eine Anzahl von $n=25$; für den WT-Swim $n=42$ und für den TG-Swim $n=36$ gemessen.

Der Ca^{2+} -Transient nach 10 s, 30 s und 60 s Pause ist signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz ($p < 0,05$). Die prozentuale Änderung zur Ausgangslage stellt sich bei der PR 10 wie folgt dar: WT-Sham $122,4 \pm 2,1$ %; WT-Swim $116,7 \pm 1,7$ % und im TG-Swim $112,7 \pm 1,4$ %. Im PR 30 wie folgt: WT-Sham $131,9 \pm 3,3$ %; WT-Swim $125,1 \pm 2,4$ % und im TG-Swim $117,5 \pm 2,2$ %.

Die PR 10 und PR 30 unterscheiden sich in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim nicht signifikant (PR 10 F/F_0 : WT-Sham $3,1 \pm 0,1$ F/F_0 vs. WT-Swim $2,9 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,22$ und WT-Swim vs. TG-Swim $2,7 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,16$; PR 30 F/F_0 : WT-Sham $3,3 \pm 0,2$ F/F_0 vs. WT-Swim $3,2 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,67$ und WT-Swim vs. TG-Swim $2,9 \pm 0,1$ F/F_0 $p=0,11$; siehe Abb. 3.22.). Graphiken und Werte für die PR 60 Beziehungen sind im Anhang 5.2.3.3. dargestellt.

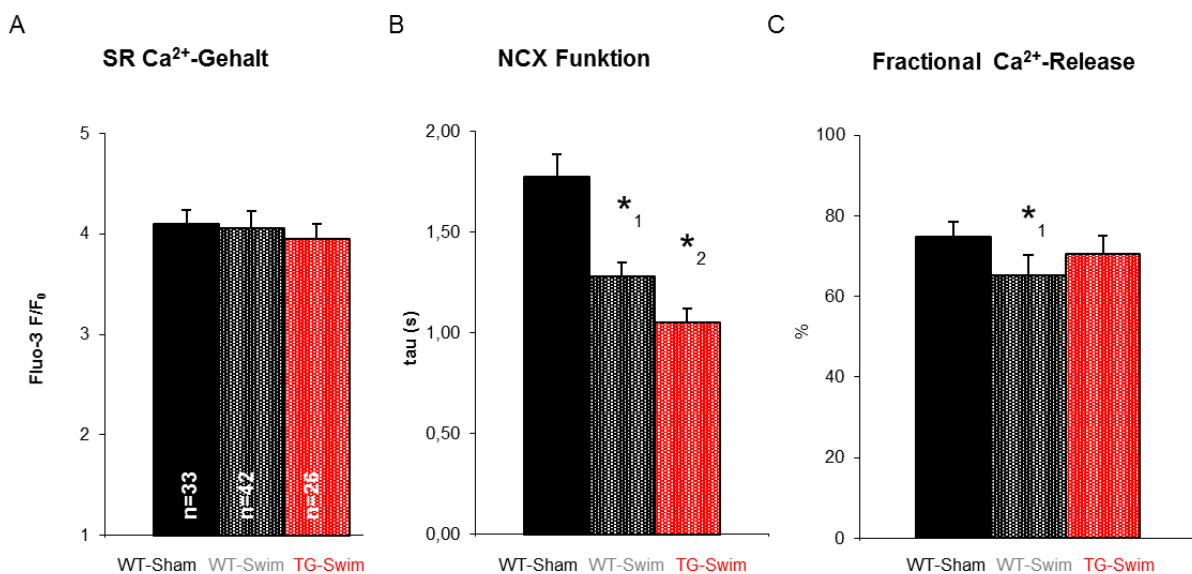


Abb. 3.23. A/ B/ C

(A) Darstellung des SR- Ca^{2+} -Gehalts. Kein signifikanter Unterschied im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim ($p > 0,05$) bzw. dem Genotypvergleich TG-Swim vs. WT-Swim ($p > 0,05$).

(B) Die NCX-Funktion ist in der Interventionsgruppe WT-Swim vs. WT-Sham signifikant erhöht (*₁ WT-Sham vs. WT-Swim $p < 0,05$). Die NCX-Funktion ist im Genotyp TG-Swim vs. WT-Swim signifikant erhöht (*₂ WT-Swim vs. TG-Swim $p < 0,05$).

(C) Das FR ist im Interventionsvergleich WT-Swim vs. WT-Sham signifikant vermindert (*₁ WT-Sham vs. WT-Swim $p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied im Genotyp TG-Swim vs. WT-Swim ($p > 0,05$).

Im *caffeine*-Protokoll konnte für den WT-Sham eine Anzahl von $n=33$, für den WT-Swim $n=42$ und im TG-Swim $n=26$ Myozyten gemessen werden. In der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim unterscheidet sich die Amplitude des *caffeine*-induzierten Ca^{2+} -Transienten, welcher den SR- Ca^{2+} -Gehalt bestimmt nicht signifikant voneinander (F/F_0 WT-Sham $4,1 \pm 0,2$ F/F_0 vs. WT-Swim $4,1 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,90$;

WT-Swim vs. TG-Swim $4,0 \pm 0,2$ $p=0,62$; siehe Abb. 3.23.A). Das FR beträgt im WT-Sham ist $74,8 \pm 2,1$ %, im WT-Swim $65,2 \pm 2,2$ % und im TG-Swim $70,6 \pm 2,1$ %. Das FR ist in der Interventionsgruppe WT-Swim signifikant vermindert gegenüber der Kontrolle WT-Sham ($p=0,01$). Das FR ist im Genotyp TG-Swim nicht signifikant vermindert gegenüber der Kontrolle WT-Swim ($p=0,13$; siehe Abb. 3.23.C). Die NCX-Funktion wird durch die Zeitkonstante τ [s] ermittelt. Im WT-Sham konnte τ mit $1,8 \pm 0,1$ s, im WT-Swim mit $1,3 \pm 0,1$ s und im TG-Swim mit $1,1 \pm 0,1$ s bestimmt werden. Die NCX-Funktion ist im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim mit $p < 0,001$ und dem Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim mit $p=0,01$ signifikant gesteigert (siehe Abb. 3.23.B).

4. Diskussion

4.1. T-cap im Kontext der Mechanosensorik

T-cap ist Teil des kontraktiven Apparats im Kardiomyozyten, lokalisiert an der Z-Linie, wie eine Mütze (engl: cap) dem Titin aufgesetzt (GREGORIO et al. 1998). Titin wird als ein wichtiger Sensor der passiven Dehnung beschrieben (BRADY 1991). In Hybridisierungs-Experimenten konnte eine mögliche Interaktion von T-cap zum K^+ -Strom I_{Ks} , anhand der Untereinheit minK, gezeigt werden (FURUKAWA et al. 2001). Die Beteiligung des T-cap's an einem putativen intrazellulären Mechanosensor wird anhand dieser Vorkenntnisse hypothetisiert (KNÖLL et al. 2003).

Gendefekte im K^+ -Strom I_{Ks} wurden mehrfach mit dem *long-QT-syndrome* in Verbindung gebracht (RODEN et al. 1996; WANG et al. 1996; WANG et al. 1998; DRICI et al. 1998). Aufgrund dieser Vorarbeiten wird hypothetisiert, dass der Verlust von T-cap im KO, zu einem verlängerten QT-Intervall bzw. zu einer langsameren Repolarisation der Kardiomyozyten führen könnte.

4.1.1. Das QT-Intervall und der Einfluss durch den T-cap-KO

Die elektrokardiographische Aufzeichnung sollte die phänotypische Veränderung in den Oberflächenpotentialen der T-cap-KO-Tiere darstellen. Hierbei wurde hypothetisiert, dass durch den vermuteten Interaktionsverlust von I_{Ks} im T-cap-KO, mit Veränderungen des QT-Intervalls und arrhythmischen Vorgängen einhergeht.

Die elektrokardiographische Auswertung ergab zu den erhobenen Parametern der Erregungsbildung, –ausbreitung und –rückbildung im T-cap-KO vs. WT-Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Die Herzfrequenz der Tiere lag im Mittel zwischen 472 bis 513 bpm und war in beiden Modellen nicht signifikant unterschiedlich. Das QT-Intervall im Oberflächen-EKG des T-cap-KO's sowie der frequenzkorrigierten QT_c -Zeit zeigten sich unverändert. Zudem wurde auch kein arrhythmisches Ereignis, wie zum Beispiel VT in der T-cap-KO-Gruppe aufgezeichnet. Hinsichtlich der üblichen EKG-Parameter, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Für das QT-Intervall und die QT_c -Zeit kann also angenommen werden, dass sie in der T-cap-KO-Maus, unter unseren Versuchsbedingungen, unverändert sind. Vergleichswerte der QT_c -Zeit aus MITCHELL et al. (1998) zeigen, dass die gemessenen Werte für beide Genotypen den dargestellten Normwerten entsprechen.

DRICI et al. (1998) wiesen im minK-KO, eine I_{Ks} -Untereinheit, ein verlängertes QT-Intervall nach. Somit wurde auch eine Verlängerung des QT-Intervalls im T-cap-KO, des hypothetisierten minK-Interaktionspartners, vermutet. KUPERSHMIDT et al. (1999) zeigten ein kontroverses Ergebnis zum minK-KO. Hierbei war der K^+ -Strom I_{Ks} in der minK-KO-Maus

aufgehoben, jedoch zeigten sich auch hier keine Veränderungen im Oberflächen-EKG. Somit kann das Oberflächen-EKG auch bei Verlust der minK-Untereinheit des I_{Ks} unauffällig sein. Für den T-cap-KO heißt das: ein Nachweis bzw. der Ausschluss der vermuteten Interaktion von minK und T-cap durch das Oberflächen-EKG allein nicht erbracht werden kann. Es folgt die Untersuchung der elektrophysiologischen Grundlagen des QT-Intervalls, die Dauer der AP (APD) dargestellt anhand der *patch-clamp*-Technik.

4.1.2. T-cap als Interaktionspartner des K^+ -Kanals I_{Ks} (KvLQT1/minK)

Das Ruhemembranpotential der T-cap-KO-Tiere konnte mit $-73,6 \pm 1,0$ mV gemessen werden. Der *peak lag* bei $19,2 \pm 3,3$ mV, die resultierende Amplitude bei $92,8 \pm 3,2$ mV. Die aufgezeichneten Spannungsparameter T-cap-KO-Tieren entsprechen damit den Vergleichswerten des murinen AP's des linksventrikulären Myokards (ANUMONWO et al. 2001). Im Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Ruhemembranpotential, *peak* und Amplitude zwischen dem T-cap-KO und der WT-Kontrolle.

Bezüglich der betrachteten Repolarisationsdauer konnte weder in den Einzelfrequenzen noch über alle Einzelfrequenzen hinweg signifikante Unterschiede im T-cap-KO zur Kontrolle nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Hypothese widerlegt, dass durch die mögliche Interaktion der I_{Ks} -Untereinheit minK mit T-cap sich durch eine Veränderung der APD im T-cap-KO beschreiben ließe. Experimentell konnte durch CHARPENTIER et al. (1998) mithilfe einer spezifischen Blockierung des I_{Ks} im Mausmodell, die Verlängerung der APD aufgezeigt werden. Die Verlängerung der APD geht dabei auf einen verminderten K^+ -Strom zurück (RODEN und HOFFMAN 1985; LIU und ANTZELEVITCH 1995). Somit scheint der K^+ -Kanal I_{Ks} nicht mit T-cap über eine Veränderung der APD zu interagieren.

Die K^+ -Ströme I_{Ks} und I_{Kr} sind beim Menschen die wesentlichen Ströme der Plateauphase des AP's. In der Maus besteht eine höhere Herzfrequenz und folglich eine kürzere APD. Dies geht mit einer minder ausgeprägten Plateauphase und reduzierter Genexpression der K^+ -Kanäle I_{Ks} und I_{Kr} im Mausmodell einher. Die kürzere murine Plateauphase wird vor allem durch den $I_{K,slow}$ dominiert (BRUNET et al. 2004; SALAMA und LONDON 2007). Dass die Mäuse trotzdem ein Modell mit guter Vergleichbarkeit zu höheren Säugern beziehungsweise humanen Myokard sind, zeigen die *patch-clamp*-Studien von KNOLLMANN et al. (2007). Hier wird die frequenzadaptierte Zykluslänge (APD) und die Repolarisation der AP mit den elektrophysiologischen Eigenschaften der höheren Säuger gleichgesetzt. Damit scheinen die dargestellten Ergebnisse, der AP im T-cap-KO-Mausmodell, als prinzipiell übertragbar auch bezüglich höherer Säuger. Jedoch lässt sich im Menschen mögliche Interaktionen von T-cap und I_{Ks} prinzipiell aus murinen Experimenten nicht endgültig ausschließen. Es konnten keine signifikanten Abweichungen des AP's, hinsichtlich Ruhemembranpotential, *peak*, Amplitude und Repolarisation im T-cap-KO gefunden werden. Dies scheint auf höhere Säugetiere mit T-cap-Verlust ableitbar zu sein.

In Vorarbeiten von DRICI et al. (1998) zur minK-KO-Maus konnte, im Gegensatz zu KUPERSHMIDT et al. (1999), ein verlängertes QT-Intervall bei niedriger Frequenz erkannt werden. Diese widersprüchliche Darstellung erschwert die Aussage bezüglich des T-cap-KO's. In einer aktuellen Studie gelang es jedoch, den minK-KO mit signifikant verlängerter APD und daraus resultierenden EAD und ventrikulären Tachykardien im Mausmodell darzustellen (THOMAS et al. 2007). Das heißt der Verlust von minK geht mit einer Arrhythmogenese einher (*long-QT5-syndrome*). Daraus schließt sich, dass ein Verlust von T-cap als putativer Interaktionspartner des I_{Ks} über minK, ebenfalls pathologische Erregungseigenschaften hätte zeigen sollen. Auch dies war in den durchgeführten Experimenten nicht der Fall.

Eine unveränderte Repolarisationsdauer, unberührte AP-Charakteristika, kein Nachweis irregulärer AP in der *patch-clamp*-Technik sowie eine unveränderte QT_c-Zeit im T-cap-KO *in vivo*, schließen die Interaktion von T-cap und minK mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Für die erwartete Interaktion von T-cap und dem K⁺-Kanal I_{Ks} über dessen Untereinheit minK trifft die Aussage zu, dass unter physiologischen Bedingungen keine Interaktion eintritt.

