

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

**Der Einfluss des AT₂-interacting Protein 1 (ATIP1) auf
die Kontraktilität und den Kalziumstoffwechsel
von ventrikulären Herzmuskelzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jochen Reichle

aus

Pforzheim

Göttingen 2016

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

II. Berichterstatter/in: PD Dr. Marcus Niebert

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Ultrastruktur des Herzens und der Myozyte	2
1.2 Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle	3
1.2.1 Das sarkoplasmatische Retikulum (SR)	4
1.2.2 Der L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal	5
1.2.3 Die SR Ca ²⁺ -Ausschüttung: Der Ryanodin-Rezeptor (RyR2)	6
1.2.4 Die SR Ca ²⁺ -Aufnahme: Die SR Ca ²⁺ -ATPase (SERCA2a) und Phospholamban (PLB).....	7
1.2.5 Der sarkolemmale Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher (NCX)	8
1.3 Die elektromechanische Kopplung	8
1.4 Das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II).....	10
1.4.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	11
1.4.2 Angiotensin II-Rezeptoren	13
1.4.2.1 Der AT ₁ -Rezeptor	13
1.4.2.2 Der AT ₂ -Rezeptor	15
1.4.2.3 Das „AT ₂ -interacting Protein 1“ (ATIP1)	17
1.4.3 Die Rolle von Angiotensin II im Herzen und in der Herzinsuffizienz ...	19
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 ATIP1-KO-Mäuse.....	23
2.1.1 Die Generierung von ATIP1-Knockout-Mäusen (ATIP1-KO).....	23
2.2 Isolierung der ventrikulären Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen.....	24
2.3 Erhebung biometrischer Daten.....	26
2.4 Das Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie	26
2.4.1 Die Kalzium-Fluoreszenzfarbstoffe	27
2.4.2 Der kalziumsensitive Farbstoff Fluo-3 AM	27
2.5 Die Funktionsweise des verwendeten Epifluoreszenz-Setup.....	29
2.5.1 Die Messung der fraktionellen Myozytenverkürzung	29
2.5.2 Die Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Transienten	30
2.6 Versuchsdurchführung und Versuchsprotokoll	31

2.6.1	Präparation der Messkammern und der Messanlage	31
2.6.2	Auswahl der Zellen	33
2.7	Versuchs- und Messprotokoll.....	33
2.7.1	Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung.....	33
2.7.2	Bestimmung der Relaxationszeit	34
2.7.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	34
2.7.4	Bestimmung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung	36
2.7.5	Bestimmung der NCX-Funktion	36
2.7.6	Einfluss der Angiotensin-Rezeptor-Stimulation mit Angiotensin II	37
2.7.7	Einfluss der selektiven AT ₂ -Rezeptor-Stimulation mit CGP42112A....	38
2.7.8	Einfluss der β-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin	39
2.8	Erfassung und Auswertung der Daten.....	39
2.9	Lösungen	40
2.9.1	Herstellung und Zusammensetzung der Isolationstyroden.....	40
2.9.2	Herstellung und Zusammensetzung des Farbstoffes Fluo-3 AM.....	41
2.9.3	Messtyroden	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Auswertung des Herz- zu Körpergewicht-Verhältnisses	44
3.2	Funktionelle Messungen am Epifluoreszenzmikroskop	44
3.2.1	Funktionelle Messungen in Gruppe A.....	45
3.2.1.1	Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung	45
3.2.1.2	Untersuchung der Relaxationszeit.....	46
3.2.1.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	47
3.2.1.4	Untersuchung der NCX-Funktion.....	48
3.2.1.5	Untersuchung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung.....	49
3.2.1.6	Zusammenfassung	50
3.2.2	Funktionelle Messungen in Gruppe B.....	51
3.2.2.1	Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung unter basalen Bedingungen	51
3.2.2.2	Untersuchung der Relaxationszeit.....	51
3.2.2.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	52
3.2.2.4	Untersuchung der NCX-Funktion.....	53
3.2.2.5	Untersuchung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung.....	54
3.2.2.6	Zusammenfassung	55
3.2.3	Funktionelle Messungen mit Angiotensin II (Ang II).....	55
3.2.3.1	Der Einfluss von Ang II auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	55
3.2.3.2	Der Einfluss von Ang II auf die Relaxationszeit	57

3.2.3.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	58
3.2.3.4	Bestimmung der NCX-Funktion	60
3.2.3.5	Untersuchung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung.....	60
3.2.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit Ang II.....	61
3.2.4	Funktionelle Messungen mit dem AT ₂ -Rezeptor-Agonisten CGP42112A (CGP).....	62
3.2.4.1	Der Einfluss von CGP42112A auf die Kraft-Frequenz-Beziehung ..	62
3.2.4.2	Der Einfluss von CGP42112A auf die Relaxationszeit	64
3.2.4.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	65
3.2.4.4	Bestimmung der NCX-Funktion	66
3.2.4.5	Untersuchung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung.....	67
3.2.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit CGP42112A.....	68
3.2.5	Funktionelle Messungen mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin (ISO)	68
3.2.5.1	Der Einfluss von Isoprenalin auf die Kraft-Frequenz-Beziehung ..	68
3.2.5.2	Der Einfluss von Isoprenalin auf die Relaxationszeit.....	70
3.2.5.3	Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes	71
3.2.5.4	Bestimmung der NCX-Funktion	73
3.2.5.5	Untersuchung der fraktionellen SR Ca ²⁺ -Freisetzung.....	74
3.2.5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit Isoprenalin	75
4	Diskussion.....	76
4.1	ATIP1-KO-Mäuse entwickeln keine Herzhypertrophie.....	76
4.2	Einfluss von ATIP1 auf die elektromechanische Kopplung unter basalen Bedingungen und unter beta-adrenerger Stimulation	78
4.3	ATIP1 hat einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung unter Angiotensin II-Stress	80
4.4	SERCA2a-Aktivität in ATIP1-KO-Mäusen.....	83
4.5	ATIP1 ohne messbaren Einfluss auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt	86
4.6	ATIP1 beeinflusst die Aktivität des NCX nicht	87
4.7	Fraktionelle SR Ca ²⁺ -Freisetzung	88
5	Zusammenfassung	89
6	Literaturverzeichnis.....	90

Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Streifenanordnung und der Myofilamente; elektronenmikroskopische Aufnahme	3
Abb. 1.2 Schematische Darstellung des sarkoplasmatischen Retikulums	5
Abb. 1.3 Schematische Abb. der elektromechanischen Kopplung im Herzen	9
Abb. 1.4 Vereinfachtes Schema des „klassischen“ RAAS	12
Abb. 1.5 Schematische Darst. der bis dato erforschten Funktionen von ATIP1	19
Abb. 1.6 Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz	21
Abb. 2.1 Schematische Darst. der Langendorff-Perfusionsanlage	25
Abb. 2.2 Strukturformeln von verschiedenen Fluo-Analoga (A) und das Emissionsspektrum (B) von Fluo-3 in Lösung	29
Abb. 2.3 Vereinfachtes Schema des IonOptix Epifluoreszenz-Setups für Fluo-3 ...	31
Abb. 2.4 Schematische Darst. einer Messkammer in der Epifluoreszenz-Anlage ..	32
Abb. 2.5 Exemplarische Computerdarstellung einer Mausmyozyte	33
Abb. 2.6 Originalregistrierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals während einer Post-Pausen-Potenzierung	35
Abb. 2.7 Originalregistrierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals vor und nach lokaler Applikation eines Kaffeintropfens auf die Zelle	36
Abb. 2.8 Strukturformel von Angiotensin II	38
Abb. 2.9 Strukturformel des AT_2 -Rezeptor-Agonisten CGP42112A	38
Abb. 2.10 Strukturformel von Isoprenalin	39
Abb. 3.1 Vergleich des Alters der verwendeten Mäuse in Wochen	43
Abb. 3.2 Vergleich des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht	44
Abb. 3.3 Zeitlicher Ablauf eines Messprotokolls einer Zelle anhand der Registrierung der Ca^{2+} -Transienten und der fraktionellen Zellverkürzung.	45
Abb. 3.4 Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung; Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Gruppe A, basal	46
Abb. 3.5 Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($\text{RZ}_{50\%}$); diastolische Ca^{2+} -Extrusion $\text{RZ}_{\text{Ca}50\%}$; Gruppe A, basal	47
Abb. 3.6 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; Gruppe A, basal	47
Abb. 3.7 Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Gruppe A, basal	48
Abb. 3.8 Der Exponent τ_{Ca} sowie $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ nach Koffeinapplikation als Maß für die NCX-Aktivität; Gruppe A, basal	49
Abb. 3.9 Frakt. SR Ca^{2+} -Freisetzung bei Grundstimulation; Gruppe A, basal	50

Abb. 3.10	Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung; Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Gruppe B, basal	51
Abb. 3.11	Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($\text{RZ}_{50\%}$); diastolische Ca^{2+} -Extrusion $\text{RZ}_{\text{Ca}50\%}$; Gruppe B, basal.....	52
Abb. 3.12	Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; Gruppe B, basal ..	52
Abb. 3.13	Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Gruppe B, basal	53
Abb. 3.14	Der Exponent τ_{Ca} sowie $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ nach Koffeinapplikation als Maß für die NCX-Aktivität; Gruppe B, basal.....	54
Abb. 3.15	Frakt. SR Ca^{2+} -Freisetzung bei Grundstimulation; Gruppe B, basal.....	54
Abb. 3.16	Beisp. Originalreg. der Zellverkürzung bei 1 Hz unter Ang II-Stress.....	56
Abb. 3.17	Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung; Ang II.....	56
Abb. 3.18	Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Ang II.....	57
Abb. 3.19	Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($\text{RZ}_{50\%}$); Ang II.....	57
Abb. 3.20	Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol; Ang II	58
Abb. 3.21	Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; Ang II	59
Abb. 3.22	Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Ang II.....	59
Abb. 3.23	Der Exponent τ_{Ca} sowie $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ nach Koffeinapplikation als Maß für die NCX-Aktivität; Ang II	60
Abb. 3.24	Die frakt. SR Ca^{2+} -Freisetzung bei der Grundstimulation; Ang II.....	61
Abb. 3.25	Beisp. Originalreg. der Zellverkürzung bei 1 Hz unter CGP-Stress	62
Abb. 3.26	Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung; CGP42112A.....	63
Abb. 3.27	Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; CGP42112A	63
Abb. 3.28	Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($\text{RZ}_{50\%}$); CGP42112A.....	64
Abb. 3.29	Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol; CGP42112A	65
Abb. 3.30	Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; CGP42112A.....	65
Abb. 3.31	Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; CGP42112A.....	66
Abb. 3.32	Der Exponent τ_{Ca} sowie $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ nach Koffeinapplikation als Maß für die NCX-Aktivität; CGP42112A	67
Abb. 3.33	Die frakt. SR Ca^{2+} -Freisetzung bei der Grundstimulation, CGP42112A	67
Abb. 3.34	Beispielhafte Originalregistrierung der Zellverkürzung bei 1 Hz unter Isoprenalin-Stress.....	69
Abb. 3.35	Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung; Isoprenalin.....	69
Abb. 3.36	Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Isoprenalin.....	70
Abb. 3.37	Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($\text{RZ}_{50\%}$); Isoprenalin	70
Abb. 3.38	Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol; Isoprenalin ...	71
Abb. 3.39	Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; Isoprenalin	72
Abb. 3.40	Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 ; Isoprenalin	73

Abb. 3.41	Der Exponent τ_{Ca} sowie $RZ_{Ca80\%}$ nach Koffeinapplikation als Maß für die NCX-Aktivität; Isoprenalin	74
Abb. 3.42	Die frakt. SR Ca^{2+} -Freisetzung bei der Grundstimulation; Isoprenalin...	75