4.1.3. Das EC-Coupling im T-cap-KO

Zur weiteren elektrophysiologischen Charakterisierung des T-cap-KO's wurde die elektromechanische Kopplung untersucht. Weder für die Amplitude der Ca²⁺-Transienten und Zellverkürzung fanden sich im T-cap-KO relevante Unterschiede gegenüber dem WT. Dies gilt sowohl im Vergleich auf einzelne Stimulationsfrequenzen bezogen, als auch im Test für wiederholte Messungen (*repeated measures*) über alle Stimulationsfrequenzen hinweg. Auch die diastolischen Sarkomerlängen im T-cap-KO unterscheiden sich nicht von denen im WT. Die Kraft-Frequenzbeziehung beschreibt die Veränderung der Kontraktilität abhängig von der Frequenz. Im gesunden menschlichen Myokard ist eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung festzustellen, d.h. innerhalb physiologischer Frequenzen kommt es mit zunehmender Herzfrequenz zu einer vermehrten Kontraktilität. Grundlage hierfür sind gesteigerte Ca²⁺-Transienten durch einen vermehrten Ca²⁺-Einstrom über die L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (I_{Ca}) und eine Zunahme des SR-Ca²⁺-Gehalts durch vermehrte Rückaufnahme über die SERCA (BERS 2001; PIESKE et al. 1995). Bei humaner Herzinsuffizienz wurde jedoch eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung beschrieben (PIESKE et al. 1999).

Die T-cap-KO-Maus zeigte hier eine schwach negative Kraft-Frequenzbeziehung. Die schwach negative Kraft-Frequenzbeziehung konnte von REDEL et al. (2002) unter hoher Temperatur und hohem extrazellulärem Ca²⁺-Konzentration im Mausmodell in gleicher Weise dargestellt werden. Eine negative bis schwach positive Kraft-Frequenzbeziehung ist in Mäusen durchaus eine physiologische Gegebenheit (ENDOH 2004), und ist damit unter den gegebenen Messbedingungen nicht als kontraktile Dysfunktion zu werten.

Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Rückaufnahme nach Kontraktion ist primär ein Maß für die Aktivität der SERCA, da - wie bereits erwähnt - in der Maus die diastolische Ca^{2+} -Elimination zu 90 % über die SERCA zurück in das SR geschieht, während nur ca. 10 % der Ca^{2+} -Ionen über NCX und andere Wege eliminiert werden. Die Ca^{2+} -Eliminationszeiten zeigten bei 2 Hz im T-cap-KO eine signifikante Verlängerung, was auf eine verminderte SERCA-Aktivität hinweisen könnte. Bei 1 Hz waren diese Unterschiede allerdings nicht signifikant und zudem glichen sie sich bei höherer, also physiologischerer Stimulationsfrequenz, denen des WT komplett an. Es könnte sich hierbei auch um ein reines Epiphänomen handeln, zumal der 2-Wege-Anova über alle gemessenen Einzelfrequenzen hinweg keinen Unterschied nachwies. Relevante Unterschiede in der diastolischen Ca^{2+} -Elimination als Folge des T-cap-KO sind damit primär nicht zu postulieren.

Die PR zeigte im T-cap-KO keine signifikanten Unterschiede zum WT. Die PR-Beziehung stellt ein Maß für die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's dar: Während der Stimulationspause kommt es einerseits zu einem (diastolischen) Ca^{2+} -Verlust aus dem SR („diastolisches SR Ca^{2+} -Leck“), welches wiederum gleichzeitig durch Ca^{2+} -Aufnahme in das SR über SERCA ausgeglichen wird. Aus dem SR leckende Ca^{2+} -Ionen werden andererseits durch den NCX nach extrazellulär eliminiert, so dass ein wesentlicher Mechanismus der PR-Beziehung somit auch eine Konkurrenz von NCX und SERCA um das aus dem SR leckende Ca^{2+} -Ion ist. (BERS, 1993; BERS 2001; BASSANI und BERS 1995). Hinsichtlich dieser Fähigkeit des Kardiomyozyten zur (vermehrten) Ca^{2+} -Einspeicherung in das SR, zeigte sich keine signifikanter Unterschied im T-cap-KO versus WT-Kontrolle.

Auch hinsichtlich der Fähigkeit der Zelle, eine hohe SR Ca^{2+} -Beladung ohne spontane Kontraktion, sogenannte *non stimulated events* (d.h. umfassende spontane Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR) zu tolerieren ergibt sich bei vergleichbarer Anzahl gemessener Zellen im PR (WT vs. KO; PR 10: n=16 vs. n=19; PR 30: n=16 vs. n=17; PR 60: n=15 vs. n=10) kein Hinweis auf eine vermehrte Arrhythmogenese in der T-cap-KO-Maus. Eine SR-Überladung mit der Induktion von Arrhythmien ist im T-cap-KO somit nicht darstellbar.

Zur Untersuchung des SR- Ca^{2+} -Gehalts im T-cap-KO wurden die *caffeine*-Stoß induzierte Ca^{2+} -Freisetzung angewandt, da hierbei der RyR des SR's vollständig geöffnet wird und offen bleibt. Unter *caffeine*-Einfluss kann das intrazelluläre Ca^{2+} -Ion nur durch den NCX abtransportiert werden, da die über die SERCA transportierten Ca^{2+} -Ionen das SR sofort wieder verlassen durch die noch geöffneten RyR. Der ermittelte Transient unter *caffeine* war bezüglich der Ca^{2+} -Amplitude und τ -Funktion, dem Abfall des Ca^{2+} -Transienten nach dem *caffeine*-Stoß, nicht signifikant unterschiedlich. Das heißt der SR- Ca^{2+} -Gehalt, bestimmt über die Amplitude des *caffeine*-induzierten Transienten ($p=0,11$) und die NCX-Aktivität, abgeschätzt durch dessen τ -Funktion ($p=0,13$), unterscheiden sich nicht signifikant. Der

T-cap-Verlust führt damit nicht zu einer SR-Ca²⁺-Gehaltsveränderung oder Beeinflussung der NCX-Aktivität.

Das FR ist der prozentual ausgeschüttete Anteil an Ca²⁺-Ionen zum SR-Gesamt-Ca²⁺-Gehalt. Das FR wird durch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, den SR-Ca²⁺-Gehalt sowie den L-Typ-Ca²⁺-Einstrom bestimmt (BERS, 2002b; FABIATO und FABIATO 1975). Auch für das FR zeigte sich im T-cap-KO kein Unterschied zum WT (p=0,84), so dass T-cap anscheinend keinen Einfluss auf die SR-Ca²⁺-Speicherung und -Freisetzung hat.

4.1.4. Zusammenfassung T-cap

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der T-cap-KO-Maus sind bezüglich *EC-Coupling* und der AP nicht signifikant verändert gegenüber dem WT. Der EKG-Befund stellte keine QT_c-Verlängerung sowie die Untersuchung auf zellulärer Ebene keine verlängerte Repolarisationsphase beziehungsweise APD dar. Eine Interaktion des T-cap's mit dem K⁺-Kanal I_{Ks} ist daher unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich. Darüber ergaben sich unter physiologischer Belastung keine Hinweise auf vermehrte arhythmischen Ereignisse.

BERTZ et al. (2009) beschreiben das T-cap-Protein als ein den Anforderungen eines mechanisch stabilisierenden Strukturproteins nachkommenden Zellbestandteils aufgrund seiner starken molekularen Bindung in der Z-Linie. Jedoch ist bei dem vollständigen Verlust von T-cap in der Kardiomyozyte keine Veränderung der Ca²⁺-Homöostase oder eine kontraktile Dysfunktion aufgetreten, welche auf eine Herzinsuffizienz aufgrund eines solchen Verlustes eines stabilisierenden Strukturproteins hinweisen könnte. Einschränkend ist zu sagen, dass die vorliegenden *in vitro* Experimente an isolierten Kardiomyozyten vorgenommen wurden. Diese sind keiner Vorlast mehr ausgesetzt, so dass mögliche akute Vorlast-induzierte Effekte des putativen Mechanosensors in isolierten Zellen nicht beobachtet werden können. Allerdings hatten auch die funktionellen Untersuchungen *in vivo* (EKG) unter vorhandener Vorlast keine Unterschiede gezeigt.

Die Zugehörigkeit von T-cap zu einem vermuteten intrazellulären Mechanosensor-Komplex ist nicht gänzlich auszuschließen, da die Messung an unbelasteten Kardiomyozyten erfolgte. Zur weiteren Abklärung könnten die Herzen des T-cap-KO's mechanischem Stress *in vivo* ausgesetzt werden (z.B. TAC Intervention), um einen intrazellulären Mechanosensor zu belasten. Weitere Untersuchungen von dehnungsbelasteten Kardiomyozyten sollten angeschlossen werden, um T-cap als Transduktor eines vermuteten Mechanosensors für spezifische Dehnungsreize der Kardiomyozyten einzuordnen.

Laut Hypothese wurden keine Veränderungen bezüglich der Ca²⁺-Transienten und der Zellverkürzung erwartet. Die hypothetisierte Veränderung der APD ist im unbelasteten Tier nicht eingetreten. Insgesamt konnte ein zum WT unveränderter elektrophysiologischer

Phänotyp nachgewiesen werden, der es ermöglicht, das T-cap-KO-Modell für weitere Fragestellungen anzuwenden.

4.2. Melusin

Vorausgehende Studien zur Melusin-KO und -TG-Maus ergaben den Hinweis auf einen protektiven Effekt des Melusins bei druckbelasteten Herzen (DE ACETIS et al. 2005; BRANCACCIO et al. 2006). Es konnte in diesen Versuchen eine verlängerte kompensierte Hypertrophie im Melusin-TG-Tier bei hämodynamischer Belastung mit TAC nachgewiesen werden. Die detaillierten Signalwege und Anpassungsvorgänge der kardialen Funktion bei der Herzhypertrophie sind jedoch noch unbekannt (TARONE und LEMBO 2003). Zur Untersuchung des Melusineffekts auf das *EC-Coupling* der Kardiomyozyten wurden die Tiere mit der Epifluoreszenztechnik untersucht. Um die Untersuchung des Melusineffekts bei hämodynamischer Belastung zum Modell der kardialen Hypertrophie zu erweitern, wurden zusätzlich zum druckbelasteten Tier (TAC) das MI- und Swim-Modell untersucht. Dabei stellt die TAC- und MI-Intervention ein pathologisches Modell der Hypertrophie (maladaptive) und die trainierten Tiere ein physiologisches Modell der Hypertrophie (adaptive) dar (EVANGELISTA et al. 2003; TARNAVSKI et al. 2004; DE BONO et al. 2006).

Die Betrachtung des Melusineffekts erfolgte geschlechtsspezifisch nur in weiblichen Tieren.

4.2.1. Der Effekt der MI-Intervention

Die Untersuchung erfolgte zwei Wochen nach Infarkt. Den operierten Tieren wurde ein Sham-operiertes Tier zum Vergleich des Interventionseinflusses gegenübergestellt (BEECHER, 1961), wobei der TG-Sham bereits in Vorarbeiten als nicht unterschiedlich zum WT-Sham dargestellt werden konnte und daher nicht zusätzlich untersucht werden musste (DE ACETIS et al. 2005). Der Melusineffekt des transgenen Modells wurde entsprechend durch den Vergleich von TG-MI mit dem WT-MI kontrolliert.

Die diastolische Sarkomerlänge konnte für den Interventionsvergleich zwischen 1,67 μm bis 1,72 μm eingeordnet werden und unterscheidet sich nicht signifikant. Der Ca^{2+} -Transient des FF-Protokolls zeigte im paarweisen Vergleich und über die zunehmenden Frequenzen von 1 bis 8 Hz keinen signifikanten Unterschied innerhalb der MI-Interventionsgruppen. Auffällig war eine signifikant verstärkte Kontraktion der MI-Interventionsgruppen WT-MI um circa 30 % und im TG-MI um circa 50 % über den gesamten Frequenzverlauf und im paarweisen Vergleich der Einzelfrequenzen von 1 bis 8 Hz. Die hypertrophierten Zellen der MI-Interventionstiere kontrahieren signifikant stärker als die Kontrolle WT-Sham zwei Wochen nach linksventrikulärem Infarkt. Die verstärkte Kontraktion geht dabei nicht auf einen erhöhten Ca^{2+} -Transienten zurück (vergleiche Abb. 3.10. und 3.11.), sondern könnte durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Elemente bedingt sein (HAJJAR und

GWATHMEY 1992). Hierbei kommt es unter pathologischem Stress zum Myosinisoformenwechsel von α MHC zu β MHC (GUPTA 2007). Dies verweist im Mausmodell auf einen Benefit der kardialen Funktion durch Kompensation der durch den Infarkt untergegangenen und funktionslosen Kardiomyozyten. Weitere alternative Modifikation von Myofilamenten zur Verbesserungen der Kontraktilität durch Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität sind für Troponin I, Troponin T und *myosin light chain* geschildert (VAN DER VELDEN et al. 2004; DE TOMBE 1998). Die erhaltene kardiale Funktion der MI-Interventionstiere konnten UNSÖLD et al. (2014) für das männliche Melusin Tier durch echokardiographische Parameter und längere Überlebenszeiten belegen. Es wird in den Melusin überexprimierenden Tieren, zwei Wochen nach Infarkt, das Stadium der kompensierten Hypertrophie deutlich. Die durch den Infarkt verlorene Muskelmasse ist anscheinend zum Untersuchungszeitpunkt also durch Hypertrophie der verbliebenen Muskelzellen ausgeglichen worden.

Die Ca^{2+} -Transienten nehmen in allen Interventionsgruppen mit zunehmender Stimulationsfrequenz ab. Ausnahme ist TG-MI, wo diese Abnahme nicht signifikant ist. Der Abfall der Ca^{2+} -Transienten und des *shortening* bei zunehmender Frequenz ist als negative Kraft-Frequenzbeziehung beschrieben. Die negative Kraft-Frequenzbeziehung zeigt jedoch im Mausmodell keine verminderte kardiale Funktion, sondern stellt unter den Messbedingungen einen physiologischen Sachverhalt dar (REDEL et al. 2002; ENDOH 2004). Eine Abschwächung der negativen Kraft-Frequenzbeziehung im Melusin-TG-Tier stellt damit einen Funktionsgewinn dar.

Die verbesserte Kontraktion könnte im belasteten Mausmodell, durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Filamente erklärt werden (HAJJAR und GWATHMEY 1992). In den Untersuchungen von HARADA et al. (1999) konnte eine verstärkte Genexpression von β -MHC im Mausmodell eine Woche bzw. vier Wochen nach Infarkt beschrieben werden. KRENZ und ROBBINS (2004) konnten im Vergleich von β -MHC transgenen Tieren gegenüber einer Wildtyp Kontrolle bei infarzierten Mausmodellen eine verbesserte Kontraktilität in der β -MHC überexprimierenden Gruppe zwei Wochen nach Infarkt nachweisen. Dies deutet auf die Ca^{2+} -Sensitivitätserhöhung durch MHC Isoformenwechsel als Adaption bei kardiovaskulärem Stress in Form von der MI-Intervention hin.

Die Relaxationszeiten für die Ca^{2+} -Elimination und den Rückfall der Kardiomyozyte auf die Ausgangslänge sind im MI-Interventionstier signifikant kürzer als die Kontrolle WT-Sham. Die Relaxation verläuft circa 1,2-fach schneller im MI-Interventionstier. Eine Beschleunigung der Relaxation und Aktivierung der Ca^{2+} -Rückaufnahme sind typische Effekte adrenergen Stresses und deuten auf mögliche entsprechende Umbauvorgänge nach MI hin. Eine vermehrte akute adrenerge Aktivierung zur Erhöhung der Kontraktionskraft wäre plausibel. Ca^{2+} -Ionen werden hierbei schneller durch den NCX abtransportiert, wobei die SERCA im

hypertrophierten Herzen runterreguliert ist (POGWIZD 2000; BERS 2001). Die Zelle fällt schneller in ihre Ausgangslänge zurück. Im WT-MI konnte, mithilfe des *caffeine*-Protokolls, eine signifikant erhöhte Aktivität des NCX's nachgewiesen werden (siehe unten). Zwei Wochen nach MI ist die Ca^{2+} -Elimination im MI-Interventionstier signifikant erhöht. Die rt_{50} und rt_{90} bestätigen diese Aussage. Eine vermehrte Aktivität des NCX's und die Senkung der SERCA sind für die ventrikuläre Hypertrophie beschrieben (DE TOMBE 1998; POGWIZD 2000; BERS 2001), verlängerte Relaxationszeiten und reduzierte Ca^{2+} -Amplituden hatten auf die Herzinsuffizienz hingewiesen (DE TOMBE 1998). Die hier vorgefundenen kürzeren Relaxationszeiten bei unveränderter Ca^{2+} -Amplitude sprechen jedoch für die erhaltene Funktionalität des *EC-Coupling* als Anpassung auf den MI nach zwei Wochen.

Die PR-Potenzierung stellte sich für 10 s und 30 s Pause im MI-Interventionstier nicht signifikant ein. Hierbei kommt es unter bestehender Kontraktionspause zur zunehmenden SR Beladung durch die SERCA mit möglichen spontanen Verlust von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR über die RyR (BASSANI und BERS 1995). Das PR ist damit ein Maß für die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's. Der unveränderte Ca^{2+} -Transient im MI-Interventionstier bei PR 10 und PR 30 zur Kontrolle WT-Sham verweist damit auf eine unveränderte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's hin. Die PR 60 zeigte jedoch eine signifikante Minderung des Ca^{2+} -Transienten WT-MI vs. WT-Sham ($p=0,04$). Durch diese Pause konnte über dem im WT-MI hoch reguliertem NCX ($p=0,01$) die intrazellulären Ca^{2+} -Ionen abtransportiert und dem SR entzogen werden. Im TG-MI ist die NCX-Aktivität vs. WT-Sham nicht erhöht ($p=0,08$), daher ist die Ca^{2+} -Amplitude im TG-MI nach 60 s diastolischer Pause noch unbeeinflusst. Das heißt bei längerer Pause (>60 s) zeigt sich der Netto- Ca^{2+} -Gehalt der WT-MI Intervention vs. WT-Sham vermindert. Dieser Abzug von Ca^{2+} -Ionen durch den NCX, zeigt die Anpassung der Ca^{2+} -Homöostase bei hämodynamischer Belastung an (DE TOMBE 1998; BERS 2001).

Unter *caffeine*-Einfluss wird der RyR geöffnet und die im SR enthaltenen Ca^{2+} -Ionen werden komplett ausgeschüttet, hierbei können Aussagen zu SR- Ca^{2+} -Gehalt, NCX-Aktivität und FR getroffen werden. Der SR- Ca^{2+} -Gehalt zeigte sich im Interventionstier WT-MI ($p=0,07$) und TG-MI ($p=0,10$) vs. Kontrolle etwas, jedoch nicht signifikant vermindert. Durch die signifikant erhöhte NCX-Aktivität im WT-MI ($p=0,01$) und die tendenziell erhöhte NCX-Aktivität im TG-MI ($p=0,08$) vs. Kontrolle WT-Sham, wäre ein verminderter SR- Ca^{2+} -Gehalt, unter anderem durch Abzug von Ca^{2+} -Ionen nach extrazellulär zu erklären. Der verminderte SR- Ca^{2+} -Gehalt mit erhöhter NCX-Aktivität weist auf die Umstellung der Ca^{2+} -Homöostase bei ventrikulärer Hypertrophie hin (PIESKE et al. 1999; HASENFUSS et al. 1999). Bei sinkendem, aber noch nicht signifikanten SR- Ca^{2+} -Gehalt, konnten wir eine kompensatorische Erhöhung des FR's feststellen. Das FR wird durch den L-Typ- Ca^{2+} -Strom, den SR- Ca^{2+} -Gehalt, die intrazellulären Ca^{2+} -Ionen und die RyR-Phosphorylierung bestimmt (FABIATO und FABIATO

1975; BERS 2002b). Im MI-Interventionstier sieht es so aus, dass bei verminderten SR-Ca²⁺-Gehalt das FR kompensatorisch erhöht ist.

Damit konnten zusammenfassend folgende Änderungen, nach zweiwöchiger hämodynamischer Belastung, durch den Myokardinfarkt nachgewiesen werden: Der SR-Ca²⁺-Gehalt ist vermindert, jedoch nicht signifikant. Dies wird durch das erhöhte FR ausgeglichen. Die Ca²⁺-Transienten unterscheidet sich nicht, dennoch zeigte sich eine höhere Kontraktilität im Interventionstier. Diese wird vermutlich durch den *myosin isoform shift* erklärt. Die Relaxation der Interventionstiere ist schneller, dies spricht für eine erhöhte SERCA-Aktivität. Die NCX-Funktion ist im Interventionstier signifikant erhöht. Eine Erhöhung des NCX's ist ein klassisches Zeichen der Herzinsuffizienz.

Insgesamt weist die Umstellung des *EC-Coupling* auf eine Adaption mit ventrikulärer Hypertrophie bei hämodynamischer Belastung. Damit befinden sich die MI-Interventionstiere nach zwei Wochen, im Stadium der kompensierten Hypertrophie. Das erhaltene linksventrikuläre Myokard kompensiert durch die verstärkte Kontraktion in diesem frühen Stadium die Infarktregion.

4.2.1.1. Melusineffekt bei der MI-Intervention

Die Sarkomerlängen unterscheiden sich im Genotypvergleich nicht signifikant. Das Melusin-TG-Tier zeigt eine tendenziell verbesserte Kontraktion (Anova RM $p=0,055$), die bei 2 Hz signifikant stärker zur Kontrolle WT-MI ist (Post-Hoc 2 Hz $p=0,04$; siehe Tbl. 5.1 und Abb. 5.2.A). Der TG-MI kontrahiert mit $5,65 \pm 0,39$ %RZL circa 20 % stärker als der WT-MI $4,66 \pm 0,32$ %RZL.

Der Ca²⁺-Transient in der FF stellte sich unverändert zum WT-MI dar. Im TG-MI konnte bezüglich der Ca²⁺-Elimination und Relaxation rt_{50} , rt_{80} und rt_{90} kein signifikanter Unterschied vs. WT-MI dargestellt werden. Im Melusin-TG-Tier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im PR-Verhalten zur Kontrolle WT-MI ($p > 0,05$).

Die Melusin-Überexpression scheint zu einem schwächer ausgeprägten Anstieg der NCX-Funktion nach Infarkt zu führen. Dies kann als Hinweis auf einen protektiven Effekt des Melusins bei Infarkt verstanden werden, denn eine Zunahme der NCX-Funktion bzw. Erhöhung des NCX's ist ein klassisches Zeichen der Herzinsuffizienz (PIESKE et al. 1999; HASENFUSS et al. 1999). Eine Erhöhung der NCX-Aktivität führt zu vermehrte Ca²⁺-Elimination aus der Zelle und kann damit zu einer Verminderung des SR-Ca²⁺-Gehalts beitragen.

Angesichts der tendenziell gesteigerten Kontraktilität und weniger stark erhöhten NCX-Funktion scheint die Melusin-Überexpression nach Myokardinfarkt funktionelle Vorteile zu bieten bzw. protektiv zu sein. Eventuell wird die Tendenz der elektrophysiologischen Eigenschaften, erst später als nach zwei Wochen andauernder Intervention der Melusin-TG-Tiere signifikant, da die von DE ACETIS et al. (2005) und BRANCACCIO et al.

(2006) untersuchten Tiere den protektiven Effekt bis zur zwölften Wochen nach Intervention beschrieben.

Der eher schwache Melusineffekt kann auch auf die grundsätzlich protektiven Eigenschaften des weiblichen Geschlechts bei kardialen Stress zurückzuführen sein (MARTINEZ-SELLES 2007), da in der vorliegenden Arbeit nur weibliche Tiere untersucht wurden. Übereinstimmend konnten UNSÖLD et al. (2014) nur im maskulinen Tier den protektiven Melusineffekt mit verlängerten Überlebenszeiten und verminderter Dilatation zeigen. Möglicherweise waren in diesen Daten, die in der vorliegenden Arbeit gesehenen protektiven Effekte auf Einzelzellebene, im Gesamtorganismus im Weibchen überlagert und kamen nur im vulnerableren Männchen zum Ausdruck.

4.2.2. Der Effekt der TAC-Intervention

Die TAC-Intervention ist ein hämodynamisches Modell der Nachlasterrhöhung im linken Ventrikel (TARNAVSKI et al. 2004). Die Sham-operierte Kontrolle schließt den Placeboeffekt der Operation aus (BEECHER, 1961). Die Mäuse unterlagen zwei Wochen der Druckbelastung und wurden anschließend zum *EC-Coupling* untersucht.

Im TG-TAC-Interventionstier sind gegenüber der Kontrolle WT-Sham die Sarkomere signifikant verkürzt (Anova RM $p < 0,001$). Die Sarkomere der TG-TAC-Intervention sind durch die Hypertrophie bei Druckbelastung in Serie angereicht, um die Kontraktionskraft zu erhalten. Die Sarkomerlänge verkürzt sich hierdurch (HAMRELL et al. 1986). Auch die WT-TAC-Intervention zeigt tendenziell kürzere Sarkomere vs. Kontrolle WT-Sham ($p = 0,08$).

Die Ca^{2+} -Transienten und das *shortening* der FF konnten für die TAC-Interventionsgruppe zur Kontrolle WT-Sham unverändert dargestellt werden. Eine Anpassung, wie die zunehmende Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktile Elemente im MI-Modell konnte nach zwei Wochen TAC nicht nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität ist zwar durch den Isoformenwechsel der MHC im Mausmodell bei Druckbelastung zu erwarten (GUPTA 2007), scheint jedoch in diesem frühen Stadium der Hypertrophie nach zwei Wochen Druckbelastung noch nicht erreicht. Auch in den TAC-Interventionsgruppen ist die Kraft-Frequenzbeziehung schwach bis negativ.

Die Interventionsgruppe WT-TAC zeigte bei 8 Hz eine signifikante schnellere Zellrelaxation in der rt_{80} und rt_{90} zur Kontrolle WT-Sham. In dem Frequenzbereich von 1 bis 8 Hz bzw. über die gesamte rt_{50} zeigte sich keine signifikante Verkürzung der Relaxationszeit. Die Relaxationsparameter rt_{50} , rt_{80} und rt_{90} der Ca^{2+} -Elimination zeigte sich im Interventionstier WT-TAC nicht signifikant unterschiedlich zu Kontrolle WT-Sham.

Die Ca^{2+} -Transienten des PR-Protokolls unterscheiden sich nicht signifikant nach 10 s; 30 s und 60 s Pause in den TAC-Interventionstieren gegenüber der Kontrolle WT-Sham. Der unveränderte Ca^{2+} -Transient im TAC-Interventionstier bei PR 10; 30 und 60 zur Kontrolle WT-Sham verweist damit auf eine unveränderte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's hin.

Das *caffeine*-Experiment zeigte in der Auswertung des Ca^{2+} -Transienten einen unveränderten SR- Ca^{2+} -Gehalt in der TAC-Interventionsgruppe zur Kontrolle WT-Sham nach zwei Wochen Druckbelastung. Die prozentuale Ausschüttung des SR's unter 1 Hz liegt bei 75 % im TAC-Interventionsmodell und ist nahezu gleich der Kontrolle WT-Sham. Die NCX-Aktivität ist im Interventionstier erhöht, dies weist wieder auf eine beginnende Herzinsuffizienz hin. Jedoch hat dieser Unterschied im Interventionsvergleich das Signifikanzniveau mit $p=0,051$ (Anova RM) nur knapp verfehlt.

Im TAC-Interventionstier sieht man echokardiographisch nach zwei Wochen bereits eine konzentrische Hypertrophie (UNSÖLD et al. 2007). Das *EC-Coupling* scheint hierbei jedoch noch in einem frühen Stadium der Anpassungsvorgänge zu stehen. In den Vergleichsexperimenten zum Melusin-TG-Tier von DE ACETIS et al. (2005), wurden die echokardiographischen Parameter für die Hypertrophie in der vierten Woche nach TAC erhoben. Die Dauer von zwei Wochen könnte daher noch zu kurz sein, um den vollen Effekt der TAC-Intervention auf die Ca^{2+} -Homöostase nachzuweisen.

4.2.2.1. Melusineffekt bei der TAC-Intervention

Im transgenen Tier zeigte sich die Sarkomerlänge im Vergleich zum WT nach der TAC-Intervention signifikant verkürzt ($p=0,02$ Anova RM). Vorbeschrieben ist, dass bei Druckbelastung des Ventrikels durch TAC die Sarkomere sich verkürzen und in Serie anordnen (HAMRELL et al. 1986). Dieser Effekt ist in der vorliegenden Untersuchung im WT-TAC zwar bereits angedeutet gegenüber der WT-Sham Kontrolle, jedoch nur im transgenen Modell bereits nach zwei Wochen signifikant. Hierbei könnte dies ein Hinweis für ein stärkeres oder schnelleres Ansprechen des transgenen Tiers auf die Druckbelastung sein.

Zu den Ca^{2+} -Transienten und der Kontraktion zeigte sich in der FF im Genotypvergleich kein signifikanter Unterschied. Die Melusin-Überexpression zeigt keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Transienten und das *shortening* nach zwei Wochen TAC. Ebenfalls zeigten die Relaxationsparameter rt_{50} , rt_{80} und rt_{90} der Ca^{2+} -Elimination und der Zellrelaxation keine signifikanten Unterschiede im Genotypvergleich. Die Regulation der SERCA scheint daher nicht beeinflusst von der Melusin-Überexpression nach zweiwöchiger Nachlasterhöhung durch TAC.

Die Relaxationszeiten der Interventionstiere waren unauffällig, jedoch zeigte sich bezüglich der NCX-Funktion im WT, nicht jedoch im transgenen Tier, bei Druckbelastung durch TAC eine beinahe signifikante Erhöhung der NCX-Funktion ($p=0,051$). Da eine Erhöhung der NCX-Funktion auf eine Entwicklung zur Herzinsuffizienz hindeuten könnte, wie in entsprechenden Studien eine erhöhte NCX-Aktivität in druckinduzierter maldaptiver Hypertrophie beschrieben wird (STUDER et al. 1997; TAKIMOTO et al. 2002), könnte sich auch hier wieder ein protektiver Mechanismus des transgenen Modells andeuten.