Tabellen

Tab. 1.1	Der AT_1 - und AT_2 -Rezeptor im Überblick	17
Tab. 2.1	Zusammensetzung der Ca^{2+} -freien Isolationstyrode	40
Tab. 2.2	Zusammensetzung von auf der Isolationstyrode aufbauenden Tyroden ..	41
Tab. 2.3	Zusammensetzung der Pluronic-Lösung.....	41
Tab. 2.4	Zusammensetzung und Herstellung der Farbstoff-Ansätze von Fluo-3 AM	42
Tab. 2.5	Zusammensetzung und Herstellung der Messtyroden.....	42
Tab. 3.1	Unterschiede von WT- und ATIP1-KO-Mäusen aus Gruppe A in der Übersicht	50
Tab. 3.2	Unterschiede von WT- und ATIP1-KO-Mäusen unter basalen Bedingungen aus Gruppe B in der Übersicht.....	55
Tab. 3.3	Einfluss von Ang II auf WT und ATIP1-KO in der Übersicht	61
Tab. 3.4	Einfluss von CGP42112A auf WT und ATIP1-KO in der Übersicht.....	68
Tab. 3.5	Einfluss von Isoprenalin auf WT und ATIP1-KO in der Übersicht	75

Formeln

Formel 2.1	Berechnung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis	26
Formel 2.2	Berechnung der fraktionellen Myozytenverkürzung	34
Formel 2.3	Berechnung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0	34
Formel 2.4	Berechnung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung.....	36
Formel 2.5	Berechnung des Exponenten τ als Maß für die Ca^{2+} -Extrusion aus der Zelle	37
Formel 2.6	Berechnung des Standardfehlers (SEM).....	40

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang I, II	Angiotensin I, II
AS	Aminosäure(n)
AT ₁ -, AT ₂ -Rez.	Angiotensin II-Rezeptor 1, 2
AT ₃ -, AT ₄ -Rez.	Angiotensin II-Rezeptor 3, 4
ATIP1	AT ₂ -interacting Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Ca ²⁺ , [Ca ²⁺] _i	Kalzium, Kalziumkonzentration
CaMKII	Ca ²⁺ Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	<i>Ca-induced Ca-release</i> (Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung)
COX 2	Cyclooxygenase 2
DAG	Diacylglycerol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
H ⁺	Proton
I _{Ca}	Kalziumeinstrom über den sarkolemmalen L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
IGF	<i>insulin-like growth factors</i>
IP3	1,4,5-Inositoltriphosphat
K ⁺ , [K ⁺] _i	Kalium, Kaliumkonzentration
KO	Knockout
LDL	<i>low-density</i> -Lipoproteine
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTUS1	<i>mitochondrial tumor suppressor gene 1</i>

Na ⁺ , [Na ⁺] _i	Natrium, Natriumkonzentration
NCX	Natrium/Kalzium-Austauscher
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktors kappa-B
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
n. s.	nicht signifikant
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PKA, PKC	Proteinkinase A, Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i>
RA(A)S	Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
RyR2	Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums
RZL	Ruhezelllänge
RZ	Relaxationszeit; Zeit, die die Längenzunahme des Myozyten der Kontraktion beschreibt
RZ _{Ca}	Relaxationszeit des Ca ²⁺ , Zeit bis zur 50%igen Ca ²⁺ -Extrusion nach der Kontraktion
SERCA2a	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
τ _{Ca}	monoexponentielle Zeitabfallskonstante des Ca ²⁺ -Transienten
TTCC	T-Type Ca ²⁺ -Kanal
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Das gesunde Herz sichert als muskuläres Hohlorgan mit seinen rhythmischen Kontraktionen die Durchblutung aller Organe. Herz-Kreislaufkrankungen gehören neben malignen Erkrankungen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Im Jahre 2014 starben 338.056 Personen an den Folgen einer Herz-Kreislaufkrankung. Neben der chronisch ischämischen Herzkrankheit (8%) und dem akuten Myokardinfarkt (5,5%) belegt die Herzinsuffizienz mit 5,1% den dritten Rang der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Allein in Europa wird die Zahl der herzinsuffizienten Patienten auf über zehn Millionen geschätzt. Die Prävalenz nimmt mit dem Alter zu: Weniger als 1% im Alter von 45-55 Jahren und mehr als 10% bei den über Achtzigjährigen leiden an Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt 2016). Aufgrund der bedrohlichen Bedeutung für jeden an Herzinsuffizienz erkrankten Menschen ist es deshalb wichtig, die molekularen Stoffwechselfvorgänge einer Herzmuskelzelle und deren Pathophysiologie zu verstehen, um in Zukunft neue Ansatzpunkte für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen entwickeln zu können.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) umfasst eine Kaskade von Hormonen und Proteasen, die eine große Rolle in der Regulation verschiedenster physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge im menschlichen Körper spielen. Dysregulationen in diesem System sind mitverantwortlich für zahlreiche Herz-Kreislaufkrankungen, wie bspw. arterieller Hypertonus, Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Endprodukt der Hormonkaskade des RAAS und wichtigstes Effektorprotein ist das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II), welches auf zellulärer Ebene hauptsächlich über zwei Rezeptoren seine Wirkung entfaltet: Über den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Während die Wirkweise des AT₁-Rezeptors bereits relativ gut verstanden ist und die meisten der bekannten (patho-)physiologischen Effekte von Ang II über den AT₁-Rezeptor vermittelt werden, bleibt die Rolle des AT₂-Rezeptors bis heute umstritten und im Wesentlichen ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher der AT₂-Rezeptor und das mit diesem Rezeptor assoziierte Protein „AT₂-interacting Protein 1“ (ATIP1) hinsichtlich seines Einflusses auf die Kontraktion und den Kalziumstoffwechsel von isolierten Mausherzmuskelzellen untersucht werden. Zum besseren Verständnis soll zunächst ein kurzer Einblick in die Ultrastruktur des Herzens gegeben werden. Die physiologischen Grundlagen des Kalziumstoffwechsels werden dann im Abschnitt zur elektromechanischen Kopplung komplettiert.

Nach den Ausführungen über das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz und der Rolle von Ang II dabei sollen die unterschiedlichen Ang II-Rezeptor-Subtypen und ATIP1 genauer betrachtet werden.

1.1 Die Ultrastruktur des Herzens und der Myozyte

Das Myokard besteht aus etwa zwei Milliarden Herzmuskelzellen, welche im Vergleich zu anderen Skelettmuskelzellen jedoch zehnmal kleiner und schmaler sind (BERS 2001). Sie verlaufen weitgehend parallel zueinander und bilden aufgrund ihrer Verzweigung ein funktionelles Synzytium, welches eine kollektive Kontraktion der Herzmuskelzellen während eines Herzschlags gewährleistet. Die einzelnen Myozyten stehen über die sogenannten Glanzstreifen (Disci intercalares) miteinander in Verbindung. Diese beinhalten Desmosomen und sog. *gap junctions*. Desmosomen sind in den Intermediärfilamenten des Sarkoplasmas benachbarter Kardiomyozyten verankert und halten den Verbund der Herzmuskelzellen während des Kontraktionsvorganges zusammen. *Gap junctions* sind Connexine, welche die Erregungsausbreitung von Zelle zu Zelle gewährleisten. Eine Plasmamembran, die im Herzen als Sarkolemm bezeichnet wird, bildet die äußere Grenze jeder Herzmuskelzelle. Außerdem ragt es in Form der transversalen (T)-Tubuli senkrecht zur Faserachse zum Teil tief in die Zelle hinein. Deshalb spricht man von „(T)ransversalen Tubuli“. Die Zelloberfläche wird dadurch stark vergrößert, was für die elektromechanische Kopplung sehr wichtig ist (s.u.). Das Sarkolemm besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, in die wichtige funktionelle Proteine wie Ionen-Pumpen und Kanäle eingelagert sind. Diese transportieren Ionen passiv aufgrund eines Konzentrationsgefälles oder aktiv unter Energieverbrauch (JUNQUEIRA und CARNEIRO 1996). Bei den Kardiomyozyten der Maus machen die T-Tubuli etwa 51% der Fläche des Sarkolemms aus (BOSSSEN et al. 1981).

Die kleinsten funktionellen Einheiten des Herzens sind die hintereinander in Bündeln angeordneten Myofilamente, die sog. Sarkomere. Die Myofilamente und ihre Überlappungsstellen ergeben bereits lichtmikroskopisch ein typisches Bandenmuster, welches als Querstreifung imponiert. Abb. 1.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Herzmuskelzelle eines Schafes:

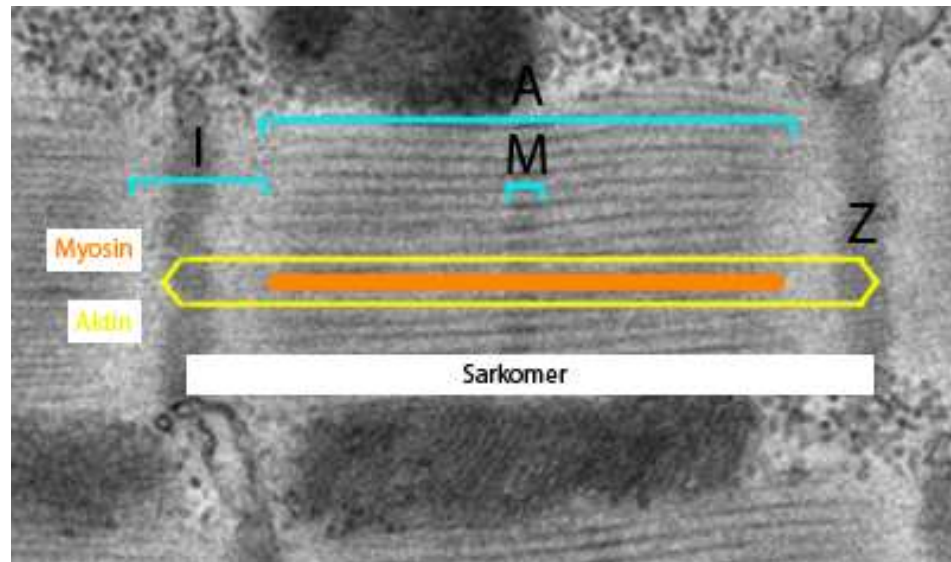


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Streifenanordnung und der Myofilamente anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme vom linken Ventrikel eines Schafes (modifiziert aus PINALI und KITMITTO 2014, S. 3)

Ein Sarkomer dehnt sich zwischen zwei Z-Streifen auf einer Länge von 1,5-2,5 μm aus. Am Z-Streifen sind die in den nebenan gelegenen I-Bändern parallel verlaufenden Aktinfilamente verankert (sog. Z-Scheiben). Im Bereich der dunkleren A-Bänder befinden sich die dickeren Myosinfilamente, die von den dünneren Aktinfilamenten umschlossen werden. Die M-Linie markiert die gegenseitige Verankerung der Myosinfilamente. Zu einer Verkürzung der Myozyte kommt es nun, wenn sich die parallel zueinander verlaufenden Myosinfilamente in Gegenrichtung verschieben. Es entsteht eine Kontraktion, die anschließende Rückverschiebung markiert die Relaxation der Herzmuskelzelle. Für die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie enthält die Herzmuskelzelle die unerlässlichen Zellorganellen wie Mitochondrien, Lysosomen, Lipofuszin-Granula, Peroxisomen, Golgi-Apparat, Glykogen sowie ein gut ausgebautes Zytoskelett, bestehend aus Mikrotubuli und Myofilamenten (BERS 2001).

1.2 Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle

In einem kalziumhaltigen Badmedium stimulierte Ringer bereits im Jahre 1883 ein Froschherz zur rhythmischen Kontraktion. Nach Kalziumentzug sistierte die Kontraktion des Herzens. Er bewies damit, dass Kalzium für die Herzmuskelkontraktion unerlässlich ist (RINGER 1883). In der Tat spielen Ca^{2+} -Ionen eine unverzichtbare Rolle, wenn es um die Kontraktion von Herzmuskelzellen

geht. Dabei wirken sie sowohl als *second messenger*, als auch direkt in der Myofilamentaktivierung der Herzmuskelzelle. Zahlreiche Kanäle, Pumpen, Speicher und Puffer dienen allein der Verschiebung der Kalziumkonzentration innerhalb des Zytosols während der Systole und der Diastole.

1.2.1 Das sarkoplasmatische Retikulum (SR)

Das SR besitzt im Hinblick auf den Kalziumstoffwechsels im Herzen eine herausragende Bedeutung. Seine Funktion umfasst die Speicherung, Freisetzung und Wiederaufnahme von Ca^{2+} -Ionen. Es handelt sich um ein membranumschlossenes Zellkompartiment, das sich in seiner Struktur netzförmig und longitudinal in der Herzmuskelzelle ausbreitet. Aus diesem Grund spricht man auch von L(longitudinal)-Tubuli. Diese L-Tubuli enden blind und laufen in den sogenannten Terminalzisternen aus. Die Terminalzisternen befinden sich im Bereich der Z-Streifen (s.o.) und stehen damit in engem Kontakt mit den sarkolemmalen T-Tubuli. Zusammen bilden L-Tubuli und T-Tubuli ein funktionelles System, das auch als Diadenstruktur bezeichnet wird (BERS 2001).