Die Ca^{2+} -Transienten der PR konnten als nicht unterschiedlich im Melusin-TG-Tier dargestellt werden, dies weist auf die unveränderte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR's im Melusin-TG-Tier. Der SR- Ca^{2+} -Gehalt sowie das FR sind unverändert im Genotypvergleich. Der in anderen Untersuchungen postulierte Effekt des Melusins bei TAC (TARONE und LEMBO 2003) hatte sich in der in Göttingen durchgeführten Untersuchungsserie hinsichtlich der echokardiographischen Funktion wie auch der morphometrischen Daten (u.a. Hypertrophie und Dimensionen des Herzens) nach zwei Wochen TAC nicht bestätigt (UNSÖLD et al. 2007). Die Untersuchung von DE ACETIS et al. (2005), mit verspäteter Dilatation des linken Ventrikels im transgenen Tier unter TAC, erfolgte vier Wochen nach Intervention. Der hypothetisierte protektive Melusineffekt von Melusin in der Hypertrophiesignalkaskade ist in diesem frühen Stadium nach Druckbelastung offensichtlich nicht eindeutig zur Ausprägung gekommen. Weiterhin wurde hier das weibliche Tier untersucht, das einen geschlechtsspezifischen Vorteil der kardialen Funktion bei pathophysiologischer Belastung besitzt (GHALI 2004; MARTINEZ-SELLES 2007). Der protektive Effekt der Melusin-Überexpression kann daher durch die geschlechtsspezifischen Effekte überlagert sein.

4.2.3. Der Effekt des Trainings (Swim)

Das kontinuierliche Training führt zur physiologischen Anpassung der Herzleistung durch Hypertrophie, niedrigere Ruhfrequenz und eine höhere submaximale Leistungsfrequenz (EVANGELISTA et al. 2003; DE BONO et al. 2006). Das Modell stellt eine gutartige Anpassung der Herzmuskelmasse an die erhöhte körperliche Anforderung dar (adaptive Hypertrophie). Die weiblichen Tiere wurden vier Wochen trainiert und der untrainierten Sham-Gruppe gegenübergestellt.

Die Sarkomerlänge der trainierten Tiere unterscheidet sich nicht signifikant zur Kontrolle WT-Sham. Die Ca^{2+} -Transienten der FF unterscheiden sich nicht signifikant in den Einzelfrequenzen und dem Frequenzverlauf. Somit ist die Ca^{2+} -Freisetzung unverändert in den Swim-Interventionstieren nach vier Wochen Training. Die Kontraktion ist unverändert über den gesamten Frequenzanstieg (Anova RM $p > 0,05$). Im paarweisen Vergleich zeigte sich eine stärkere Kontraktion der WT-Swim-Gruppe bei 4 Hz gegenüber der Kontrolle WT-Sham. Die stärkere Kontraktion des trainierten Tieres bei höherer Frequenz scheint damit auf den Trainingseffekt zurückzugehen. In den Studien von KEMI et al. (2007) zeigten die in einem Laufrad trainierten Mäuse eine signifikant verstärkte Kontraktion nach sechs Wochen. In den durch Schwimmen trainierten Tieren war der Effekt der verstärkten Kontraktion nach vier Wochen in den höheren Frequenzen (4 Hz und 8 Hz) deutlich ausgeprägt. Diese *in vitro* untersuchten Frequenzen entsprechen am ehesten der *in vivo* physiologischen Herzfrequenz der Maus. Somit zeigt sich der Trainingseffekt durch bessere Kontraktionseigenschaften bei höheren Herzfrequenzen im Swim-Interventionstier.

Die Kontraktionszunahme ab 2 Hz, vor allem im TG-Swim-Modell, bei gleich bleibenden bis fallenden Ca^{2+} -Transienten könnte Folge einer Ca^{2+} -Sensitivitätssteigerung der kontraktile Elemente sein. WISLOFF et al. (2001) konnten die gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität für trainierte Ratten nach zwei Wochen als Trend und in den nachfolgenden Wochen signifikant nachweisen. Ob nach vier Wochen Schwimmen eine maximale Austrainingung erreicht ist, ist nicht bekannt.

Die Relaxationsparameter rt_{50} ; rt_{80} und rt_{90} bezüglich der Ca^{2+} -Elimination und der Zellrelaxation zur Ausgangslänge sind im Swim-Interventionstier unverändert zu den untrainierten Kontrolltieren. Die Ca^{2+} -Transienten der PR 10 und PR 30 sind im Swim-Interventionstier gegenüber der Kontrolle WT-Sham gesenkt. Die NCX-Funktion ist im Interventionsvergleich stark erhöht ($p < 0,001$). Es könnte also zu einer Verschiebung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen nach extrazellulär während der Diastole kommen.

Im *caffeine*-Protokoll zeigte sich der SR- Ca^{2+} -Gehalt in der Swim-Interventionsgruppe unverändert zur Kontrolle WT-Sham. Die prozentuale Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bei normaler Kontraktion ist im Interventionsvergleich WT-Swim vs. WT-Sham signifikant vermindert ($p = 0,003$). Wie oben diskutiert scheint im trainierten Tier zur Erreichung derselben Kontraktionskraft eine geringere Ca^{2+} -Freisetzung hinreichend, so dass die prozentuale Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR pro Kontraktion reduziert werden konnte.

Die erhöhte NCX-Funktion im trainierten Tier ist auf den Trainingseffekt zurückzuführen. Die von KEMI et al. (2008) dargestellten schnelleren Relaxationen in den trainierten Tieren konnten im Swim-Interventionstier nicht reproduziert werden. Jedoch trägt in der Maus, wie bereits diskutiert, der NCX auch nur relativ gering zur Relaxation bei. In den von UNSÖLD et al. (2007) untersuchten Tieren konnte eine Volumenzunahme durch Hypertrophie und LVEDD Vergrößerung im trainierten Mausmodell (WT-Swim und TG-Swim) dargestellt werden. Das Swim-Modell befindet sich daher nach vier Wochen im Stadium der kompensierten Hypertrophie mit beginnender Ausprägung im *EC-Coupling*.

4.2.3.1. Melusineffekt bei den trainierten Tieren

Die diastolische Sarkomerlänge des TG-Swim-Tieres entspricht der Sarkomerlänge des Wildtyps. Der Ca^{2+} -Transient ist unverändert im Melusin überexprimierenden Tier. Der Genotypvergleich zur Kontraktilität stellte die Kontraktion im TG-Swim-Tier bei 8 Hz in der FF signifikant verstärkt dar ($p = 0,03$). Der unveränderte Ca^{2+} -Transient bei verstärkter Kontraktion unter 8 Hz im TG-Swim kann damit auf eine Sensitivitätssteigerung der Myofilamente im Melusin-TG-Tier hinweisen (HAJJAR und GWATHMEY 1992). Die stärkere Kontraktilität bei physiologischer Stimulationsfrequenz von 8 Hz im Melusin überexprimierenden Tier kann auf einen vorteilhaften Effekt des Melusins bei vier Wochen trainierten Tieren hinweisen. Die Kraft-Frequenzbeziehung ist jedoch global durch die Melusin-Überexpression nicht verändert. Die Relaxationsparameter rt_{50} ; rt_{80} und rt_{90} für die

Ca²⁺-Elimination und die Zellrelaxation bleiben unbeeinflusst von der Überexpression des Melusins.

Die PR-Potenzierung unterscheidet sich im transgenen Tier nicht signifikant vom Wildtyp, jedoch ist der Ca²⁺-Transient im TG-Swim vs. WT-Swim tendenziell kleiner. Wie der Unterschied der PR-Potenzierung zwischen WT-Sham und WT-Swim lässt sich auch die im TG-Swim etwas verminderte PR-Potenzierung durch die nocheinmal etwas höher gemessene NCX-Funktion im Vergleich zu den WT-Swim erklären. Hierdurch wird aus dem SR leckende Ca²⁺-Ionen nach extrazellulär eliminiert, anstelle via SERCA in das SR wieder aufgenommen zu werden. Dadurch erfolgt ein Abzug der SR-Ca²⁺ nach extrazellulär bei verlängerter Pause, mit folglich verringertem Ca²⁺-Transienten nach der Pause.

Der SR-Ca²⁺-Gehalt ist unverändert im Melusin-TG-Tier.

Das FR im TG-Swim mit circa 65 % ist dem Wildtyp mit circa 70 % ähnlich. Hinsichtlich der NCX-Aktivität konnte der Genotyp TG-Swim signifikant erhöht dargestellt werden. Die NCX-Funktion im transgenen Tier ist 1,2-fach erhöht gegenüber dem Wildtyp. Diese Aktivitätssteigerung gegenüber dem Wildtyp kann als Melusineffekt nach vierwöchiger physiologischer Belastung gewertet werden. Die stärkere Kontraktion bei 8 Hz und die erhöhte NCX-Aktivität deuten auf einen spezifischen Melusineffekt bei physiologischer Belastung hin.

4.2.4. Zusammenfassung Melusin

Die MI-Intervention zeigte im Mausmodell nach zwei Wochen die deutlichste Anpassung der *EC-Coupling*. Hierbei konnte eine Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente beobachtet werden, was zu einer verbesserten kontraktile Funktion im infarzierten Herz führt. Zusammengefasst zeigt das MI-Modell zwei Wochen nach Infarkt das Stadium der kompensierten Hypertrophie im *EC-Coupling*.

Die TAC-Intervention zeigte eine weniger starke Ausprägung der Anpassungsvorgänge der Ca²⁺-Homöostase und der Kontraktion. Diese sind jedoch in ihrer Tendenz mit den Anpassungsvorgängen der MI-Intervention vergleichbar. Die hämodynamische Druckbelastung im TAC-Interventionsmodell scheint nach zwei Wochen noch in einer früheren Phase der Anpassungsvorgänge des *EC-Coupling* bei ventrikulärer Hypertrophie zu stehen.

Die physiologische Belastung der trainierten Swim-Tiere stellte ein verbessertes *EC-Coupling* nur tendenziell dar. Es konnte ein frühes Stadium der adaptiven Hypertrophie bei physiologischer Belastung im *EC-Coupling* nachgewiesen werden.

Der für Melusin postulierte protektive Effekt für das *EC-Coupling* konnte weniger stark, jedoch nicht deutlich unter pathologischer sowie physiologischer hämodynamischer Belastung nachgewiesen werden. Keine Tendenz ergab sich bezüglich des Melusineffektes im *EC-Coupling* auf eine vorzeitige Insuffizienz beziehungsweise maladaptive Anpassung. Die Beurteilung von Melusin als alleiniges Strukturprotein ist hiernach nicht zu erwarten. Die

funktionelle Eingliederung von Melusin in die Hypertrophiesignalkaskade sowie als Teil eines Mechanosensor-Komplexes kann nicht abschließend beurteilt werden.

5. Anhang

5.1. Ergänzungen zu T-cap

5.1.1. Relaxationsparameter rt_{80} und rt_{90} des T-cap-KO vs. WT

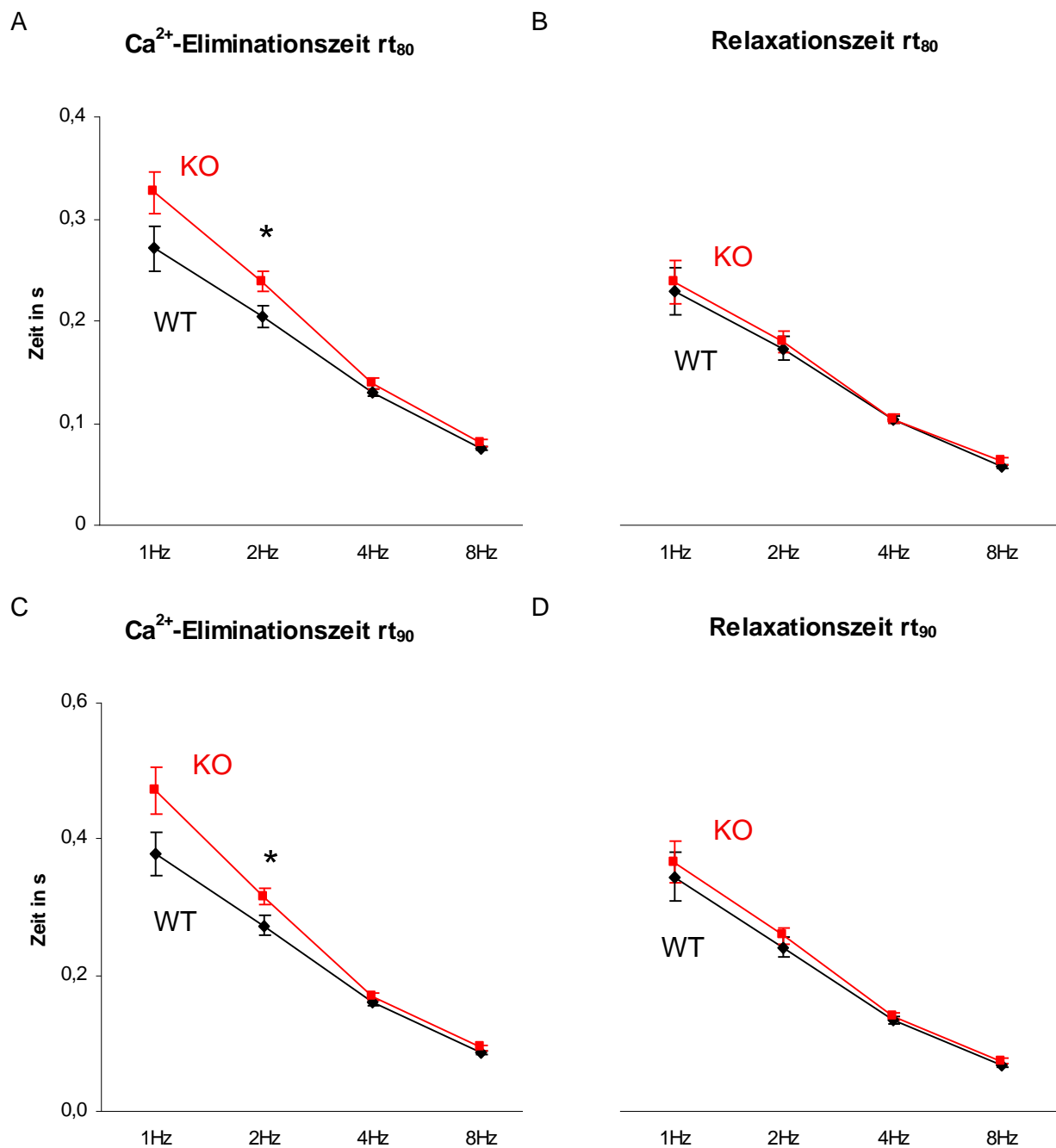


Abb. 5.1. A/ B/ C/ D

Erläuterungen siehe Text Abschnitt 3.1.3.1. (* signifikant vs. WT)

5.2. Ergänzungen zu Melusin

5.2.1. Ergänzung zur MI-Intervention

5.2.1.1. Ca²⁺-Eliminationszeit und Relaxationszeit t_{50}

Ca ²⁺ -Eliminationszeit t_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	112,6±3,4	92,2±2,2	66,4±0,8	43,9±0,5	
	Anzahl	58	58	56	43	
WT-MI	Mittelwerte±SEM	95,3±3,8	79,1±2,5	60,3±1,2	42,2±0,5	
	Anzahl	48	48	46	34	
TG-MI	Mittelwerte±SEM	100,8±2,8	83,9±1,9	63,6±1,0	43,0±0,6	
	Anzahl	58	58	56	26	
t-Test						
WT-Sham vs WT-MI		0,001	0,0001	<0,0001	0,02	0,001
WT-MI vs TG-MI		0,24	0,12	0,04	0,36	0,23

Tab. 5.1.