Innerhalb des SR befindet sich das Protein Calsequestrin, das in der Lage ist, große Mengen an Ca^{2+} -Ionen zu binden und somit innerhalb des SR zu speichern. Zwei weitere für den Kalziumstoffwechsel wichtige Proteine befinden sich in der Membran des SR. Das ist zum einen die für die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in das SR wichtige SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), welche unter Energieverbrauch Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasma in das SR pumpt, und zum anderen die für die Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen wichtigen Ryanodin-Rezeptoren (RyR2), die in enger Nachbarschaft zu den L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen der T-Tubuli stehen. Abb. 1.2 zeigt eine schematische Darstellung der sarkolemmalen T-Tubuli und der L-Tubuli des SR.

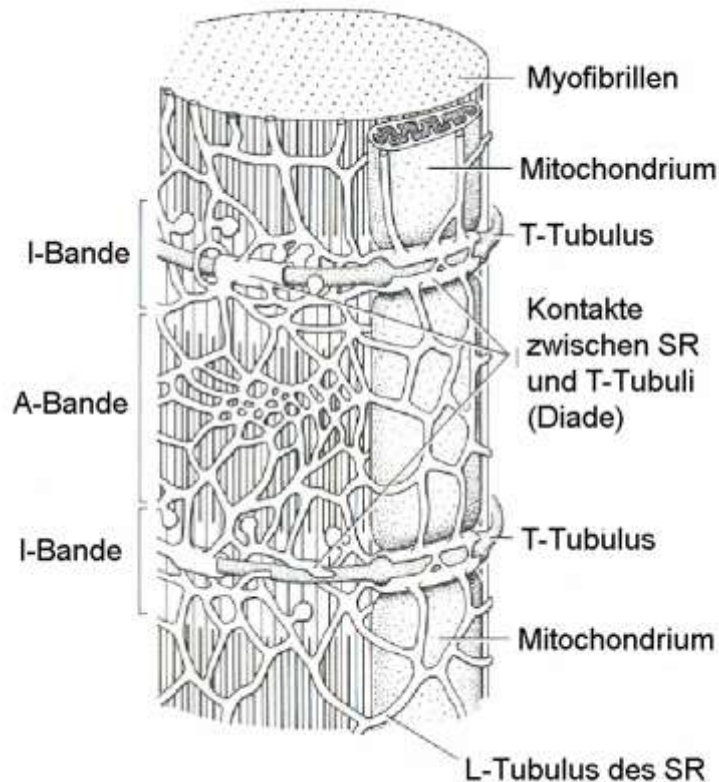


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des sarkoplasmatischen Retikulums mit den L-Tubuli, der sarkolemmalen T-Tubuli und der Myofilamente in der Herzmuskulatur (modifiziert aus JUNQUEIRA und CARNEIRO 1996, S. 238)

1.2.2 Der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal

Der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (*L-Type Ca channel*, LTCC) gehört zu der Gruppe der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (*voltage-dependent Ca channels*), die von Fatt und Katz im Jahre 1953 identifiziert wurden (FATT und KATZ 1953). Diese wurden später aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften weiter in *low-voltage-activated-Ca-channels* und in *high-voltage-activated-Ca-channels* unterteilt (HAGIWARA et al. 1975). Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer und biophysikalischer Eigenschaften kennt man heute fünf funktionelle Typen dieser Kanäle (T-, L-, N-, P/Q-, und R-Typ- Ca^{2+} -Kanal), die u. a. in Organen wie Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur, Neuronen und endokrinen Zellen in unterschiedlicher Konfiguration und Häufigkeit vorhanden sind (TREINYS und JUREVICIUS 2008). Myozyten exprimieren ausschließlich zwei Klassen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (*T-Type Ca channel*, TTCC) und die bereits erwähnten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (BERS 2001). TTCCs sind nur bei negativen Membranpotenzialen aktiv, sie besitzen eine geringe Leitfähigkeit und nur eine sehr kurze Öffnungsdauer. Für den durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle

bewirkten Ca^{2+} -Strom (I_{Ca}) während eines Aktionspotenzials spielen die TTCCs nur eine vernachlässigbare Rolle, da dieser hauptsächlich durch die LTCCs erfolgt. Die LTCCs öffnen sich bei Membrandepolarisationen um -40 mV, besitzen eine große Leitfähigkeit und eine lange Öffnungszeit (DE WAARD et al. 1996). Oft werden diese Kanäle auch Dihydropyridin-Rezeptoren genannt, da 1,4-Dihydropyridine wie bspw. Nifedipin oder Amlodipin die Kanäle blocken. Auch Substanzen anderer Stoffklassen wie das Phenylalkylamin Verapamil und die Benzothiazepine (Diltiazem) können die Öffnungswahrscheinlichkeit der LTCCs reduzieren. TTCCs reagieren nicht auf Dihydropyridine. Die für den I_{Ca} wichtigen LTCCs befinden sich in den T-Tubuli in der sarkolemmalen Membran (s.o.). Dort befinden sie sich vornehmlich in Nachbarschaft zum sarkoplasmatischen Retikulum und dessen Ryanodin-Rezeptoren, welche für die Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in das Zytoplasma zuständig sind, und bilden mit diesen funktionelle Kalzium-Ausschüttungskomplexe (SCRIVEN et al. 2000).

Der LTCC ist ein Polypeptidtetramer bestehend aus vier Untereinheiten (α_1 , α_2 , β , und δ) (BODI et al. 2005). Unterschiedliche pharmakologische Substanzen können an die α_1 -Untereinheit binden und den Kanal in seiner Aktivität beeinflussen. Die α_1 -Untereinheit ist die porenbildende Ionen-Kanal-Untereinheit. Der LTCC kann durch Phosphorylierungen auf der zytosolischen Seite aktiviert werden, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zunimmt. Über die Stimulation von adrenergen β_1 -Rezeptoren wird außerdem das Enzym Adenylylcyclase aktiviert, welches die Synthese des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) katalysiert. Aufgrund der erhöhten cAMP-Konzentration kommt es zur Aktivierung des Enzyms Proteinkinase A (PKA), wodurch es auch zu einer Phosphorylierung der LTCCs kommt. Aufgrund des erhöhten I_{Ca} kommt es zu einer vermehrten Aktivität der Ryanodin-Rezeptoren des SR (s.u.) und zu einer Steigerung der Herzschlagstärke (positiv inotroper Effekt). Die sympathoadrenerge Stimulation ist hauptsächlich auf diesen Effekt zurückzuführen (BERS 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mausmyozyten mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin stimuliert.

1.2.3 Die SR Ca^{2+} -Ausschüttung: Der Ryanodin-Rezeptor (RyR2)

Der RyR2 ist ein membranüberspannender Kationen-selektiver Ionenkanal des SR. Er ist verantwortlich für die Kalziumausschüttung ins Zytosol während der Systole und somit unerlässlich für die Kontraktion der Herzmuskelzelle (WILLIAMS et al. 2001). Strukturell handelt es sich beim RyR2 um ein sehr großes tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von 565 kDa pro Untereinheit (MEISSNER 1994). Die Mehrzahl der RyR2 liegt in enger Nachbarschaft zu den Einstülpungen

der T-Tubuli des Sarkolemms und somit in unmittelbarer Nähe zu den bereits besprochenen LTCCs, mit denen sie eine funktionelle Einheit bilden, die auch Couplon genannt wird (MAIER und BERS 2007). In Mausherzmuskelzellen stammen 90% des für die Kontraktion zur Verfügung stehenden Kalziums aus dem SR und 10% aus dem Extrazellularraum. In humanen Zellen verteilt sich 60–70% auf das SR und 30–40% auf die LTCCs, je nach Herzfrequenz (BERS 2001, MAIER et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die RyR2 der Herzmuskelzellen mithilfe einer koffeinhaltigen Lösung aktiviert. Koffein bewirkt für die Dauer der Applikation eine reversible Öffnung der RyR2, wodurch sich das komplette Kalzium schlagartig aus dem SR ins Zytosol entleert.

1.2.4 Die SR Ca^{2+} -Aufnahme: Die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) und Phospholamban (PLB)

Für die Relaxation der Herzmuskelzelle während der Diastole ist eine rasche Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol notwendig. Den größten Anteil der Ca^{2+} -Ionen pumpt dabei die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) entgegen eines großen Konzentrationsgradienten zurück in das SR. Der wiederaufgenommene Anteil an Ca^{2+} -Ionen entspricht dabei der Menge, die zuvor aus dem SR über die RyR2 freigesetzt wurde. Die SERCA2a befinden sich vornehmlich in den longitudinalen Tubuli des SR. Molekulare Analysen identifizierten drei Gene, die für mindestens fünf Isoformen der SERCA kodieren (SERCA1, SERCA2, SERCA3). Der weitaus häufigste Typ im Herz ist die SERCA2a-Isoform, die unter Energieverbrauch in Form von einem Molekül Adenosintriphosphat (ATP) aktiv drei Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das SR pumpt (FRANK et al. 2003). Andere Isoformen kommen in unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Organen vor (bspw. kommt die SERCA1a-Isoform in den schnellen Muskelfasern der Skelettmuskulatur, aber nicht im Herzen vor). Die SERCA2a wird durch das Phosphoprotein Phospholamban (PLB) in ihrer Funktion reguliert (SIMMERMAN und JONES 1998). PLB wird in hohem Maße im Herzen exprimiert und befindet sich in enger räumlicher Beziehung zur SERCA2a. In dephosphoryliertem Zustand inhibiert PLB die Aktivität der SERCA2a. Phosphoryliert kommt es zu einer Hemmung der Hemmung (Disinhibition) und somit zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA2a. Die durch β -adrenerge Stimulation induzierte PKA ist bspw. in der Lage, PLB zu phosphorylieren. Hierbei kann es zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA2a bis um den Faktor vier kommen. Zusammen mit dem verstärkten PKA-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bewirkt die gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR einen vermehrten Ca^{2+} -Gehalt des SR und damit eine verbesserte Kontraktilität (positiv

inotroper Effekt) und durch die Disinhibition von PLB und der SERCA2a eine Beschleunigung der Relaxation (positiv lusitroper Effekt) (PERIASAMY et al. 2008).

1.2.5 Der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX)

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) befindet sich im Sarkolemm und dort in den T-Tubuli der Myozyte. Neben der SERCA2a spielt der NCX eine Rolle in der Ca^{2+} -Extrusion während der Diastole. In Mäuseherzen transportiert der NCX etwa 7% des systolischen Kalziums zurück in den Extrazellularraum, in humanen Myozyten etwa 28% (BERS 2001, LI et al. 1998). Aufgrund des Na^+ -Konzentrationsgradienten über dem Sarkolemm, der durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird, transportiert der NCX passiv ein Ca^{2+} -Ion nach außen und drei Na^+ -Ionen nach innen (*forward mode*). Der NCX kann auch in die andere Richtung funktionieren. So kann er Kalzium in die Zelle einschleusen und Natrium aus der Zelle heraustransportieren. Die Umkehrung des Transports bezeichnet man auch als *reverse mode*. Die Transportrichtung hängt einerseits vom Na^+ - und Ca^{2+} -Gradienten und andererseits vom Membranpotenzial der Zelle ab. Während der Depolarisationsphase des Aktionspotenzials begünstigt der kurzzeitige Na^+ -Einstrom den *reverse mode*, so dass es zu einem Netto Ca^{2+} -Einstrom kommt. Dieser Ca^{2+} -Einstrom ist aber unter physiologischen Bedingungen sehr gering (BIRKELAND et al. 2005), gewinnt unter pathologischen Bedingungen im herzinsuffizienten Myokard jedoch eine enorme Bedeutung. Hier kommt es unter anderem durch eine vermehrte Phosphorylierung des Na^+ -Kanals zu einer Steigerung der Natriumkonzentration im Sarkoplasma und damit konsekutiv über den *reverse mode* des NCX zu einer Kalziumüberladung, die zu sog. späten Nachdepolarisationen führt und Arrhythmien auslösen kann (WAGNER et al. 2006, SOSSALLA et al. 2010).

1.3 Die elektromechanische Kopplung

Der Begriff der elektromechanischen Kopplung beschreibt den Prozess der elektrischen Erregung einer Herzmuskelzelle in Form einer über spannungsabhängige Na^+ -Kanäle induzierten Membrandepolarisation (von -90 mV auf +30 mV), den sich anschließenden Fluss von Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Zelle und der darauf beruhenden Kontraktion der Herzmuskelzelle.

Die Depolarisation des Sarkolemms führt zur Öffnung der spannungsabhängigen LTCCs. Infolgedessen kommt es zu einem Ansteigen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In der Nähe befindliche RyR2 des SR reagieren auf die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit einer Öffnung. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als

Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-Release*, CICR) (FABIATO 1983). So kommt es zu einer drastischen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ca. 100 nM auf 1000 nM (BERS 2002). Die Menge des freigesetzten Kalziums bindet nun an Troponin C. Es kommt zu einer Freigabe der Bindungsstelle von Myosin an Aktin, so dass es zu einer Interaktion von diesen beiden Filamenten kommt. Unter ATP-Verbrauch dreht sich anschließend der Myosinkopf, wodurch sich das Aktinfilament gegenüber dem Myosinfilament bewegt. Die Herzmuskelzelle kontrahiert. Um eine vollständige Relaxation der Myozyte während der Diastole zu erreichen, muss die Menge an Kalzium welche während der Systole in das Zytosol gelangt ist, wieder aus dem Zytosol extrahiert werden. Den größten Anteil des Kalziums befördert die SERCA2a zurück in das SR. Ein kleiner Teil wird über den NCX zurück in den Extrazellularraum transportiert. Nur ein vernachlässigbarer Anteil des Kalziums wird über die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter aus der Zelle transportiert (BERS 2002). Der genaue Mechanismus, der zu einer Schließung der RyR2 und somit zu einem Stopp der SR- Ca^{2+} -Ausschüttung führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Kontrovers diskutiert werden unterschiedliche Faktoren wie bspw. die Adaptierung oder auch die Inaktivierung der RyR2 (SITSAPESAN und WILLIAMS 2000). Durch die Öffnung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle während der Repolarisationsphase erreicht die Zelle wieder ihr Ruhemembranpotenzial von -90 mV. In Abb. 1.3 ist die elektromechanische Kopplung des Herzens zusätzlich schematisch dargestellt.

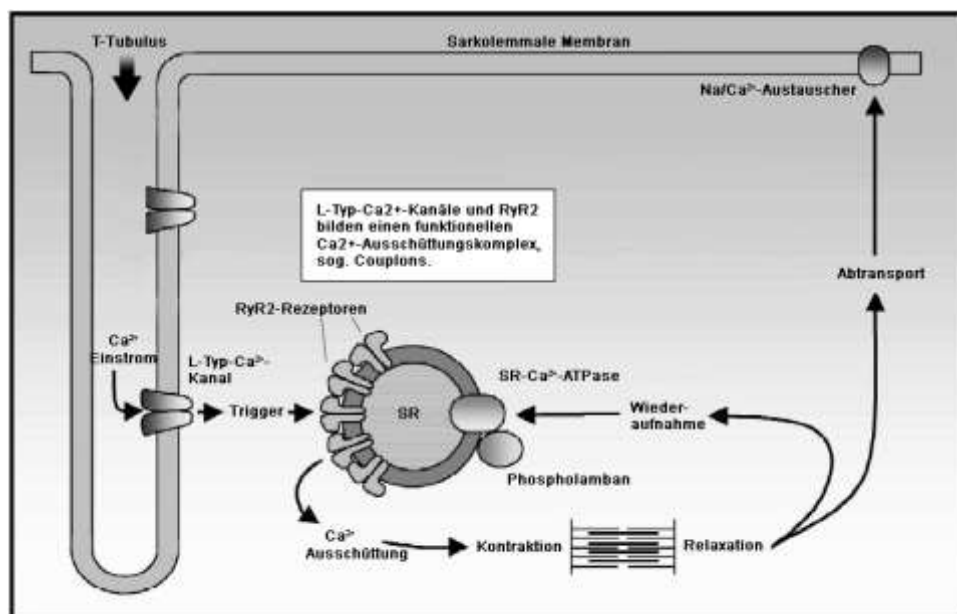


Abb. 1.3 Vereinfachte schematische Abbildung der elektromechanischen Kopplung im Herzen (modifiziert aus SCOOTER und WILLIAMS 2002, S. 360)

1.4 Das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II)

Bereits im Jahre 1940 entdeckten zwei konkurrierende Gruppen von Wissenschaftlern aus den USA und aus Argentinien zeitgleich dasselbe Peptidhormon und nannten es Angiotonin bzw. Hypertensin (BRAUN-MENENDEZ et al. 1940, PAGE und HELMER 1940). Im Jahre 1958 einigten sich die beiden Gruppen auf den einheitlichen Namen Angiotensin. Im Jahre 1954 identifizierten dann SKEGGS et al. zwei Isoformen des Peptids, nämlich Angiotensin I (Ang I) und Angiotensin II (Ang II) (SKEGGS et al. 1954). Ang II ist ein aus acht Aminosäuren (AS) bestehendes Oktapeptid mit einer Molekülmasse von 1046,18 Da. Es ist das Endprodukt einer Hormonkaskade, welche als Renin-Angiotensin-System (RAS) bezeichnet wird (WAGENAAR et al. 2002). Ang II erfüllt als wichtigster Effektor dieses Systems zahlreiche bedeutende Funktionen wie die Regulierung des Blutdrucks, des Plasmavolumens, des sympathischen Nervensystems sowie in der Vermittlung des Durstgefühls. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Induktion zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzhypertrophie, Herzinfarkt, Bluthochdruck und Arteriosklerose (TOUYZ und BERRY 2002). Lange Zeit galt Ang II als ein primär vasokonstriktiv wirkendes Peptidhormon. Jedoch konnten neuere Studien zeigen, dass Ang II auch Eigenschaften von Wachstumsfaktoren sowie zytokinartige Eigenschaften besitzt. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Ang II modulierend in die Kontraktion von Zellen eingreift, Zellwachstum reguliert und sowohl die Apoptose als auch die Differenzierung von Zellen beeinflusst. Des Weiteren spielt es eine Rolle bei der Zellmigration und der extrazellulären Matrixablagerung, es hat proinflammatorische Eigenschaften und wirkt stimulierend auf die Produktion von Wachstumsfaktoren wie bspw. auf den *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder auf Vasokonstriktoren wie bspw. Endothelin. Außerdem ist Ang II in der Lage, Rezeptoren von Wachstumsfaktoren zu aktivieren (z.B. den PDGF-Rezeptor oder den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors sowie den Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (*insulin-like growth factors*, IGF) (KIM und IWAO 2000). Seine zahlreichen Effekte vermittelt Ang II dabei über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden, denen eine Bindung von Ang II an vor allem zwei spezifische Rezeptoren - den AT₁- und den AT₂-Rezeptor - vorrausgeht, die in den kommenden Abschnitten näher beschrieben werden (ARDAILLOU 1999).

1.4.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beschreibt eine Kaskade von Hormonen und Enzymen, die großen Einfluss auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Körpers haben. Außerdem ist das RAAS eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme des Körpers. Dysregulationen in diesem System spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen.

Die klassische Renin-Angiotensin-Aldosteron-Hormonkaskade beginnt mit der Biosynthese von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) der Niere. Renin verdankt seinen Namen den beiden Wissenschaftlern Tigerstedt und Bergmann, die im Jahre 1898 eine blutdrucksteigernde Substanz in der Nierenrinde von Kaninchen entdeckten (TIGERSTEDT und BERGMANN 1898). Damals konnten sie jedoch noch nicht absehen, dass Renin nur den Anfang einer komplexen Hormonkaskade bildet und nicht alleine für die Steigerung des Blutdrucks verantwortlich ist. Die Sekretion von Renin wird prinzipiell von vier Faktoren reguliert, die jeweils unabhängig voneinander funktionieren. Einerseits registrieren Barorezeptoren an der afferenten Arteriole des Nierenkörperchens den renalen Blutdruck, andererseits registriert die sog. Macula Densa, die zusammen mit den JG-Zellen den juxtaglomerulären Apparat bildet, Veränderungen im NaCl-Gehalt des Blutes. Des Weiteren trägt die direkte Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren zur Reninsekretion bei. Ang II kann außerdem die Ausschüttung von Renin aus den JG-Zellen durch negatives Feedback hemmen. NaCl- und Blutdruckabfall sowie die sympathische Stimulation steigern die Sekretion von Renin (BROWN 2006).

Renin ist eine Protease und verantwortlich für die Spaltung des 452 Aminosäuren (AS) großen Angiotensinogens in das Dekapeptid Ang I. Angiotensinogen wird hauptsächlich von der Leber gebildet, die mRNA-Expression konnte jedoch auch in anderen Organen wie bspw. Niere, Gehirn oder Herz gezeigt werden (MORGAN et al. 1996). Inaktives Ang I wird wiederum vom *angiotensin converting enzyme* (ACE) zum aktiven Oktapeptid Ang II katalysiert. Beim ACE handelt es sich um eine membrangebundene Exopeptidase, die vor allem an den glatten Muskelzellen von Gefäßen, aber auch an neuroepithelialen Zellen und an Zellen des renalen proximalen Tubulus vorkommt. ACE ist auch in der Lage, andere Peptide wie bspw. die Vasodilatoren Bradykinin und Kallidin zu inaktiven Metaboliten zu katalysieren (CAREY und SIRAGI 2003). Funktionell resultiert die enzymatische Aktivität von ACE also in einer Steigerung des Gefäßtonus und damit in einer Erhöhung des Blutdrucks. Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei Ang II um den wichtigsten Effektor des RAAS. Über die Bindung an spezifische Ang II-Rezeptoren (AT_1 , AT_2 ,

aber auch AT_3 - und AT_4 -Rezeptor) vermittelt Ang II seine physiologische und pathophysiologische Wirkung (ATLAS 2007). Während die Funktion des AT_1 -Rezeptors gut verstanden ist und die meisten bekannten Wirkmechanismen über diesen Rezeptor initiiert werden, sind die restlichen Rezeptoren und ihre Wirkungen weit weniger bekannt. Über den AT_1 -Rezeptor induziert Ang II u. a. die Ausschüttung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, welches für die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes von entscheidender Bedeutung ist. So führt Aldosteron zu vermehrter Natriumrückresorption und Kaliumausscheidung in der Niere und bewirkt so insgesamt eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens, eine Abnahme der Kaliumkonzentration und über gesteigerte Protonenausscheidung einen Anstieg des pH-Wertes im Blut. Mittlerweile wurden weitere Erkenntnisse über das Ausmaß des RAAS gewonnen. So existieren bspw. außer dem gut erforschten zirkulierenden RAAS auch lokale Renin-Angiotensin-Systeme in den meisten Organen und Geweben. Weiterführend wurde sogar eine intrazelluläre Ang II-Produktion beschrieben. Das RAAS ist deshalb nicht nur ein endokrines, sondern auch ein parakrines und intrakrines System (FYHRQUIST und SAIJONMAA 2008, KUMAR et al. 2007). Abb. 1.4 zeigt eine vereinfachte Darstellung des klassischen, zirkulierenden RAAS:

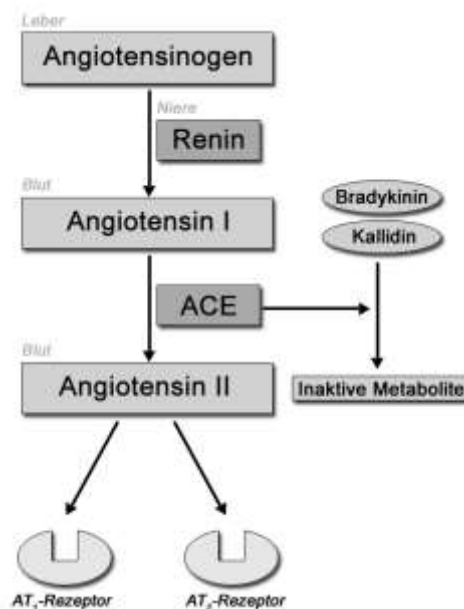


Abb. 1.4 Vereinfachtes Schema des „klassischen“ RAAS: Angiotensinogen wird durch Renin zu Ang I, durch ACE weiter zu Ang II gespalten. Über AT -Rezeptoren vermittelt Ang II seine Wirkung. Das ACE spaltet des Weiteren Bradykinin und Kallidin in inaktive Metabolite. ACE = *angiotensin converting enzyme* (modifiziert nach FYHRQUIST und SAIJONMAA 2008, S. 225)