Tabellarische Darstellung der Ca²⁺-Eliminationszeit t_{50} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-MI und dem Genotypen WT-MI vs. TG-MI. Es zeigte sich eine signifikant schnellere Ca²⁺-Elimination in der Interventionsgruppe WT-MI vs. Kontrolle WT-Sham in den Einzelfrequenzen 1-8 Hz ($p < 0,05$) und im Vergleich über alle Frequenzen hinweg (Anova RM $p < 0,05$). Signifikant schnellere Ca²⁺-Elimination bei 4 Hz im Genotyp TG-MI vs. Kontrolle WT-MI. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI (Anova RM $p > 0,05$).

Relaxationszeit t_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	92,5±6,3	81,4±4,6	57,2±2,9	38,7±1,9	
	Anzahl	58	58	56	43	
WT-MI	Mittelwerte±SEM	78,0±6,2	69,4±4,9	51,2±3,0	36,1±1,5	
	Anzahl	48	48	46	34	
TG-MI	Mittelwerte±SEM	66,2±4,2	59,4±3,9	46,0±2,5	35,3±1,5	
	Anzahl	57	57	55	25	
t-Test						
WT-Sham vs WT-MI		0,11	0,08	0,15	0,30	0,11
WT-MI vs TG-MI		0,11	0,10	0,19	0,72	0,10

Tab. 5.2.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit t_{50} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-MI und dem Genotypen WT-MI vs. TG-MI. In den Einzelfrequenzen 1-8 Hz zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-MI bzw. WT-MI vs. TG-MI ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-MI bzw. WT-MI vs. TG-MI (Anova RM $p > 0,05$).

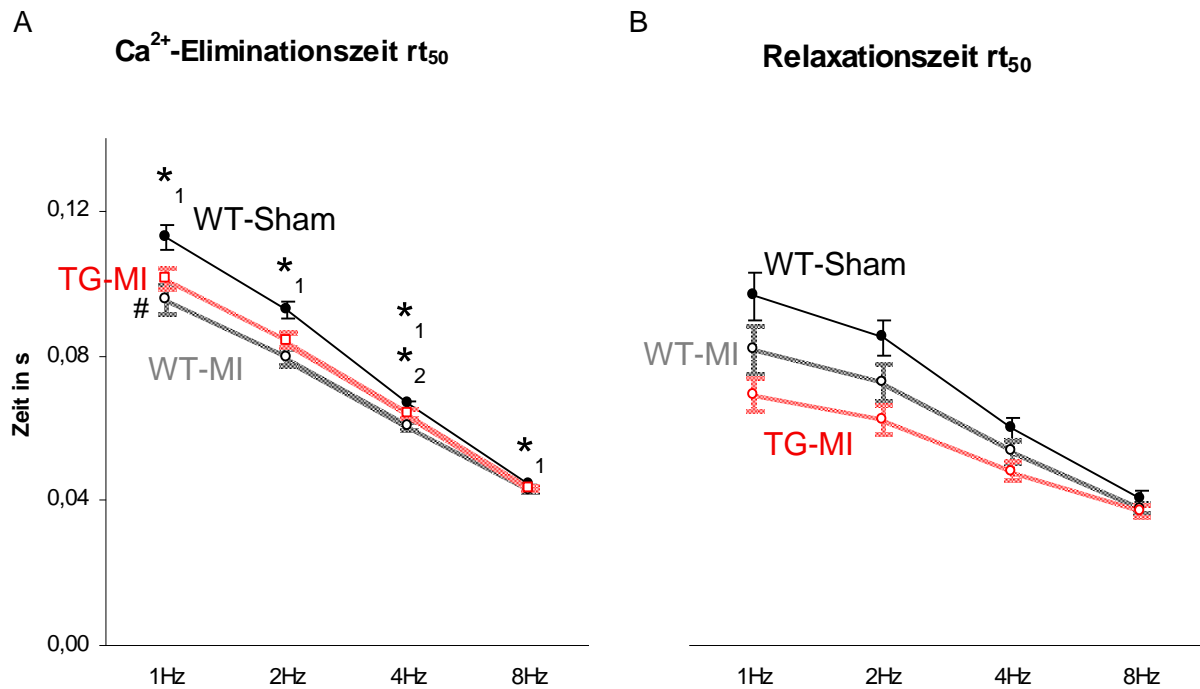


Abb. 5.2. A/B

(A) In der Ca²⁺-Eliminationszeit rt_{50} unterscheidet sich die MI-Intervention signifikant von der Kontrolle WT-Sham in den Einzelfrequenzen 1-8 Hz (*¹ signifikant WT-Sham vs. WT-MI $p < 0,05$). Der 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte im WT-MI eine signifikant verkürzte Ca²⁺-Eliminationszeit vs. WT-Sham (# signifikant Anova RM $p < 0,05$). Der Melusin-Genotyp TG-MI unterscheidet sich nur bei 4 Hz signifikant vom WT-MI (*² signifikant WT-MI vs. TG-MI $p < 0,05$).

(B) Die Relaxationszeit rt_{50} ist im MI-Interventionstier nicht unterschiedlich in den Einzelfrequenzen 1-8 Hz vs. der Kontrolle WT-Sham. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich kein Unterschied im WT-MI vs. WT-Sham (Anova RM $p > 0,05$). Im Genotypvergleich kein signifikanter Unterschied in der Relaxationszeit rt_{50} vs. WT-MI.

5.2.1.2. Ca²⁺-Eliminationszeit und Relaxationszeiten rt_{90}

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	335,0±12,3	260,0±6,1	160,8±1,8	86,7±0,5	
	Anzahl	58	58	56	43	
WT-MI	Mittelwerte±SEM	272,3±13,3	217,3±7,8	142,9±3,0	83,0±0,8	
	Anzahl	48	48	46	34	
TG-MI	Mittelwerte±SEM	290,9±10,9	230,3±6,6	148,1±2,4	82,9±0,6	
	Anzahl	57	57	55	25	
		t-Test				Anova RM
	WT-Sham vs WT-MI	0,001	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,001
	WT-MI vs TG-MI	0,28	0,20	0,16	0,96	0,50

Tab. 5.3.

Tabellarische Darstellung der Ca²⁺-Eliminationszeit rt_{90} im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-MI und dem Genotypvergleich WT-MI vs. TG-MI. Es zeigte sich eine signifikant schnellere Ca²⁺-Elimination in der Interventionsgruppe WT-MI vs. der Kontrolle WT-Sham in den vier Einzelfrequenzen ($p < 0,05$) und im Vergleich über alle Frequenzen hinweg (Anova RM $p < 0,05$).

Relaxationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	284,1 \pm 18,0	217,7 \pm 9,0	119,4 \pm 4,6	60,9 \pm 2,1
	Anzahl	58	58	56	43
WT-MI	Mittelwerte \pm SEM	227,2 \pm 19,0	175,7 \pm 10,9	106,5 \pm 4,9	58,2 \pm 1,8
	Anzahl	48	48	46	34
TG-MI	Mittelwerte \pm SEM	202,5 \pm 13,2	159,4 \pm 9,0	98,9 \pm 4,0	56,9 \pm 1,4
	Anzahl	57	57	55	25

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-MI	0,03	0,003	0,06	0,34	0,047
WT-MI vs TG-MI	0,28	0,25	0,23	0,60	0,14

Tab. 5.4.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{90} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-MI und dem Genotypen WT-MI vs. TG-MI.

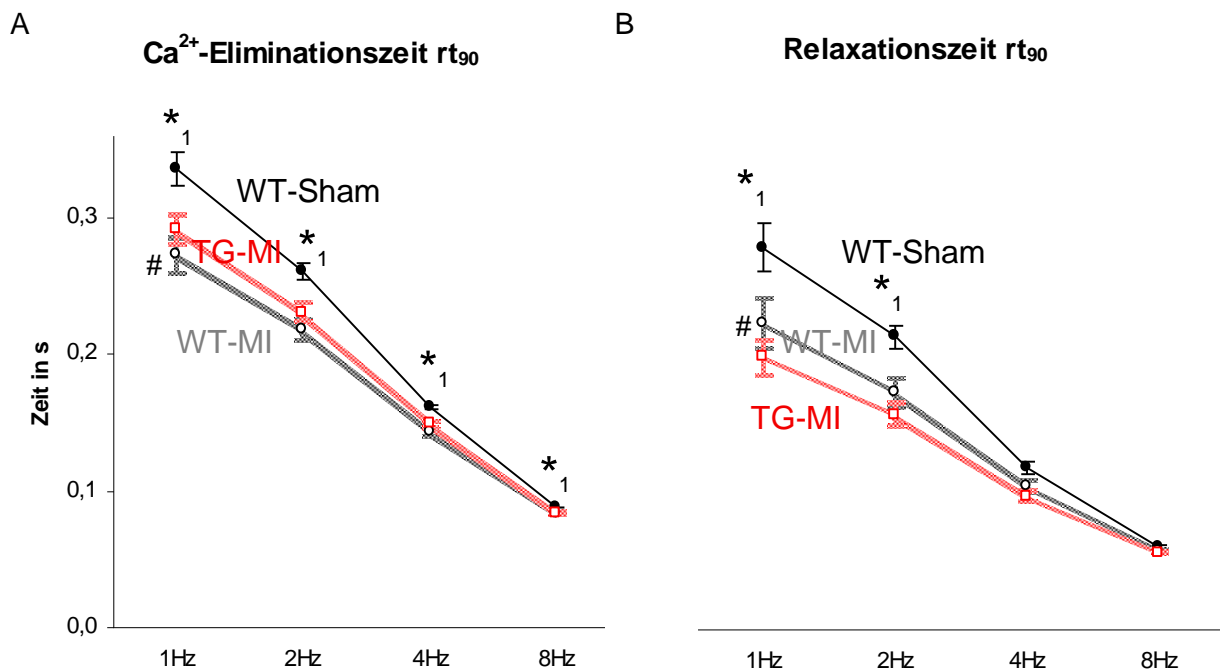


Abb. 5.3. A/B

(A) In der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} unterscheidet sich die MI-Intervention signifikant von der Kontrolle WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz (*¹ signifikant WT-Sham vs. WT-MI $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich im WT-MI eine signifikant verkürzte Ca^{2+} -Eliminationszeit vs. WT-Sham (# signifikant Anova RM $p < 0,05$). Der Genotyp Melusin-TG unterscheidet sich nicht signifikant in der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} vom WT-MI.

(B) Die Relaxationszeit rt_{90} ist im MI-Interventionstier signifikant schneller bei 1 und 2 Hz (*¹ signifikant WT-Sham vs. WT-MI $p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich eine signifikant schnellere Relaxation zwischen WT-MI vs. WT-Sham (# signifikant Anova RM $p < 0,05$). Der Genotyp Melusin-TG unterscheidet sich nicht signifikant in der Relaxationszeit rt_{90} vom WT-MI.

5.2.1.3. Post Rest 60

Die prozentuale Änderung des Ca^{2+} -Transienten zur Ausgangslage stellt sich bei der PR 60 wie folgt dar: WT-Sham 143,7 \pm 4,5 %; WT-MI 121,3 \pm 5,2 % und im TG-MI 134,1 \pm 4,8 %. Die PR 60 ist signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage von 1 Hz ($p < 0,05$). Die PR 60 ist im Interventionstier WT-MI mit 2,9 \pm 0,3 F/F_0 signifikant kleiner gegenüber der Kontrolle WT-Sham 3,6 \pm 0,2 F/F_0 ($p = 0,04$; siehe Abb. 5.4). Der Genotyp TG-MI 3,7 \pm 0,3 F/F_0 zeigte vs. Kontrolle WT-MI keine signifikante Änderung ($p = 0,06$; siehe Abb. 5.4.).

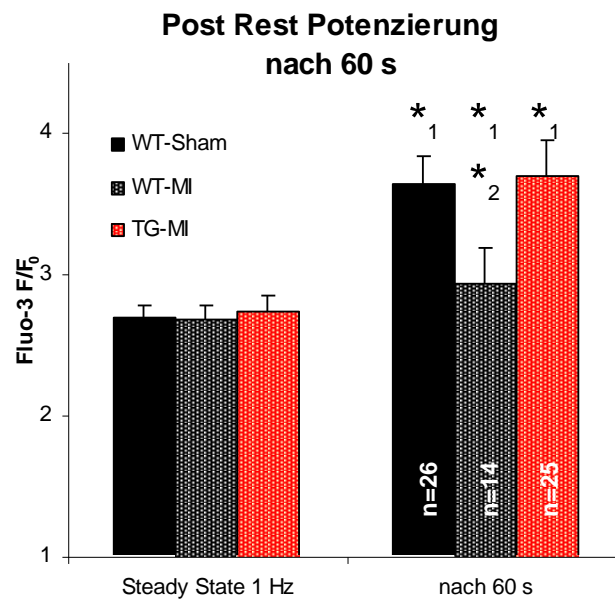


Abb. 5.4.

Dargestellt ist die PR 60. Die Ca^{2+} -Transients sind signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage (*¹ $p < 0,05$). Die Ca^{2+} -Transients der Interventionsgruppe WT-MI sind signifikant kleiner gegenüber der Kontrolle WT-Sham (*² WT-Sham vs. WT-MI $p = 0,04$). Der Genotyp TG-MI ist nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle WT-MI ($p > 0,05$).

5.2.2. Ergänzungen zur TAC-Intervention

5.2.2.1. Ca^{2+} -Eliminationszeit und Relaxationszeit rt_{50}

Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	125,9 \pm 4,4	98,4 \pm 2,7	69,3 \pm 1,4	45,1 \pm 0,6	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte \pm SEM	116,3 \pm 5,6	91,5 \pm 3,6	66,8 \pm 1,6	42,1 \pm 1,9	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte \pm SEM	111,0 \pm 4,6	90,8 \pm 3,0	67,2 \pm 1,5	44,4 \pm 0,6	
	Anzahl	55	54	52	29	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,18	0,13	0,25	0,10	0,16
WT-TAC vs TG-TAC		0,46	0,88	0,84	0,21	0,65

Tab. 5.5.

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{50} der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham und dem Genotyp TG-TAC vs. WT-TAC. Hierbei unterscheiden sich die Ca^{2+} -Eliminationszeiten der rt_{50} nicht signifikant. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen (Anova RM $p > 0,05$; siehe Abb. 5.5.).

Relaxationszeit S rt_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	75,9 \pm 4,8	67,5 \pm 3,9	51,0 \pm 2,4	37,7 \pm 1,3	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte \pm SEM	80,4 \pm 6,8	69,2 \pm 4,8	50,1 \pm 3,04	35,0 \pm 1,7	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte \pm SEM	88,6 \pm 6,8	78,3 \pm 5,2	50,6 \pm 3,1	37,0 \pm 1,7	
	Anzahl	55	54	51	28	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,59	0,77	0,81	0,20	0,87
WT-TAC vs TG-TAC		0,40	0,21	0,92	0,41	0,51

Tab. 5.6.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{50} . Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen im WT-TAC vs. WT-Sham und TG-TAC vs. WT-TAC ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied im TAC-Interventionstier WT-TAC vs. WT-Sham und dem Genotypen TG-TAC vs. WT-TAC (Anova RM $p > 0,05$; siehe Abb. 5.5.B).

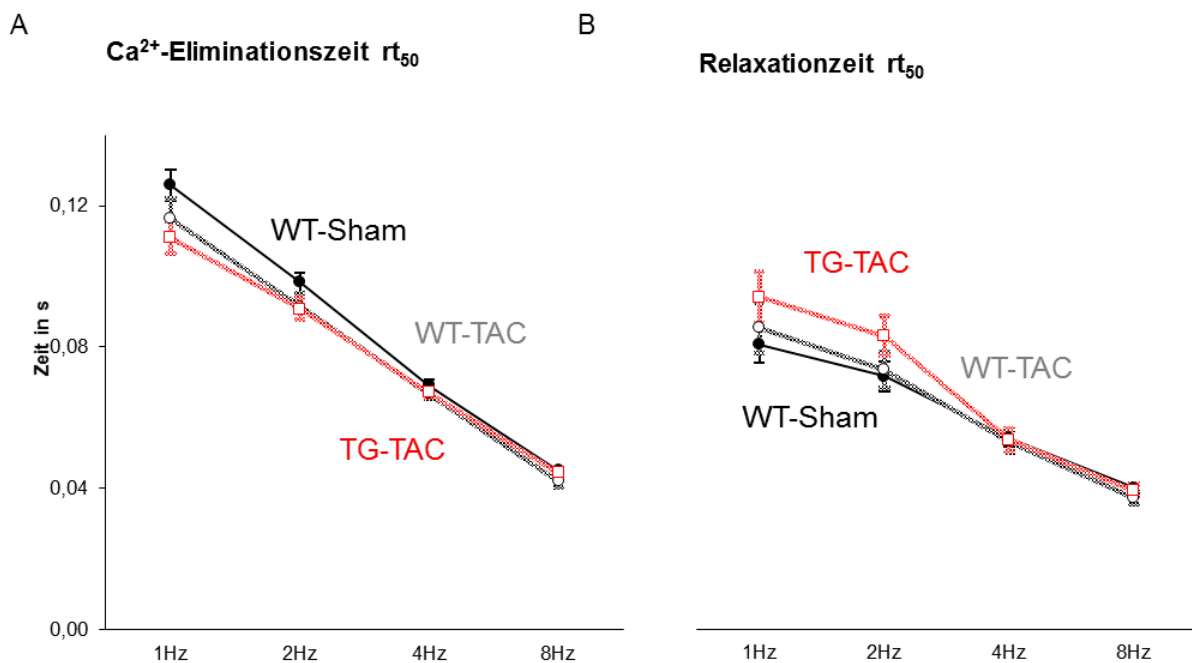


Abb. 5.5. A/ B

Darstellung der Relaxationszeit rt_{50} für die Ca²⁺-Elimination und die Zellverkürzung. Kein signifikanter Unterschied in den Einzelfrequenzen der FF im TAC-Interventionstier WT-TAC vs. WT-Sham und dem Genotypen TG-TAC vs. WT-TAC ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen (Anova RM $p > 0,05$; vergleiche Tab. 5.5. und 5.6.).

5.2.2.2. Ca²⁺-Eliminationszeit und Relaxationszeiten rt_{90}

Ca ²⁺ -Eliminationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	360,3±14,4	265,9±7,6	157,4±3,3	88,3±0,8	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte±SEM	334,8±19,4	244,7±10,2	154,8±3,6	84,7±3,8	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte±SEM	311,3±15,1	241,4±8,3	152,7±3,2	84,2±1,3	
	Anzahl	55	54	52	29	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,29	0,10	0,59	0,29	0,28
WT-TAC vs TG-TAC		0,33	0,80	0,65	0,88	0,48

Tab. 5.7.

Tabellarische Darstellung der Ca²⁺-Eliminationszeit rt_{90} . In der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham und dem Genotypen TG-TAC vs. WT-TAC unterscheiden sich die Relaxationszeiten der rt_{90} nicht signifikant. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen (Anova RM $p > 0,05$; siehe Abb. 5.6.A).

Relaxationszeit S rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	266,2±17,5	202,7±11,1	113,5±4,9	64,9±1,5	
	Anzahl	49	49	48	31	
WT-TAC	Mittelwerte±SEM	253,6±19,3	201,8±10,0	109,4±4,6	58,2±2,0	
	Anzahl	49	49	47	24	
TG-TAC	Mittelwerte±SEM	256,0±19,2	197,0±10,8	98,3±5,4	58,1±1,5	
	Anzahl	55	54	51	28	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-TAC		0,63	0,95	0,54	0,01	0,58
WT-TAC vs TG-TAC		0,93	0,74	0,12	0,96	0,76

Tab. 5.8.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{90} . In der Einzelfrequenz von 8 Hz zeigte sich eine signifikant schnellere Relaxation im WT-TAC vs. WT-Sham ($p < 0,05$; siehe Abb. 5.6.B). In den Einzelfrequenzen von 1-4 Hz zeigte sich keine signifikant schnellere Relaxation im Interventionstier WT-TAC vs. WT-Sham. Bezüglich des Genotyps zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der rt_{90} der Zellverkürzung ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC bzw. WT-TAC vs. TG-TAC (Anova RM $p > 0,05$).

Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{90} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-4 Hz als Folge der Aortenkonstriktion erkannt werden. Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{90} konnte bei 8 Hz ein signifikanter Unterschied in der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham erkannt werden ($p = 0,01$; siehe Abb. 5.6.B). In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich dieser signifikante Unterschied der Interventionsgruppe WT-TAC vs. WT-Sham bei 8 Hz nicht (Post-Hoc $p = 0,83$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-TAC (Anova RM $p = 0,53$).

Der Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC bezüglich der Relaxationszeit rt_{90} zeigte in den Einzelfrequenzen und im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 5.8.).

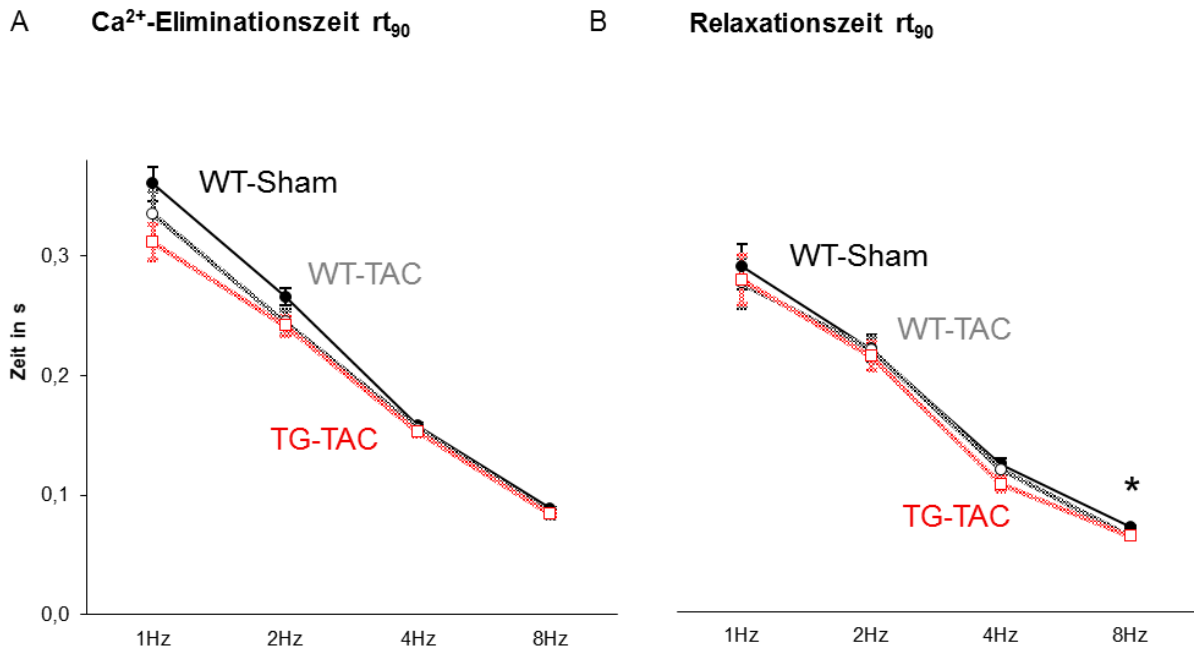


Abb. 5.6. A/B

Darstellung der Relaxationsparameter r_{t90} für die Ca^{2+} -Elimination und das *shortening*. Hinsichtlich der Relaxation r_{t90} der Zellverkürzung zeigte sich im Vergleich der Einzelfrequenzen bei 8 Hz eine signifikant schnellere Relaxation im Interventionsstier WT-TAC vs. WT-Sham (* WT-Sham vs. WT-TAC $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen 1-4 Hz ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-TAC (Anova RM $p > 0,05$). Keine signifikanter Unterschied im Genotypvergleich TG-TAC vs. WT-TAC (siehe Tab. 5.7. und 5.8.)

5.2.3. Ergänzungen zur Swim-Intervention

5.2.3.1. Ca^{2+} -Eliminationszeit und Relaxationzeit r_{t50}

Die 50 % Ca^{2+} -Eliminationszeit (r_{t50}) zeigte folgende Werte:

Ca^{2+} -Eliminationszeit r_{t50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte±SEM	107,2±2,9	88,6±2,0	65,0±1,0	43,2±0,5	
	Anzahl	53	53	53	31	
WT-Swim	Mittelwerte±SEM	104,9±2,8	86,5±2,0	63,8±1,0	42,7±0,6	
	Anzahl	65	65	64	33	
TG-Swim	Mittelwerte±SEM	104,4±5,1	87,7±3,2	63,9±1,6	41,9±0,8	
	Anzahl	49	49	48	27	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim		0,58	0,46	0,41	0,46	0,39
WT-Swim vs TG-Swim		0,92	0,74	0,96	0,42	0,67

Tab. 5.9.

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Eliminationszeit r_{t50} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

Die 50 %-Relaxation (rt_{50}) der Zellverkürzung zeigte folgende Werte:

Relaxationszeit S rt_{50} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	82,9 \pm 5,1	76,0 \pm 4,3	56,8 \pm 2,4	35,9 \pm 1,8
	Anzahl	53	53	53	31
WT-Swim	Mittelwerte \pm SEM	85,6 \pm 4,5	76,9 \pm 3,8	55,1 \pm 2,3	39,7 \pm 1,4
	Anzahl	65	65	64	33
TG-Swim	Mittelwerte \pm SEM	90,1 \pm 7,3	74,0 \pm 4,1	49,0 \pm 2,2	35,4 \pm 1,5
	Anzahl	49	49	49	28

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim	0,69	0,87	0,59	0,10	0,99
WT-Swim vs TG-Swim	0,58	0,60	0,07	0,04	0,40

Tab. 5.10.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{50} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim ($p > 0,05$). In der Einzelfrequenzen von 8 Hz in der FF ergab sich ein signifikanten Unterschied in dem Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim ($p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigten sich über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

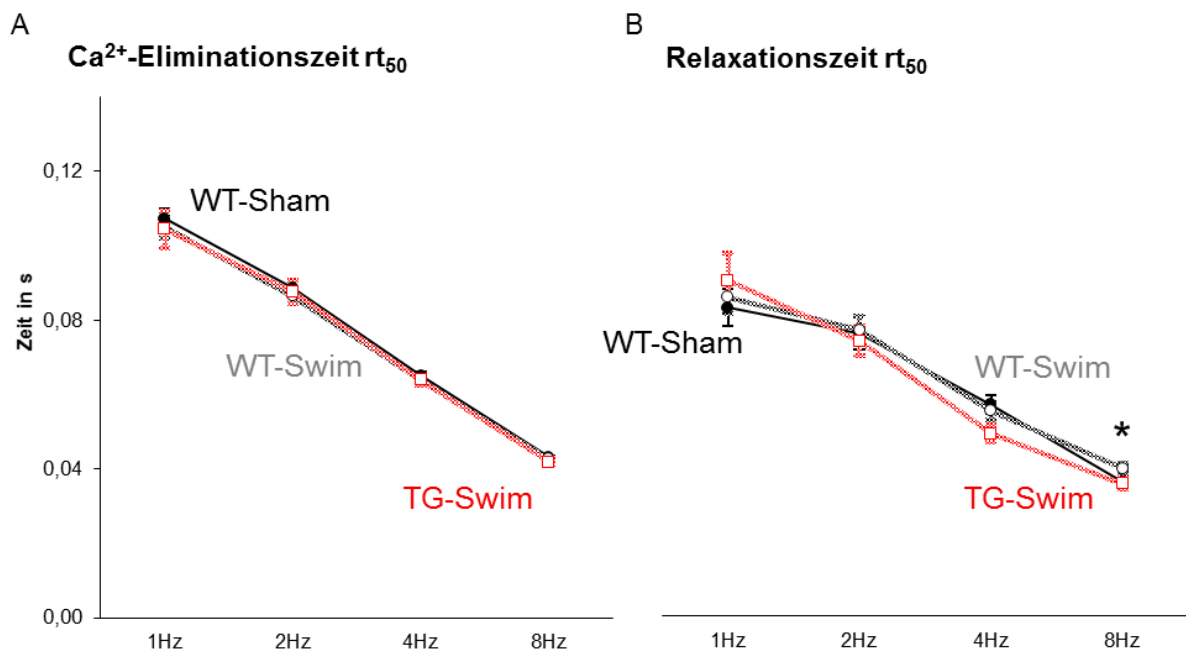


Abb. 5.7. A/B

Darstellung der Relaxationsparameter rt_{50} für die Ca^{2+} -Elimination und das *shortening*. Im Vergleich der Einzelfrequenzen zeigte sich in der Ca^{2+} -Elimination kein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-Swim vs. WT-Sham und dem Genotyp TG-Swim vs. WT-Swim. Hinsichtlich der Relaxation der Zellverkürzung zeigte sich im Vergleich der Einzelfrequenzen bei 8 Hz eine signifikant schnellere Relaxation im Genotypvergleich TG-Swim vs. Kontrolle WT-Swim (* WT-Swim vs. TG-Swim $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen 1-4 Hz ($p > 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{50} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-Swim vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Trainings erkannt werden (siehe Tab. 5.10.; siehe Abb. 5.7.B). Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{50} der Zellverkürzung konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz erkannt werden. In der Post-Hoc-Analyse zeigte

sich dieser signifikante Unterschied des Genotyps TG-Swim vs. WT-Sham bei 8 Hz nicht (Post-Hoc $p=0,18$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,53$) bzw. dem WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,95$).