1.4.2 Angiotensin II-Rezeptoren

Im Jahre 1989 entwickelten drei Forschergruppen unabhängig voneinander die ersten selektiven Ang II-Rezeptor-Liganden, die es erlaubten, zwischen zwei Typen von Ang II-Rezeptoren zu unterscheiden, dem AT₁-Rezeptor und dem AT₂-Rezeptor. Diese ersten Liganden waren Losartan (damals DUP753 oder Ex89) für den AT₁-Rezeptor und CGP42112A, EXP655, PD123319 und PD123177 für den AT₂-Rezeptor (CHIU et al. 1989, WHITEBREAD et al. 1989, SPETH und KIM 1990). Losartan kommt heute als sog. AT₁-Blocker in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zum Einsatz. CGP42112A kam in Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden helikalen Domänen. Zwei weitere Ang II-Rezeptoren sind mittlerweile beschrieben (SWANSON et al. 1992). Dabei handelt es sich zum einen um den AT₃-Rezeptor, der in kultivierten Neuroblastom-Zellen gefunden wurde und zum anderen um den AT₄-Rezeptor, der im menschlichen Gehirn und der Niere, aber nicht im kardiovaskulären System gefunden wurde (WRIGHT und HARDING 1994, HANDA 2001). Die Funktion dieser beiden Rezeptoren ist größtenteils noch unverstanden und wird aktuell kontrovers diskutiert. In den Ausführungen dieser Arbeit werden der AT₃- und AT₄-Rezeptor nicht berücksichtigt.

1.4.2.1 Der AT₁-Rezeptor

Der menschliche AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er umfasst 359 AS und besitzt eine molekulare Masse von 41 kDa. Der AT₁-Rezeptor von Ratten und Mäusen umfasst ebenfalls 359 AS (MIURA et al. 2003). Während es im Menschen keine Subtypen des AT₁-Rezeptors gibt, wurden bei Nagetieren zwei Subtypen beschrieben (AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor) (IWAJ und INAGAMI 1992). Der AT₁-Rezeptor ist nahezu ubiquitär vorhanden und kommt im Herzen in den Myozyten und Fibroblasten vor. Außerdem befindet er sich in hohem Maße an den glatten Muskelzellen des Gefäßsystems, im Gehirn, in der Niere, Nebenniere, Leber und Lunge (ALLEN et al. 1999, FERRARIO 2006). Die meisten der durch Ang II vermittelten physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen sind auf die Bindung an den AT₁-Rezeptor zurückzuführen.

Unter Ang II-Stimulation kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zu einer Dissoziation des G_q-Proteins (NODA et al. 1996). Dies führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C, welche die Produktion der *second messenger* 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) ankurbelt. IP₃ vermittelt die Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern [Ca²⁺]_i und DAG

vermittelt über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum. Die intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration führt zu einer Konstriktion der glatten Muskelzellen des Gefäßsystems und dadurch zu einer Erhöhung des Blutdrucks (WAGENAAR et al. 2002).

Des Weiteren kann Ang II eine Steigerung der Kontraktilität des Herzens vermitteln (MATTIAZZI 1997). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Kontraktilitätssteigerung das Endprodukt einer komplexen Interaktion verschiedener Proteine und Mechanismen ist. So vermag IP3 sowohl die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als auch die Sensitivität der Myofibrillen für Kalzium zu erhöhen. PKC auf der anderen Seite, ist in der Lage, sowohl eine Reihe von verschiedenen intrazellulären Proteinen als auch Proteine der Myofibrillen zu phosphorylieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein PKC-vermittelter Mechanismus an der Aktivierung verschiedener Ionenporter wie bspw. dem Na^+/H^+ -Austauscher und dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher beteiligt ist. Diese Ionenporter haben Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert. Ein alkalisches Milieu erhöht die Sensitivität der Myofibrillen für Kalzium. Des Weiteren kann die PKC auch den NCX aktivieren und so direkten Einfluss auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Gleichgewicht nehmen. Welcher Mechanismus inwieweit zur Kontraktionssteigerung beiträgt wird kontrovers diskutiert. Des Weiteren gibt es speziesspezifische Unterschiede (MATTIAZZI 1997). So konnte unter Ang II-Stimulation an isolierten Myozyten von Ratten sogar ein negativ inotroper Effekt gezeigt werden (PALOMEQUE et al. 2006). In einer anderen Arbeit fanden sich ebenfalls keine positiv inotropen Effekte an humanen isolierten Kardiomyozyten aus Atrium und Ventrikel. Auch an isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen und Ratten waren keine positiv inotropen Effekte zu erkennen (LEFROY et al. 1996). Weitere Forschung ist notwendig, um diese Diskrepanzen zu erklären.

Ein weiterer Punkt ist die rezeptorvermittelte Aktivierung von Tyrosinkinasen. Tyrosinkinasen sind in der Lage, eine Reihe von Signalmolekülen zu phosphorylieren, die wiederum sog. MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*, MAP) aktivieren können. Diese MAP-Kinasen können wie die PKC sowie eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Transkriptionsfaktoren von Genen (c-fos, c-myc, c-jun) aktivieren und so Zellwachstum und Zellproliferation induzieren (BERK und CORSON 1997).

Ferner vermittelt der AT_1 -Rezeptor über den JAK/STAT-Weg die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors kappa-B (NF- κ B), der einen Beitrag zur inflammatorischen Komponente von kardiovaskulären Erkrankungen leistet (RUIZ-ORTEGA et al. 2000).

Obendrein stimuliert der AT_1 -Rezeptor endotheliale und myokardiale sowie membranständige NADH/NADPH-Oxidasen, was zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Diese wiederum bewirken *per se* komplexe intrazelluläre Effekte und aktivieren des Weiteren zahlreiche wichtige Proteinkinasen (z. B. PKA, PKC, CaMKII), so dass es zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich ist, die offenbar hochkomplexen Effekte von Angiotensin II eindeutig zu diskriminieren (WAGNER et al. 2013).

1.4.2.2 Der AT_2 -Rezeptor

Beim AT_2 -Rezeptor handelt es sich genau wie beim AT_1 -Rezeptor um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Er besteht aus 363 AS und besitzt eine molekulare Masse von 41 kDa. In seiner Aminosäuresequenz ist er nur zu 34% mit dem AT_1 -Rezeptor homolog. Bis jetzt wurden keine weiteren Subtypen dieses Rezeptors beschrieben. Die Rolle des AT_2 -Rezeptors ist nicht vollständig geklärt. Während der Fetalentwicklung zeigt sich eine starke Expression des AT_2 -Rezeptors. Kurz nach der Geburt verringert sich jedoch dessen Expression in den meisten Geweben sehr schnell. In manchen Organen verschwindet er sogar komplett. Während der AT_1 -Rezeptor beim Erwachsenen konstant und ubiquitär vorhanden ist, beschränkt sich die Expression des AT_2 -Rezeptors auf Nebennieren, Nieren, Herz, Gefäßsystem, Lunge, Uterus, Ovarien und Gehirn. Eine verstärkte Expression des AT_2 -Rezeptors zeigt sich jedoch unter pathologischen Umständen, die mit Gewebe-Remodellierung (*tissue remodelling*) und Entzündung assoziiert sind wie bspw. Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzversagen, Herzinfarkt, dilatative Kardiomyopathie, Vorhofflimmern, Gewebischämie und Diabetes Mellitus (LEMARIE und SCHIFFRIN 2010, WAGENAAR et al. 2002). Die pathophysiologische Funktion des AT_2 -Rezeptors beim Erwachsenen scheint im Vergleich zum AT_1 -Rezeptor weniger wichtig zu sein. Es besteht die Annahme, dass der AT_2 -Rezeptor eine Art Gegenspieler des AT_1 -Rezeptors bildet und in seiner Funktion die über den AT_1 -Rezeptor vermittelten Wirkungen zum Teil ausgleicht.

Der AT_2 -Rezeptor ist in der Lage, Proliferation und Zellwachstum von glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten zu inhibieren. Nach Bindung von Ang II kommt es zu einer Entkopplung des G_i -Proteins. Das G_i -Protein aktiviert seinerseits die Serin/Threonin-Phosphatase 2a und die Phosphotyrosin-Phosphatase, welche wiederum die Phosphorylierung von Protein-Serin/Threonin und von Protein-Tyrosin hemmen. Über diese Signalkaskade reguliert der AT_2 -Rezeptor die Aktivierung von MAP-Kinasen über den AT_1 -Rezeptor

und hemmt somit rezeptorinduziertes Zellwachstum und Zellproliferation (NAKAJIMA et al. 1995). Über die verringerte Aktivität der MAP-Kinasen wirkt der AT₂-Rezeptor außerdem proapoptotisch, eine wichtige Eigenschaft, wenn man die starke Expression des Rezeptors während der Fetalentwicklung betrachtet (HORIUCHI et al. 1997). Weiterhin ist der AT₂-Rezeptor in der Lage, die durch Wachstumsfaktoren wie IGF, EGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) induzierten Signalkaskaden zu inhibieren (ELBAZ et al. 2000).

Ang II wirkt proinflammatorisch (RUIZ-ORTEGA et al. 2001). Die Rolle des AT₂-Rezeptor bezüglich inflammatorischer Prozesse ist unklar. Einerseits kann der AT₂-Rezeptor die Freisetzung von NF-κB über vermehrte Bildung von Ceramid und reaktive Sauerstoffspezies fördern und deshalb proinflammatorisch wirken, andererseits ist er in der Lage die NADH/NADPH-Oxidase und den JAK/STAT-Weg zu inhibieren und so über eine Reduktion von Sauerstoffradikalen und NF-κB antiinflammatorisch wirken. Zusätzlich wurde eine Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX2) beschrieben (IWAJ et al. 2005, RUIZ-ORTEGA et al. 2000, STECKELINGS et al. 2010).

Eine über den AT₂-Rezeptor induzierte vasodilatative Signalkaskade, bestehend aus Bradykinin, NO und cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat), wird außerdem in Zusammenhang mit der Regulierung des Blutdrucks beschrieben. Es wird angenommen, dass zumindest ein Teil der blutdrucksenkenden Wirkung von AT₁-Antagonisten über die Aktivierung des AT₂-Rezeptor erfolgt (CAREY et al. 2001).

Informationen über den Einfluss einer AT₂-Rezeptor-vermittelten Stimulation auf Kontraktilität und Kalziumstoffwechsel des Herzens sind rar. Vermutet wird eine Kontraktilitätssteigerung durch Ang II über einen AT₁-Rezeptor-vermittelten Signalweg (s.o). Inwieweit der AT₂-Rezeptor Anteil daran hat, soll auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Auch ein antagonistischer Effekt des AT₂-Rezeptors ist eine Möglichkeit. So konnte in einer Studie mit Papillarmuskeln von Kaninchenherzen ein negativ ino- und lusitroper Effekt nach Stimulation mit einem selektiven AT₂-Agonisten gezeigt werden (CASTRO-CHAVES et al. 2008).

Des Weiteren spielt der AT₂-Rezeptor eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung von Neuronen. Während der AT₁-Rezeptor diesen Vorgang eher inhibiert, stimuliert der AT₂-Rezeptor Regeneration, Wachstum und Differenzierung von Neuronen (LAFLAMME et al. 1996).

In Tabelle 1.1 sind noch einmal die wichtigsten Informationen über den AT₁- und AT₂-Rezeptor zusammengefasst.

AT ₁ -Rezeptor (359 AS / 41 kDa)	AT ₂ -Rezeptor (363 AS / 41 kDa)
<i>Expression:</i> Nahezu ubiquitär, beim Erwachsenen vor allem in Gefäßsystem, Herz, Gehirn, Niere, Nebenniere, Leber, Lunge und Fettgewebe	<i>Expression:</i> Vor allem während der Fetalentwicklung, beim Erwachsenen in Nebennieren, Nieren, Herz, Gefäßsystem, Lunge, Uterus, Ovarien und Gehirn
<i>Schlüsselfunktionen von Ang II, vermittelt über den AT₁- und AT₂-Rezeptor:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ● Vasokonstriktion (über ↑Ca²⁺, ↓NO, ↑Endothelin) und ↑Blutdruck ● Proinflammatorisch (über ↑NF-κB) ● ↑Zellwachstum und ↑Zellproliferation (über c-fos, c-myc, c-jun) ● Natriumretention (über ↑Aldosteron) ● Plaquentstehung (über Oxidation von LDL) ● Pos. Inotropie (über ↑IP3, ↑DAG, ↑Ca²⁺) ● Modulation des sympathischen Nervensystems ● ↑Vorhofflimmern ● ↑ADH-Sekretion 	<ul style="list-style-type: none"> ● Fetalentwicklung ● Vasodilatation (über ↑Bradykinin, ↑NO, ↑cGMP) und ↓Blutdruck ● ↓Zellwachstum und ↓Zellproliferation (über ↓MAP-Kinasen, ↓IGF, ↓EGF, ↓bFGF) ● Apoptose (über ↓MAP-Kinasen) ● Proinflammatorisch (über ↑NF-κB) ● Antiinflammatorisch (über ↓NF-κB, ↓Sauerstoffradikale, ↓COX2) ● Zelldifferenzierung

Tab. 1.1 Der AT₁- und AT₂-Rezeptor im Überblick. NO = Stickstoffmonoxid, NF-κB = nukleärer Transkriptionsfaktors kappa-B, LDL = *low-density*-Lipoprotein, IP3 = 1,4,5-Inositoltriphosphat, DAG = Diacylglycerol, ADH = antidiuretisches Hormon, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, MAP = *mitogen-activated protein*, COX2 = Cyclooxygenase Typ 2 (Informationen aus LEMARIE und SCHIFFRIN 2010, MATTIAZZI 1997, TOUYZ und BERRY 2002, WAGENAAR et al 2002)

1.4.2.3 Das „AT₂-interacting Protein 1“ (ATIP1)

In den letzten Jahren konnten neue Entdeckungen bezüglich weiterer Regulierungsmechanismen des AT₁- und AT₂-Rezeptors gemacht werden. Hierbei handelt es sich um spezielle Proteine, die mit diesen Rezeptoren interagieren und so ihre Funktion regulieren können (sog. *receptor-interacting proteins*) (MOGI et al. 2007). ATIP1 ist eines dieser Proteine und ist genetisch identisch mit einem ubiquitär vorhandenen mitochondrialen Tumorsuppressorgen und trägt deshalb auch den Namen MTUS1 (*mitochondrial tumor suppressor gene 1*). Im Rahmen dieser Arbeit wird aber weiterhin der Begriff ATIP1 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass ATIP1 als Tumorsuppressorgen nicht nur eine Rolle in der Krebsentstehung spielt,

sondern auch selektiv mit der zytosolischen C-terminalen Region des AT₂-Rezeptors interagieren und in seiner Funktion beeinflussen kann (SEIBOLD et al. 2003). Dabei ist ATIP1 in der Lage, Rezeptor-Tyrosinkinasen unabhängig von G-Proteinen zu inaktivieren und so Wachstumsfaktoren wie bspw. den IGF, EGF und bFGF zu inhibieren wie es vormals für den AT₂-Rezeptor beschrieben wurde (ELBAZ et al. 2000). In Ovarialzellen von Hamstern, die den humanen AT₂-Rezeptor exprimierten, konnte gezeigt werden, dass ATIP1 in der Lage ist, die durch Wachstumsfaktoren stimulierte MAP-Kinase ERK2 (*extracellular regulated kinases*) zu inhibieren und so Zellproliferation zu verhindern. Für die Funktionalität von ATIP1 ist dabei nur die Anwesenheit des AT₂-Rezeptors, nicht aber die durch Ang II vermittelte Aktivierung erforderlich (NOUET et al. 2004). Jüngst konnte gezeigt werden, dass PARP-1 (*poly(ADP-ribose) polymerase-1*) die Transkription des ATIP1-Gens fördern sowie die Transkription des AT₂-Rezeptorgens hemmen kann (REINEMUND et al. 2009). PARP-1 spielt eine Rolle in der Genese von Entzündungen und bei Hypertonus, jedoch entwickelten PARP-1-defiziente Mäuse keine Herzhypertrophie (PILLAI et al. 2006). Dagegen zeigen ATIP1-überexprimierende Mäuse eine abgeschwächte Produktion von Superoxidanionen, eine Aktivierung von zellproliferativen Signalwegen und eine erhöhte Expression von TNF- α (Tumornekrosefaktor α). Nach Femoralarterienmanschette war die Neointimabildung bei ATIP1-überexprimierenden Mäusen reduziert, was auf eine wichtige Rolle von ATIP1 hinsichtlich Gefäß-Remodelling hindeutet (FUJITA et al. 2009).

Zusammengenommen liefern diese früheren Studien erste Einblicke in die Rolle von ATIP1 in AT₂-Rezeptor-abhängigen Signalwegen, im RAAS-System und bei der Krebsentstehung. Die kardialen Funktionen sowie die zugrundeliegenden ATIP1-abhängigen Regulationsmechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Um diese Frage anzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit isolierte Herzmyozyten eines Mausmodells untersucht, bei dem ATIP1 unter Verwendung einer Genfalle vollständig ausgeschaltet wurde. Die Ausführungen sind nachfolgend noch einmal vereinfacht schematisch zusammengefasst (Abb. 1.5).

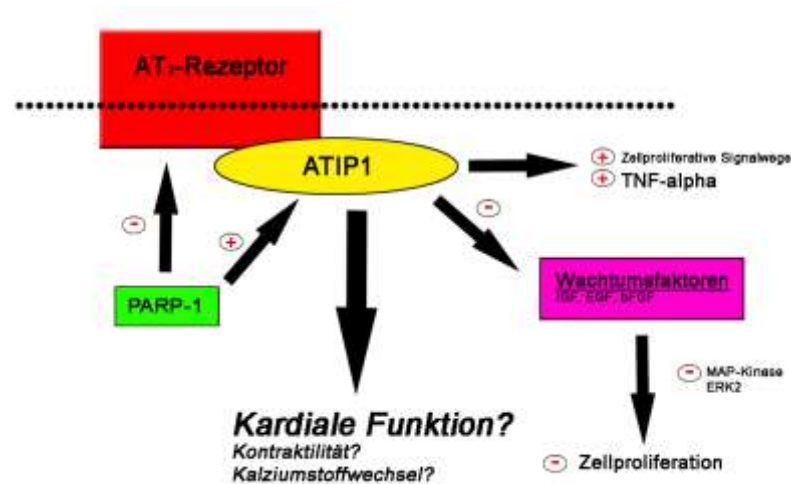


Abb. 1.5 Vereinfachte schematische Darstellung der bis dato erforschten Funktionen von ATIP1. Die kardialen Funktionen, insbesondere die ATIP1-vermittelten Auswirkungen auf Kontraktilität und Kalziumstoffwechsel sollen im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden

1.4.3 Die Rolle von Angiotensin II im Herzen und in der Herzinsuffizienz

Die WHO (World Health Organization) definiert die Herzinsuffizienz zum einen (1.) pathophysiologisch und zum anderen (2.) klinisch (BAENKLER et al. 2007):

1. Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, die Gewebe mit genügend Blut und damit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel in Ruhe und unter Belastung sicherzustellen.
2. Es liegt eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome wie Luftnot, Erschöpfbarkeit, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention bestehen, denen ursächlich eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt.

Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Die weitaus häufigste Vorerkrankung ist die koronare Herzkrankheit, die in den meisten Fällen durch Arteriosklerose bedingt ist. Das RAAS spielt eine wichtige Rolle in der Genese der Arteriosklerose. So konnte eine Erhöhung von Ang II bei Patienten mit Herzinsuffizienz und in arteriosklerotischen Plaques beschrieben werden (DIET et al. 1996, IHARA et al. 1999, VAN DE WAL et al. 2006). Über eine Erhöhung des NF- κ B kommt es zu einer Infiltration von Makrophagen in die Blutgefäßwand und damit zum Beginn oder Fortschreiten arteriosklerotischer Veränderungen (ROSS 1999). Des Weiteren stimuliert Ang II die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und begünstigt dadurch

eine Oxidation von LDL. Oxidierte LDL führen zu Anlagerung von Cholesterin und zu vermehrter Zellbildung, was die Genese der Arteriosklerose noch beschleunigen kann (EHARA et al. 2001). Weitere Mechanismen wie die Aktivierung des Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 sind beschrieben. So greift Ang II mit einer Hemmung der Fibrinolyse in den Gerinnungsprozess ein und kann so das Risiko einer Koronarthrombose erhöhen (VAUGHAN 2002).

Eine weitere häufige Ursache der Herzinsuffizienz ist die arterielle Hypertonie. Es konnte gezeigt werden, dass Ang II in der Genese essentieller Hypertonie eine entscheidende Rolle spielt. Über eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen wirkt Ang II blutdrucksteigernd. Des Weiteren senkt es die Verfügbarkeit von NO, was zu einer Verminderung der dilatativen Kapazität von Arterien führt (NICKENIG und HARRISON 2002). Obendrein erhöht es die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Endothelin. Dieser Mechanismus führt zu einer weiteren Potenzierung der vasokonstriktiven und blutdrucksteigernden Wirkung von Ang II (ROMERO und RECKELHOFF 1999).

Neben der arteriellen Hypertonie, spielt Ang II auch bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie bei Patienten mit Hypertonie eine entscheidende Rolle. Ang II führt neben der Induktion von MAP-Kinasen auch zu einer Fibrosierung des Myokards und zwar über eine Stimulation der Kollagensynthese und des Fibroblastenwachstums (WEBER 1997). Außerdem kommt es über eine Hemmung der Matrix Metalloproteinase 1 zu einer Erhöhung der extrazellulären Kollagenablagerung, was zu weiterer Fibrosierung führt (LAVIADES et al. 1998). Diese Veränderungen wirken sich ungünstig auf die Dehnfähigkeit des Herzens und damit auf die diastolische Compliance aus und beschleunigen das Fortschreiten einer bestehenden Herzinsuffizienz.

Während bei beginnender Herzinsuffizienz die Aktivierung neurohumoraler Systeme die kurzfristige Stabilisierung der Myokardfunktion erlauben und damit die Perfusion lebenswichtiger Organe gewährleisten, ist eine chronische Aktivierung kontraproduktiv und trägt wesentlich zu einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz bei. Es kommt zu einem sog. Circulus vitiosus, den Abb. 1.6 darstellt.