5.2.3.2. Ca^{2+} -Eliminationszeit und Relaxationzeit rt_{90}

Die 90 % Ca^{2+} -Eliminationszeit (rt_{90}) zeigte folgende Werte:

Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	313,5 \pm 11,6	251,0 \pm 6,4	156,8 \pm 2,6	86,3 \pm 0,8	
	Anzahl	53	53	53	31	
WT-Swim	Mittelwerte \pm SEM	312,8 \pm 11,1	243,4 \pm 7,4	150,5 \pm 2,6	84,6 \pm 0,9	
	Anzahl	65	65	64	33	
TG-Swim	Mittelwerte \pm SEM	308,6 \pm 15,6	244,8 \pm 7,7	149,6 \pm 2,5	81,1 \pm 0,9	
	Anzahl	49	49	48	27	
		t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim		0,97	0,45	0,09	0,15	0,63
WT-Swim vs TG-Swim		0,82	0,90	0,80	0,01	0,95

Tab. 5.11.

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim ($p>0,05$). In der Einzelfrequenz der FF ergab sich bei 8 Hz signifikanter Unterschied im Genotypenvergleich TG-Swim vs. WT-Swim ($p<0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigten sich über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p>0,05$).

Hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-Swim vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Trainings erkannt werden. Hinsichtlich der Ca^{2+} -Eliminationszeit rt_{90} konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz erkannt werden ($p=0,01$). In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich dieser signifikante Unterschied des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz (Post-Hoc $p=0,83$) nicht. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,63$) bzw. dem WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,95$; (siehe Tab. 5.11.; siehe Abb. 5.7.A /B).

Die 90 %-Relaxationszeit (rt_{90}) zeigte folgende Werte:

Relaxationszeit S rt_{90} in ms		1Hz	2Hz	4Hz	8Hz
WT-Sham	Mittelwerte \pm SEM	254,6 \pm 14,7	202,8 \pm 9,2	115,9 \pm 3,8	56,9 \pm 2,3
	Anzahl	53	53	53	31
WT-Swim	Mittelwerte \pm SEM	264,2 \pm 14,5	195,6 \pm 8,7	106,0 \pm 4,1	59,6 \pm 1,4
	Anzahl	65	65	64	33
TG-Swim	Mittelwerte \pm SEM	256,4 \pm 18,5	181,1 \pm 8,9	94,4 \pm 4,3	54,5 \pm 1,7
	Anzahl	49	49	49	28

	t-Test				Anova RM
WT-Sham vs WT-Swim	0,65	0,57	0,08	0,32	0,70
WT-Swim vs TG-Swim	0,74	0,26	0,06	0,02	0,21

Tab. 5.12.

Tabellarische Darstellung der Relaxationszeit rt_{90} in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypen WT-Swim vs. TG-Swim. In den Einzelfrequenzen der FF ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Interventionsgruppe WT-Sham vs. WT-Swim ($p > 0,05$). In der Einzelfrequenz von 8 Hz der FF ergab sich eine signifikant schnellere Relaxation im Genotyp TG-Swim vs. WT-Swim ($p < 0,05$). Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigten sich über alle Einzelfrequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

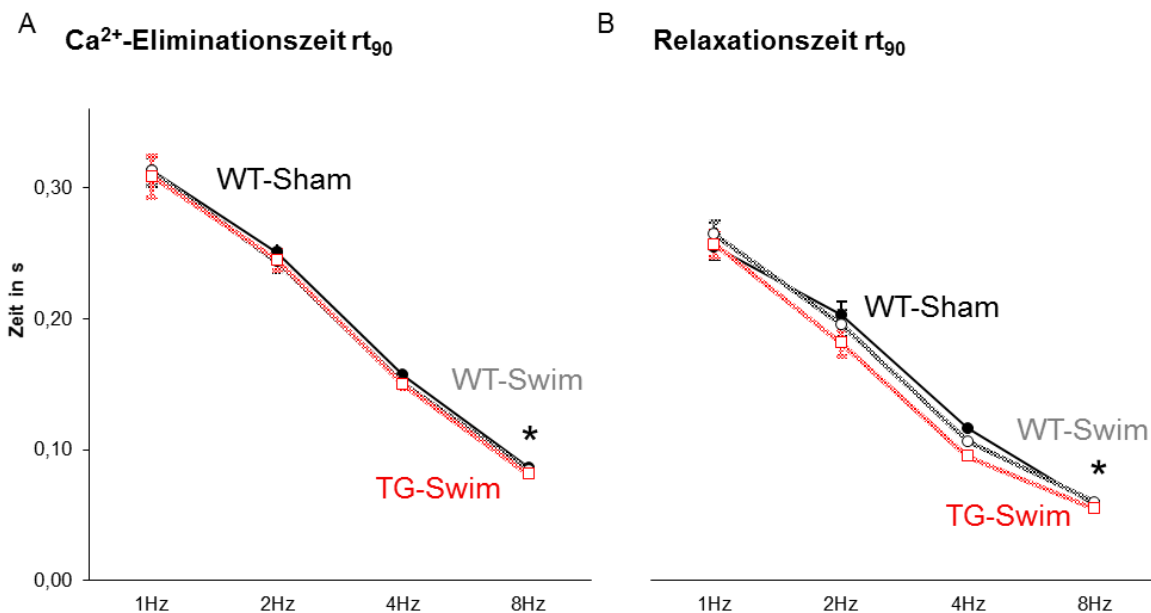


Abb. 5.8. A/B

Darstellung der Relaxationsparameter rt_{90} für die Ca^{2+} -Elimination und die Zellverkürzung. Im Vergleich der Einzelfrequenzen zeigte sich in der rt_{90} für die Ca^{2+} -Elimination und die Zellverkürzung kein signifikanter Unterschied im Interventionstier WT-Swim vs. WT-Sham ($p > 0,05$). Im Vergleich der Einzelfrequenzen zeigte sich bei 8 Hz in der rt_{90} für die Ca^{2+} -Elimination und die Zellverkürzung ein signifikanter Unterschied im Genotyp TG-Swim vs. WT-Swim (* WT-Swim vs. TG-Swim $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede in den Einzelfrequenzen 1-4 Hz ($p > 0,05$) im Genotypvergleich TG-Swim vs. WT-Swim. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Sham vs. WT-Swim bzw. WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p > 0,05$).

Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{90} der Zellverkürzung konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Interventionsgruppe WT-Swim vs. WT-Sham in den Einzelfrequenzen von 1-8 Hz als Folge des Trainings erkannt werden. Hinsichtlich der Relaxationszeit rt_{90} der Zellverkürzung konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz erkannt werden ($p = 0,02$). In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich dieser signifikante Unterschied des Genotyps TG-Swim vs. WT-Swim bei 8 Hz (Post-Hoc $p = 0,28$)

nicht. Im 2-Wege-Anova für wiederholte Messungen zeigte sich über alle Einzelfrequenzen hinweg kein signifikanter Unterschied zwischen dem WT-Sham vs. WT-Swim (Anova RM $p=0,70$) bzw. dem WT-Swim vs. TG-Swim (Anova RM $p=0,21$; siehe Tab. 5.12; siehe Abb. 5.8.A /B).

5.2.3.3. Post Rest 60

Die prozentuale Änderung zur Ausgangslage von 1 Hz stellt sich bei der RR 60 wie folgt dar: WT-Sham $138,5 \pm 5,7$ %; WT-Swim $134,2 \pm 4,8$ % und im TG-Swim $117,1 \pm 2,3$ %. Die PR 60 ist im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim und im Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim nicht signifikant verändert. (PR 60 F/F_0 : WT-Sham $3,4 \pm 0,2$ F/F_0 vs. WT-Swim $3,6 \pm 0,6$ F/F_0 $p=0,77$ und WT-Swim vs. TG-Swim $2,9 \pm 0,2$ F/F_0 $p=0,29$; siehe Abb. 5.9).

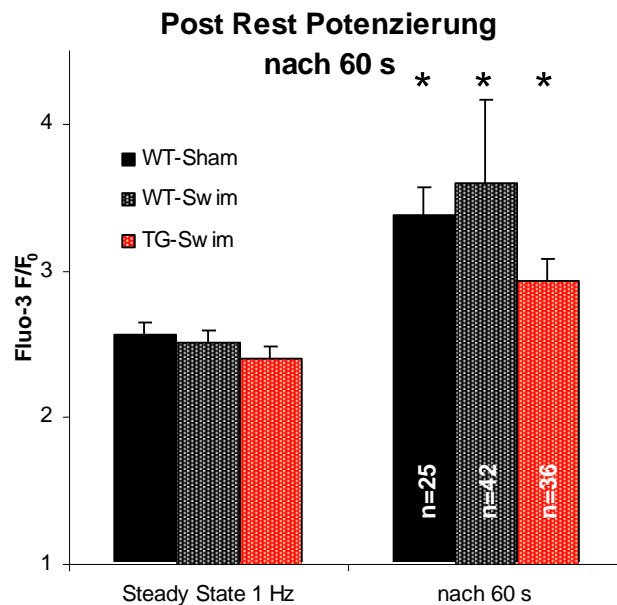


Abb. 5.9.

Darstellung des Ca^{2+} -Transienten vor und nach 60 s Pause (PR). Die PR 60 Ca^{2+} -Transienten sind signifikant erhöht gegenüber der Ausgangslage bei 1 Hz (* $p<0,05$). Die PR 60 unterscheidet sich nicht signifikant im Interventionsvergleich WT-Sham vs. WT-Swim und dem Genotypvergleich WT-Swim vs. TG-Swim ($p>0,05$).

6. Zusammenfassung

Ein zentrales Forschungsgebiet ist die Untersuchung von Hypertrophiesignalen. Diese Signale werden durch ein neurohumorales und ein intrazelluläres System eingeleitet. Das intrazelluläre System wird möglicherweise durch Mechanosensoren, die im Zytoskelett verankert sind, reguliert. Die Proteine Melusin und T-cap konnten als Zytoskelettbestandteile der Kardiomyozyte zugeordnet werden. Von ihnen wird vermutet, dass sie wichtiger Bestandteil des Mechanosensors sein könnten.

T-cap liegt in der Z-Linie und ist als Interaktionspartner des K^+ -Kanals I_{Ks} postuliert worden. Der Verlust von T-cap führt zur DCM. Der Verlust des K^+ -Kanals I_{Ks} führt - über eine verlängerte APD - zum *long-QT-syndrome*. Die T-cap-Maus wurde daher zu den Erregungseigenschaften und dem *EC-Coupling* mittels EKG, *patch-clamp* und Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Primäre Hypothese war, dass es im T-cap-KO-Tier zu einer verzögerten Repolarisation und damit eventuell zu einem *long-QT-syndrome* kommen könnte. Diese Hypothese konnte nicht belegt werden. Ebenso scheint T-cap keinen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung im Kardiomyozyten zu haben.

Melin bildet eine Verbindung zwischen den in der Zellmembran gelegenen β_1 -Integrinen und den Sarkomeren. Funktionell konnte der Melusinverlust mit einer DCM und die Melusin-Überexpression mit einem verlängerten Intervall kompensierter Hypertrophie bei hämodynamischer Druckbelastung (TAC) in Zusammenhang gebracht werden. Hypothese für das Melusin-TG-Tier war dementsprechend ein protektiver Effekt bei pathologischer (TAC und MI) und physiologischer (Swim) Belastung. Hierfür wurde die elektromechanische Kopplung in diesen Tieren untersucht.

Das MI-Interventionsmodell zeigte nach zwei Wochen eine verbesserte Kontraktilität, welche auf die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Elemente zurückzugehen scheint. Weiterhin konnten schnellere Relaxationszeiten im MI-Modell dargestellt werden. In der TAC- und Swim-Intervention zeigten sich solche Effekte nicht. Tendenziell bis signifikant konnte eine Erhöhung der NCX-Funktion in allen drei Modellen erkannt werden. Es scheint, dass die protektiven Effekte der Melusin-Überexpression abhängig von der Art der jeweiligen kardialen Belastung sind und dass sich diese Effekte auf Veränderungen in der Sarkomerfunktion, nicht jedoch auf einen direkten Einfluss auf das zelluläre Ca^{2+} -Handling zurückführen lassen.