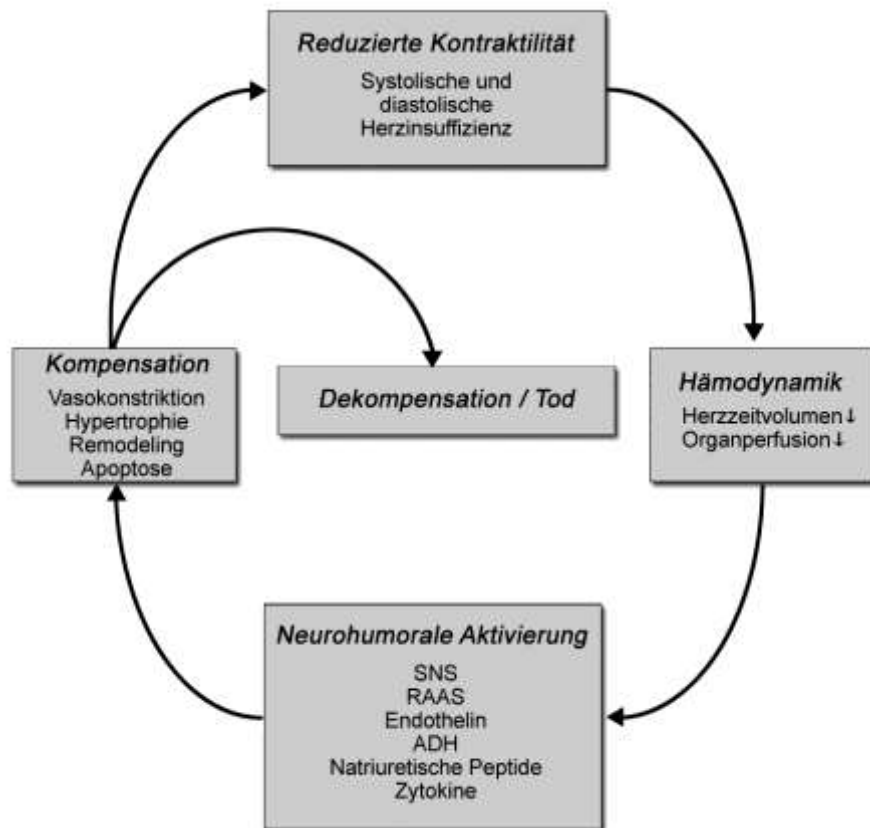


Abb. 1.6 Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz. SNS = Sympathisches Nervensystem, ADH = Antidiuretisches Hormon (modifiziert nach WEIL und SCHUNKERT 2006)

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine medikamentöse Behandlung mit ACE-Hemmern oder AT_1 -Blockern einen eminent positiven Effekt bei der Behandlung von Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzhypertrophie und der Herzinsuffizienz bietet. Zudem wurde in zahlreichen klinischen Studien gezeigt, dass ACE-Hemmer und AT_1 -Blocker direkt das Überleben von Hochrisiko-Patienten mit Herzinsuffizienz verbessern, weshalb sie heute eine wichtige Säule in der medikamentösen Behandlung zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen (PFEFFER et al. 1992). Dies unterstreicht die außerordentliche Bedeutung von Ang II als wesentlichen Faktor in der Genese der Herzinsuffizienz.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des AT₂-Rezeptors und das mit diesem Rezeptor assoziierte Protein ATIP1 in einem Mausmodell im Herzen näher untersucht werden. Zunächst sollen die Auswirkungen auf die Herzgröße durch den Verlust von ATIP1 untersucht werden. Das Hauptaugenmerk der Arbeit soll jedoch auf den funktionellen Messungen an isolierten Herzmuskelzellen liegen. Hierbei sollen wichtige Aspekte der elektromechanischen Kopplung auf eine mögliche funktionelle Interaktion mit ATIP1 untersucht werden. Dazu gehörend wird die Kraft-Frequenz-Beziehung als Maß für die kontraktile Funktion der Zellen untersucht. Zudem soll auch das Relaxationsverhalten im Hinblick auf die SERCA2a- und die NCX-Funktion betrachtet werden. Sowohl der Kalziumgehalt des sarkoplasmatischen Retikulums als auch die fraktionelle Kalziumfreisetzung werden gemessen. Um den Einfluss von ATIP1 und dessen regulatorischen AT₂-Rezeptor näher zu charakterisieren, kommen in den Experimenten dieser Arbeit Messungen mit dem Peptidhormon Angiotensin II, dem AT₂-Agonisten CGP42112A und Messungen mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin vor.

Im Einzelnen ergeben sich aus den Ausführungen die folgenden Fragestellungen:

1. Führt der Verlust des AT₂-interacting Protein 1 (ATIP1) zu Herzhypertrophie?
2. Führt der Verlust von ATIP1 zu Änderungen in der Kraft-Frequenz-Beziehung?
3. Führt der Verlust von ATIP1 zu Änderungen im Relaxationsverhalten der Zellen?
4. Führt der Verlust von ATIP1 zu einem veränderten SR-Ca²⁺-Gehalt?
5. Gibt es Unterschiede in der fraktionellen SR-Ca²⁺-Ausschüttung?
6. Führt der Verlust von ATIP1 zu Änderungen der NCX-Funktion?
7. Inwieweit beeinflusst Angiotensin II die funktionellen Messungen von ATIP1-KO-Mäusen?
8. Inwieweit beeinflusst der AT₂-Agonist CGP42112A die funktionellen Messungen von ATIP1-KO-Mäusen?
9. Inwieweit beeinflusst die beta-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin die funktionellen Messungen von ATIP1-KO-Mäusen?
10. Gibt es altersspezifische Unterschiede?

2 Material und Methoden

2.1 ATIP1-KO-Mäuse

Die Generierung der ATIP1-KO-Mäuse wurde im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Schuh (Universität Würzburg) durchgeführt. Dabei kam der Einsatz einer sogenannten Genfalle zur Verwendung. In dieser Arbeit wurden ATIP1-KO-Mäuse sowie WT-Wurfgeschwister als Kontrolle mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129/Ola \times C57Bl/6) verwendet.

2.1.1 Die Generierung von ATIP1-Knockout-Mäusen (ATIP1-KO)

Um die physiologischen Funktionen von ATIP1 *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen, wurden ATIP1-KO-Mäuse durch Blastozysteninjektion des embryonalen Stammzell-Klons RRA048 (*International Gene Trap Konsortium*) generiert. In dieser Zelllinie wurde die Genfalle zwischen Exon drei und vier der herzspezifischen ATIP1-Spleißvariante inseriert. Die so gewonnenen chimären Männchen wurden daraufhin zur Produktion von ATIP1-KO-Mäusen verwendet. Diese waren lebensfähig, fruchtbar und makroskopisch nicht von den WT-Kontrollen zu unterscheiden. Die Genotypisierung der Mäuse wurde über PCR-Analysen im Labor von Prof. Dr. K. Schuh vorgenommen.

Die erfolgreiche Ausschaltung des ATIP1-Gens in ATIP1-KO-Mäusen wurde zunächst auf RNA-Ebene durch RT-PCR unter Verwendung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen von ATIP1-KO und WT-Wurfgeschwistern getestet und auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Die RT-PCR von RNA-Proben von ATIP1-KO-Herzen ergab kein PCR-Produkt. Nachfolgende Western-Blot-Analysen mit polyklonalen Kaninchen-Anti-ATIP1-Antikörpern gegen den konservierten C-Terminus von ATIP1 bestätigten den ATIP1-Mangel auf Protein-Ebene in allen getesteten Organen (Herz, Lunge, Leber und Milz).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unabhängig voneinander zwei Messreihen durchgeführt. Zum einen wurde eine Gruppe jüngerer ATIP1-KO-Mäuse im Vergleich zu ihrer WT-Gruppe (Gruppe A) und zum anderen eine Gruppe älterer ATIP1-KO-Mäuse im Vergleich zu ihrer WT-Gruppe (Gruppe B) untersucht. Bei beiden Gruppen wurde jeweils das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis als Marker für die Herzhypertrophie bestimmt sowie die weiter unten beschriebenen Epifluoreszenz-Messungen durchgeführt (s. Ergebnisse).

2.2 Isolierung der ventrikulären Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen

Die durchgeführten Messungen in dieser Arbeit wurden an isolierten Herzmuskelzellen vorgenommen. Die Isolierung der Herzmuskelzellen wird im Folgenden beschrieben. Diese Methode kam bereits in mehreren Publikationen zur Anwendung (MAIER et al. 2003; WAGNER et al. 2006; SAG et al. 2007).

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung der niedersächsischen Tierschutzbehörde (Tierversuchsanzeigen Mai 2003 und August 2006, für die „Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 9.02 und T 15.06, Bezirksregierung Braunschweig; Anzeigende: Dr. Harald Kögler für T 9.02 und Prof. Dr. L. S. Maier für T 15.06) und in Übereinstimmung mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Mäuse gewogen. Anschließend wurde jede Maus mit 800 µl des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Baxter Deutschland GMBH) in einem Exsikkator narkotisiert. Nach erfolgreicher Betäubung wurde die Maus aus dem Exsikkator genommen und bauchwärts auf dem Präparationstisch durch Genickbruch getötet. Dann wurde die Maus auf den Rücken gedreht und an allen vier Extremitäten an der Unterlage befestigt. Die Bauchdecke wurde mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und in der mittleren Axillarlinie bis auf die Eingeweide eröffnet. Im Folgenden wurde der Processus xyloideus des Sternums mit einer chirurgischen Klemme festgehalten und das Zwerchfell mit einer kleinen chirurgischen Schere durchtrennt. Um nun das Herz möglichst ohne Lungengewebe aus dem Thorax zu explantieren, wurde eine gebogene Pinzette unter das offenliegende Herz geschoben, die Herzbasis gefasst und angehoben. Nun wurde der Gefäßbaum des Herzens an der Herzbasis mit einer Schere durchtrennt und das Herz als Ganzes entnommen. Anschließend wurde eine mit Eis gekühlte und mit Isolationstyrode befüllte Präparationsschale verwendet, um das Herz unter einem Binokular säuberlich von Lungengewebsresten zu befreien. Das Herz wurde gewogen und wieder zurück in die Präparationsschale überführt. Dies war erforderlich, um später das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis bestimmen zu können. Unter dem Binokular wurde dann die Aorta ascendens mit einer modifizierten Injektionskanüle retrograd kanüliert und durchgespült. Im weiteren Verlauf wurde die Aorta dann mittels einer kleinen Gefäßklemme und eines Seidenfadens an der Kanüle fixiert und retrograd perfundiert. Dabei wurden die

noch blutgefüllten Koronarien von Blut befreit und das Herz erschien nun gelblich bis transparent.

Für die sich anschließende Gewinnung der Kardiomyozyten wurde eine modifizierte Perfusionsanlage nach Langendorff verwendet (LANGENDORFF 1895, siehe Abb. 2.1). Vor Versuchsbeginn wurde diese Anlage zwei Mal mit Isolationstyrode gespült und mittels eines Wasserbads auf physiologische 37°C erwärmt. Bei dieser Temperatur waren maximale Enzymaktivität und optimale koronare Perfusionsbedingungen gewährleistet.

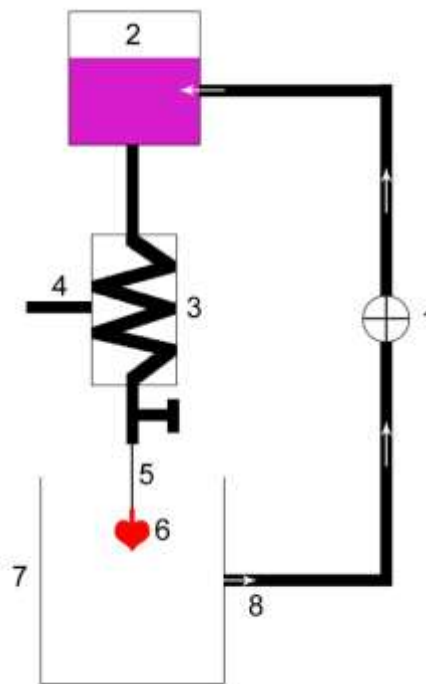


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. 1. Rollenumwälzpumpe; 2. Enzymhaltige Tyrode; 3. Temperierte Blasenfalle; 4. Zulauf aus dem Wärmebad; 5. Kanüle; 6. Mäuseherz mit abgesetztem Aortenstumpf; 7. Auffangbehälter; 8. Ablauf zur Pumpe

Das kanülierte Herz wurde nun an die Langendorff-Anlage angeschlossen und bei konstanter Flussgeschwindigkeit mit einer kalziumfreien Tyrode für 5 min durchgespült. Zugleich wurden möglichst alle eventuell vorhandenen Thromben entfernt. Nach erfolgreicher Spülung wurde das Herz 7-10 min mit einer Enzymtyrode perfundiert. Diese enthielt Liberase (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim), eine Enzymmischung aus Proteasen und Kollagenase, die das bindegewebige Herzgerüst auflösten und die einzelnen Myozyten aus ihrem zellulären Verband lösten. Ein erfolgreicher Verdauungsvorgang des Herzens zeigte

sich in einem „Aufquellen“ und in einem Farbwechsel von rötlich zu bräunlich. Anschließend wurde das Herz von der Langendorff-Anlage abmontiert, die Vorhöfe mit einer chirurgischen Schere von den Ventrikeln getrennt und verworfen und die Ventrikel mechanisch in einer mit Isolationstyrode befüllten Petrischale zerkleinert. Die dabei entstandene „breiige“ Flüssigkeit wurde durch einen Filter (Nylongaze mit einer Porengröße von 200 µm) in eine sog. Stop-Tyrode überführt, welche die Aktivität der Verdauungsenzyme hemmte und den weiteren Verdauungsvorgang des Herzens stoppte. Darauf aufbauend wurden die isolierten Zellen in vier Schritten mit steigenden Kalziumkonzentrationen konfrontiert, bis die gewünschte Konzentration von 1 mM [Ca²⁺] erreicht war und die Zellen für die Messungen am Epifluoreszenz-Setup bereit waren.