7. Literaturverzeichnis

Anumonwo JMB, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J (2001): Action Potential Characteristics and Arrhythmogenic Properties of the Cardiac Conduction System of the Murine Heart. *Circ Res* 89, 329-335

Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M (1993): Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure: A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res* 72, 463-469

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996): K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80

Barki-Harrington L, Rockman HA (2003): Sensing heart stress. *Nature* 9, 19-20

Bassani RA, Bers DM (1995): Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J* 68, 2015-2022

Beecher HK (1961): Surgery as placebo: a quantitative study of bias. *Int Anesthesiol Clin* 45, 35-45

Bers DM: *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2 Auflage; Kluwer Academic Publishers/ Springer, Dordrecht 2001

Bers DM (2002a): Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Bers DM (2002b): Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 7, d1697-d1711

Bers DM, Bassani RA, Bassani JW, Baudet S, Hryshko LV (1993): Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J Mol Cell Cardiol* 25, 1047-1057

Bertz M, Wilmanns M, Rief M (2009): The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 13307-13310

Berul CI (2003): Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol Genomics* 13, 207–216

Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39, 13-23

Bos JM, Poley RN, Ny M, Tester DJ, Xu X, Vatta M, Towbin JA, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ (2006): Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab* 88(1), 78-85

Brady AJ (1991): Mechanical properties of isolated cardiac myocytes. *Physiol Rev* 71, 413-428

Brancaccio M, Guazzone S, Menini N, Sibona E, Hirsch E, De Andrea M, Rocchi M, Altruda F, Tarone G, Silengo L (1999): Melusin is a New Muscle-specific Interactor for β 1 Integrin Cytoplasmic Domain. *J Biol Chem* 274, 29282–29288

Brancaccio M, Menini N, Bongioanni D, Ferretti R, De Acetis M, Silengo L, Tarone G (2003a): Chp-1 and melusin, two CHORD containing proteins in vertebrates. *FEBS Letters* 551, 47-52

Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Al Truda F et al. (2003b): Melusin, a muscle-specific integrin β 1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9, 68-75

Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G (2006): Integrin signalling: The tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res* 70, 422 – 433

Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM (2004): Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 559, 103-120

Busch AE, Suessbrich H (1997): Role of the IsK protein in the IminK channel complex. *Trends Pharmacol Sci* 18, 26-29

Charpentier F, Merot J, Riochet D, Le Marec H, Escande D (1998): Adult KCNE1-knock out mice exhibit a mild cardiac cellular phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 806-810

Cranefield PF, Aronson RS (1988): Torsade de pointes and other pause-induced ventricular tachycardias: the short-long-short sequence and early afterdepolarizations. *Pacing Clin Electrophysiol* 11, 670-678

Csapo A, Erdos T, De Mattos CR, Gramss E, Moscovitz C (1965): Stretch-induced uterine growth, protein synthesis and function. *Nature* 207, 1378-1379

De Acetis M, Notte A, Accornero F, Selvetella G, Brancaccio M, Vecchione C, Sbroggiò M, Collino F, Pacchioni B, Lanfranchi G et al. (2005): Cardiac Overexpression of Melusin Protects From Dilated Cardiomyopathy Due to Long-Standing Pressure Overload. *Circ Res* 96, 1087-1094

De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM (2006): Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R926-934

De Tombe PP (1998): Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 367-380

Donker DW, Maessen JG, Verheyen F, Ramaekers FC, Spätjens RL, Kuijpers H, Ramakers C, Schiffers PM, Vos MA, Crijns HJ et al. (2007): Impact of acute and enduring volume overload on mechanotransduction and cytoskeletal integrity of canine left ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2324–H2332

Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J (1998): Involvement of IsK-associated K⁺ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res* 83, 95-102

Du XJ, Gao XM, Ramsey D (1998): Surgical methods of inducing transverse aortic stenosis and myocardial infarction in the mouse. *Asia Pacific Heart J* 7, 187–192

Einthoven W (1906): Le telecardiogramme. Arch Int de Physiol 4, 132-164 (translated into English: The ECG (1957) Am Heart J 53, 602-615

Endoh M (2004): Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. Eur J Pharmacol 500, 73-86

Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE (2003): Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Braz J Med Biol Res 36, 1751-1759

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J Physiol 249, 469-495

Frey N, Olson EN (2002): Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. J Biol Chem 277, 13998-14004

Furukawa T, Ono Y, Tsuchiya H, Katayama Y, Bang ML, Labeit D, Labeit S, Inagaki N, Gregorio CC (2001): Specific interaction of the Potassium Channel β -subunit minK with the Sarcomeric Protein T-cap Suggests a T-tubule-Myofibril Linking System. J Mol Biol 313, 775-784

Gregorio CC, Trombitás K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H et al. (1998): The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. J Cell Biol 143, 1013-1027

Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJ, Mohler PJ, Anderson ME, Colbran RJ (2006): L-type Ca^{2+} channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. Mol Cell 23, 641-650

Gupta MP (2007): Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. J Mol Cell Cardiol 43, 388-403

Hajjar RJ, Gwathmey JK (1992): Cross-bridge dynamics in human ventricular myocardium. Regulation of contractility in the failing heart. Circulation 86, 1819-1826

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100

Hamrell BB, Roberts ET, Carkin JL, Delaney CL (1986): Myocyte morphology of free wall trabeculae in right ventricular pressure overload hypertrophy in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 18, 127-138

Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I (1999): Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* 100(20), 2093-2099

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* 4 75, 434-442

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, Just H (1996): Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2, 17-22

Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H (1997): Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 1, 87-93

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99, 641-648

Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H et al. (2004): Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44, 2192-2201

Huxley HE (1969): The Mechanism of Muscular Contraction. *Science* 164, 1356-1365

Inui M, Chamberlain BK, Saito A, Fleischer S (1986): The nature of the modulation of Ca²⁺ transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 261, 1794-1800

Inui M, Saito A, Fleischer S (1987): Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem* 262, 1740-1747

Ghali JK (2004): Sex-Related Differences in Heart Failure and Beta-Blockers. *Heart Failure Reviews* 9, 149–159

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342, 90-92

Kao JPY, Harootunian AT, Tsien RY (1989): Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-S. *J Biol Chem* 264, 8179-8184

Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, Wisløff U (2007): Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 43, 354-361

Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL, Wisløff U (2008): Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15, 145-148

Kenchaiah S, Narula J, Vasan RS (2004): Risk factors for heart failure. *Med Clin North Am* 88, 1145-1172

Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG (1990): Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 268, 1702-1709

Kirchberger MA, Tada M, Katz AM (1974): Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 6166-6173

Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W et al. (2002): The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111, 943-955

Knöll R, Hoshijima M, Chien K (2003): Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med* 81, 750–756

Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR (2007): Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H614–H621

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Mathemath.-Naturwiss. Diss. Göttingen 2006

Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y (1990): Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* 265, 3595–3598

Korte T, Fuchs M, Guener Z, v Bonin J, de Sousa M, Niehaus M, Tebbenjohanns J, Drexler H (2002): In-vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. *J Interv Card Electrophysiol* 6, 121-132

Krenz M, Robbins J (2004): Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol* 44, 2390-2397

Kupershmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM (1999): Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 84, 146-152

Kurokawa J, Abriel H, Kass RS (2001): Molecular Basis of the Delayed Rectifier Current I_{Ks} in Heart. *J Mol Cell Cardiol* 33, 873–882

Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G (1988): Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331, 315-319

Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York 1983

Langendorff O (1985) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Arch Physiol 61, 291-332

Langer GA, Peskoff A (1996): Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. Biophys J 70, 1169-1182

Lehnart SE, Huang F, Marx SO, Marks AR (2003): Immunophilins and coupled gating of ryanodine receptors. Curr Top Med Chem 3(12), 1383-1391

Lehnart SE, Terrenoire C, Reiken S, Wehrens XH, Song LS, Tillman EJ, Mancarella S, Coromilas J, Lederer WJ, Kass RS et al. (2006): Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. Proc Natl Acad Sci U S A 103(20), 7906-7910

Linke WA (2008): Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. Cardiovasc Res 77(4):637-48.

Liu DW, Antzelevitch C (1995): Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. Circ Res 76, 351-365

Maier LS, Pieske B, Allen DG (1998): Influence of stimulation frequency on $[Na^+]_i$ and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. Am J Physiol 273, H1246-1254

Maier LS, Zhang T, Cheng L, Desantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling. Circ Res 92, 904-911

Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY (1996): Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. Science 271, 213-216

Martínez-Sellés M (2007): What Do Women Have in Their Hearts? Rev Esp Cardiol 60, 1118-1121

Minta A, Kao JPY, Tsien RY (1989): Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores. *J Biol Chem* 264, 8171-8178

Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998): Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274, 747-751

Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE (2000): Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 24, 163-166

Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802

Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990): Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *Science* 250, 562-565

Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg u.a. 1996

O`Connell T, Ni Y (2002): Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart. AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02

Ostwald TJ, MacLennan DH (1974): Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 974-979

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1161-178

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999): Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46

Pogwizd SM (2000): Increased Na(+)-Ca(2+) exchanger in the failing heart. *Circ Res* 87, 641-343

Pourrier M, Schram G, Nattel S (2003): Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 194, 141-152

Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G et al. (2003): Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 348, 1866-1874

Redel A, Baumgartner W, Golenhofen K, Drenckhahn D, Golenhofen N (2002): Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Eur J Physiol* 445, 297-304

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR (1991): Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18), 8277-8281

Roden DM, Hoffman BF (1985): Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers. Relationship to potassium and cycle length. *Circ Res* 56, 857-867

Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996): Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. *Circ* 94, 1996-2012

Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J, Lazdunski M (1997): Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem* 272, 16713-16716

Ross RS, Borg TK (2001): Integrins and the Myocardium. *Circ Res* 88, 1112-1119

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993): Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977-984

Sadoshima J, Qiul Z, Morgan JP, Izumo S (1996): Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac Myocytes. *EMBO Journal* 20, 5535-5546

Sakmann B, Neher E (1984): Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Ann Rev Physiol* 46, 455-472

Salama G, London B (2007): Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol* 578, 43-53

Salkoff L, Wei AD, Baban B, Butler A, Fawcett G, Ferreira G, Santi CM (2005): Potassium channels in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.42.1, <http://www.wormbook.org>

Samarel AM (2005): Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, 2291-2301

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990): Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96, 195-215

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1991): Delayed rectifier outward K⁺ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 260, H393-H399

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996): Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 384, 80-83

Schillinger W, Meyer M, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1996): Unaltered ryanodine receptor protein levels in ischemic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 160-161, 297-302

Sigurdson W, Ruknudin A, Sachs F (1992): Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am J Physiol* 262, H1110-H1105

Singer SJ, Nicolson GL (1972): The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720-731

Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1997): Expression and function of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92, 53-58

Tada M, Kirchberger MA, Katz AM (1975): Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 250, 2640-2647

Takimoto E, Yao A, Toko H, Takano H, Shimoyama M, Sonoda M, Wakimoto K, Takahashi T, Akazawa H, Mizukami M et al. (2002): Sodium calcium exchanger plays a key role in alteration of cardiac function in response to pressure overload. *FASEB J* 16, 373-378

Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S (2004): Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 16, 349-360

Tarone G, Lembo G (2003): Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. *Trends Mol Med* 9, 376-382

Thomas G, Killeen MJ, Gurung IS, Hakim P, Balasubramaniam R, Goddard CA, Grace AA, Huang CL (2007): Mechanisms of ventricular arrhythmogenesis in mice following targeted disruption of KCNE1 modelling long QT syndrome 5. *J Physiol* 578.1, 99-114

Tsien RY (1980): New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochem* 19, 2396-2404

Unsöld B, Teucher N, Neef S, Vogt J, Zyba V, Kumm N, Lau E, Knöll R, Maier LS, Brancaccio M et al. (2007): Gender dependent protective effects of melusin overexpression on post MI remodelling and survival in mice. Poster at American Heart Association Meeting in Orlando, USA; November 3-7 2007

Unsöld B, Kaul A, Sbroggio M, Schubert C, Regitz-Zagrosek V, Brancaccio M, Damilano F, Hirsch E, van Bilsen M, Munts C et al. (2014): Melusin protects from cardiac rupture and improves functional remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 101, 97-107

van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DH, Stienen GJ, Lamers JM, Duncker DJ (2004): Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res* 95, 85-95

Vandenburgh H, Kaufman S (1979): In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*. 203, 265-268

Varnum MD, Busch AE, Bond CT, Maylie J, Adelman JP (1993): The min K channel underlies the cardiac potassium current *I_{ks}* and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90, 11528-11532

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, Van-Raay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T et al. (1996): Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12, 17-23

Wang Q, Chen Q, Towbin JA (1998): Genetics, molecular mechanisms and management of long QT syndrome. *Ann Med* 30, 58-65

Wang W, Xia J, Kass RS (1998): MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled *IsK* channel. *J Biol Chem* 273, 34069–34074

Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, Ellingsen O (2001): Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 50, 495-508

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou YZ, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R et al. (1996): Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271, 3221-3228

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y (1998): Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal* 10, 693-698

Yang N, George AL, Horn R (1996): Molecular Basis of Charge Movement in Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 16, 113–122

Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M et al. (2000): Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca²⁺ leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102, 2131-2136

Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990): Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 265, 4670-4677

Zimmerman AN, Hülsmann WC (1966): Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 5049, 646-647

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 13. März 1983 in Gotha - Thüringen als erster Sohn meiner Eltern Dipl. med. Elke H. Vogt und Dipl. Ing. Matthias R. Vogt. Ich habe einen zwei Jahre jüngeren Bruder, Dipl. Ing. Richard W. Vogt.

Am 10. August 2013 erfolgte die Eheschließung mit Frau Josephine B. Hipol, Doctor of Medicine (University of Santo Tomas, Philippinen). Wir sind am 22. Februar diesen Jahres Eltern unseres Sohns Andrew T. Vogt geworden.

Meine schulische Ausbildung begann in der Grundschule Goldbach 1990 und dauerte bis 1994. Daran folgte die Sekundarstufe am Gustav-Freytag-Gymnasium in Gotha im Zeitraum von 1994 bis 2001, und sie endete mit der allgemeinen Hochschulreife am 19. Juni 2001 mit der Abiturnote „gut“.

Anschließend leistete ich ein Jahr Wehersatzdienst als Zivildienstleistender im Alten- und Seniorenheim Haus Regensburg in Berlin bis Juli 2002.

Im Oktober 2002 begann ich das Studium der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Dabei absolvierte ich die Ärztliche Vorprüfung (Physikum) im September 2004 mit der Leistungsnote „gut“. Hieran folgte der klinische Abschnitt mit einem Forschungssemester für die Dissertationsarbeit und dem Praktischen Jahr von Februar 2008 bis Januar 2009. Im Rahmen des Medizinstudiums galt mein Interesse der fächerübergreifenden medizinischen Ausbildung. Hierbei leistete ich klinische Praktika in der Kardiologie, Viszeral- und Unfallchirurgie des Hufeland-Krankenhauses in Bad Langensalza, der Klinik für Gastroenterologie der Santo Tomas-Universität in Manila auf den Philippinen sowie im ambulanten Bereich in einem allgemeinmedizinischen MVZ in Berlin und in der allgemeinmedizinischen Praxis Heimbrod in Gotha.

Am 17. Juni 2009 legte ich erfolgreich die Ärztliche Prüfung mit dem Staatsexamen und der Note „gut“ ab. Die Approbation zur Berufsausübung als Arzt erhielt ich vom Niedersächsischen Zweckverband zur Approbationserteilung am 8. Juli 2009.

Im Anschluss an das Medizinstudium begann ich die Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin als Assistenzarzt des Universitätsklinikums Heidelberg in der Klinik für Allgemeine Innere Medizin und Psychosomatik bei Prof. Dr. med. W. Herzog von Oktober 2009 bis September 2011. Dabei erfolgte die Rotation in der Rheuma-, Schmerz- und Allgemeinen Ambulanz sowie auf der kardiologisch-psychosomatischen Station und internistischen Notfallaufnahme.

Des Weiteren komplettierte ich zwei Jahre der allgemeinmedizinischen Arbeitsfelder im Klinikum Bad Salzungen von November 2011 bis Juli 2013 in den Kliniken für Innere Medizin bei Dr. med. H.-D. Eichhorn, für Anästhesie und Intensivmedizin bei Dr. med. R. Schneider, für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie bei Dr. med. K. Bauer und für Pädiatrie bei Dr. med. V. Zindel.

Die ambulante Weiterbildungszeit absolvierte ich bis zum erfolgreichen Abschluss des Facharztes für Allgemeinmedizin am 27. Mai 2015 in der Praxis für Allgemein-, Arbeits- und Sportmedizin bei Dr. med. M. Heimbrod in Gotha von September 2013 bis April 2015. Seitdem befinde ich mich in der zusätzlichen Facharztqualifikation zum Arbeitsmediziner sowie als angestellter Arzt mit Zulassung der Kassenärztlichen Vereinigung Thüringen zur ambulanten Versorgung in selbiger Praxis.

11. November 2016