2.3 Erhebung biometrischer Daten

Vor jeder Herzexplantation wurden die Mäuse gewogen. Um Blut aus den Vorhöfen und Ventrikeln zu entfernen, wurde anschließend das entnommene Herz zunächst auf einem Vliespapier ausgedrückt und danach auf einer Feinwaage gewogen. Das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG in [mg/g]) dient als geeignetes Maß um die Herzgröße und Herzhypertrophie zu untersuchen.

$$\text{Herzgewicht [mg]/Körpergewicht [g]} = \frac{\text{Herzgewicht}}{\text{Mausgewicht}}$$

Formel 2.1 Berechnung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis [HG/KG in [mg/g]

2.4 Das Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie

Die isolierten Kardiomyozyten wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Messanlage untersucht. Bei der Epifluoreszenzmikroskopie handelt es sich um ein Spezialverfahren der Lichtmikroskopie. Im Gegensatz zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie sitzt bei der Epifluoreszenzmikroskopie das zu untersuchende Präparat jedoch über (gr.: epi = auf) dem Vergrößerungsobjektiv und wird von unten bestrahlt. Das Präparat wird mit bestimmten Farbstoffen (Fluorochromen) beladen, die die Fähigkeit zur Fluoreszenz besitzen. Fluoreszenz ist die Eigenschaft von Stoffen, unter wellenlängenspezifischer Bestrahlung selbstleuchtend zu sein. Die bei der Epifluoreszenzmikroskopie zur Anwendung kommenden fluoreszierenden Farbstoffe werden mit Licht einer bestimmten

Wellenlänge bestrahlt (Anregungslicht). Die Farbstoffe absorbieren das kurzwelligere, energiereichere Anregungslicht und emittieren längerwelliges, also energieärmeres Licht. Mit der angeschlossenen Messapparatur ist es möglich, schnell und sensibel jene Fluoreszenzstrahlung zu messen.

2.4.1 Die Kalzium-Fluoreszenzfarbstoffe

Je nach chemischer Struktur weisen die in der Epifluoreszenzmikroskopie verwendeten Farbstoffe eine unterschiedlich starke Affinität zu bestimmten Ionen auf. Der in dieser Arbeit verwendete kalziumsensitive Farbstoff Fluo-3 AM bildet einen Komplex mit Ca^{2+} -Ionen. Die verschiedenen Kalzium-Fluoreszenzfarbstoffe wurden seit den 1980er Jahren entwickelt, anfangs maßgeblich durch Tsien und seine Mitarbeiter (TSIEN 1980; TSIEN et al. 1982; GRYNKIEWICZ et al. 1985). Sie sind strukturbiochemisch den Kalzium-Chelatoren wie beispielsweise BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) ähnlich. Zwei wichtige Eigenschaften der kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffe sind also die Bindung der Ca^{2+} -Ionen einerseits und andererseits die Fähigkeit nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitation), die Lichtenergie in einer anderen Wellenlänge abzugeben (Emission). Die Fluoreszenzintensität dieser Farbstoffe liegt dabei deutlich über der Eigenfluoreszenz von Zellen und variiert eng in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration in der jeweiligen Zelle. Da Kalzium bei der elektromechanischen Kopplung und bei der Kontraktion von Herzmuskelzellen eine Schlüsselrolle spielt, lassen sich über die Messung der sog. Ca^{2+} -Transienten mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe qualitative und mit manchen Fluoreszenzfarbstoffen auch quantitative Aussagen über den Kalziumstoffwechsel von Herzmuskelzellen treffen.

2.4.2 Der kalziumsensitive Farbstoff Fluo-3 AM

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mit dem kalziumsensitiven Farbstoff Fluo-3 AM durchgeführt, welcher ursprünglich von MINTA et al. (1989) entwickelt wurde. An Kalzium gebunden, erhöht Fluo-3 AM seine Fluoreszenzintensität um das 100-Fache, ohne gebundenes Kalzium zeigt dieser Farbstoff keine messbare Autofluoreszenz. Fluo-3 AM ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff und ist deshalb nicht geeignet, absolute Kalziumkonzentrationen zu messen, da er über feste Absorptions- und Emissionsmaxima verfügt, die nicht von der Kalziumkonzentration, sondern von der Bindung an Kalzium abhängen. Die Bestimmung der Kalziumkonzentration ist deshalb nur indirekt kalkulierbar. Ein

großer Vorteil dieses Farbstoffes ist jedoch sein deutlich günstigeres Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundrauschen, ganz im Gegensatz zu ratiometrischen Farbstoffen (z.B. Indo-1 AM, Fura-2 AM), die zwar eine direkte Bestimmung von absoluten Kalziumkonzentrationen zulassen, jedoch wesentlich störanfälliger und unsauberer sind. Deshalb hat man sich für die Experimente in dieser Arbeit für den nicht-ratiometrischen Farbstoff Fluo-3 AM entschieden. Fluo-3 AM ist in seiner Form als Azetoxymethylester (AM) lipophil und somit membrangängig. So kann er in die Zellen entlang des Konzentrationsgradienten diffundieren. Innerhalb der Zelle kommt es anschließend durch Esterasen zu einer Spaltung von Fluo-3 AM in den impermeablen, polaren und eigentlichen Farbstoff Fluo-3 sowie in einen Azetoxymethanol-Rest. Der hydrophile Farbstoff Fluo-3 ist in der Zelle eingeschlossen und kann nun an intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen binden.

Regt man den Komplex aus Farbstoff und Ca^{2+} -Ionen mit einer Xenon-Lampe an, die besonders stark im Spektrumbereich der spezifischen Anregungswellenlänge für Fluo-3 (488 nm) leuchtet, emittiert der Farbstoff Licht im Bereich von ~525 nm, also in einer etwas größeren Wellenlänge als das Anregungslicht. Die Differenz der Wellenlängen zwischen Anregungs- und Emissionslicht wird auch als Stokes-Differenz oder Stokes-Shift bezeichnet und beträgt in der Regel 20-50 nm. Mithilfe einer geeigneten Messanlage kann das emittierte Licht gemessen werden. Die Dissoziationskonstante (K_d) von Fluo-3 liegt bei etwa 390 nM.

In Abb. 2.2 sind die Strukturformel eines Fluo-Analogons und das Emissionsspektrum in Lösung abgebildet. Die Herstellung und Zusammensetzung von Fluo-3 ist in Kapitel 2.9 (Lösungen) beschrieben.

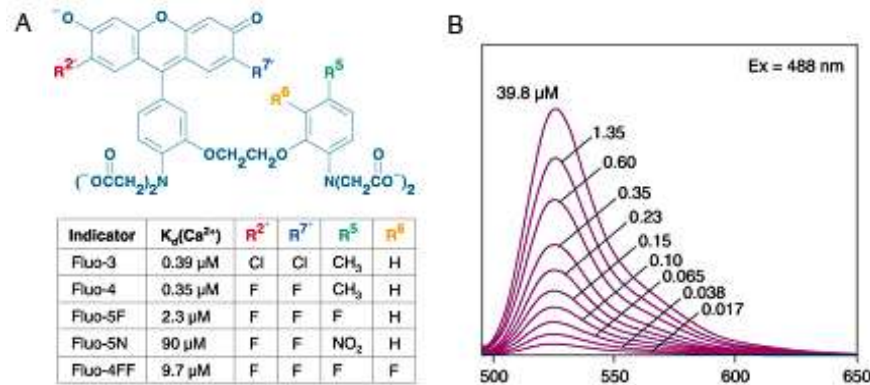


Abb. 2.2 Strukturformeln von verschiedenen Fluo-Analoga (A) und das Emissionsspektrum (B) von Fluo-3 in Lösung. Auf der x-Achse ist die Emissionswellenlänge in nm aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Intensität der Emission, die Anregung erfolgt bei 488 nm. Die jeweiligen Zahlen im Diagramm geben die freien Kalziumkonzentrationen an. Modifiziert nach der Online-Version des Handbuchs THE HANDBOOK – A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES (2007)

2.5 Die Funktionsweise des verwendeten Epifluoreszenz-Setup

Die Messungen dieser Arbeit wurden an einem Epifluoreszenz-Setup der Firma ION OPTIX (ION OPTIX Europe, Wageningen, Niederlande) durchgeführt.

Das Prinzip der Experimente beruht einerseits auf der Messung von Sarkomerverkürzung sowie auf der Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration im Sinne von Ca^{2+} -Transienten während der Systole und Diastole von isolierten Herzmuskelzellen. Die Erfassung beider Messungen erfolgt dabei in Echtzeit am Computer.

2.5.1 Die Messung der fraktionellen Myozytenverkürzung

Um die Änderung der Sarkomertängen zu erfassen, wurden die einzelnen Myozyten mit einer Stimulationselektrode bei verschiedenen Frequenzen (in dieser Arbeit mit 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz) zur Kontraktion angeregt. Gleichzeitig wurden diese mit rotem Licht einer Wellenlänge von >650 nm beleuchtet und mithilfe einer Myozytenkamera (MyoCam™) gefilmt. Die Myozytenkamera ist dabei in der Lage, die Länge der einzelnen Sarkomere optisch zu messen. Das optische Signal der Sarkomere wird dabei an einen Computer weitergeleitet, auf dem eine spezielle Software von ION OPTIX (ION WIZARD ACQUIRE VERSION 4.0) die gemessenen

Längenänderungen der Sarkomere detektieren (ION OPTIX, *sarcomere length detection system*), die gemittelte Sarkomerlänge errechnen (in μm) und diese dann grafisch im Programm darstellen kann.

2.5.2 Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten

Um den Verlauf des zytosolischen Kalziumspiegels zu beobachten, wurden die einzelnen mit Fluo-3 beladenen Myozyten mit einer UV-Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE, USHIO Inc., Japan) beleuchtet. Hinter die UV-Lampe wurde ein Filtersystem ($480\pm 15\text{ nm}$) geschaltet, das aus dem Weißlicht die zur Anregung von Fluo-3 adäquate Wellenlänge von 488 nm herausfilterte. Anschließend wurde über einen dichroitischen Filterspiegel (505 DCLP) das Anregungslicht auf die mit Fluo-3 beladenen Myozyten in der Messkammer reflektiert. Dichroitische Spiegel besitzen die Fähigkeit einerseits Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs zu reflektieren (hier: das kurzwellige Anregungslicht) und andererseits Licht eines anderen Wellenlängenbereichs durchzulassen (hier: das längerwellige Fluoreszenzlicht). Daraufhin wurde das vom Farbstoff emittierte Licht und das Durchlicht des Mikroskops nach Passage des ersten dichroitischen Spiegels auf einen weiteren dichroitischen Spiegel (685 DCLP) geleitet, der in einem Winkel von 45° zum Strahlengang ausgerichtet war. Dieser trennte das sichtbare Licht, das für die Messung der Sarkomerverkürzung wichtig war und welches zur Kamera geleitet wurde, vom emittierten Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal, das zum Photomultiplier gelenkt wurde. Diesem war entsprechend dem Emissionsmaximum von Fluo-3 bei 525 nm ein Filter ($535\pm 20\text{ nm}$) vorgeschaltet. Der Photomultiplier konnte nun das optische Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal in ein elektrisches Signal umwandeln. Anschließend wurde über ein Fluoreszenz-System-Interface (IONOPTIX) das elektrische Signal in für den Computer verwertbare Daten konvertiert und konnte jetzt von der Software verarbeitet und dargestellt werden. Alle hier erwähnten Filter und Filterspiegel stammten von der Firma Chroma Technologie Corp., USA.

Zur Veranschaulichung ist in Abb. 2.3 ein vereinfachtes Schema des Epifluoreszenz-Setups sowie eine Monitorarstellung der simultanen Messung von Sarkomerverkürzung und Ca^{2+} -Transienten abgebildet.

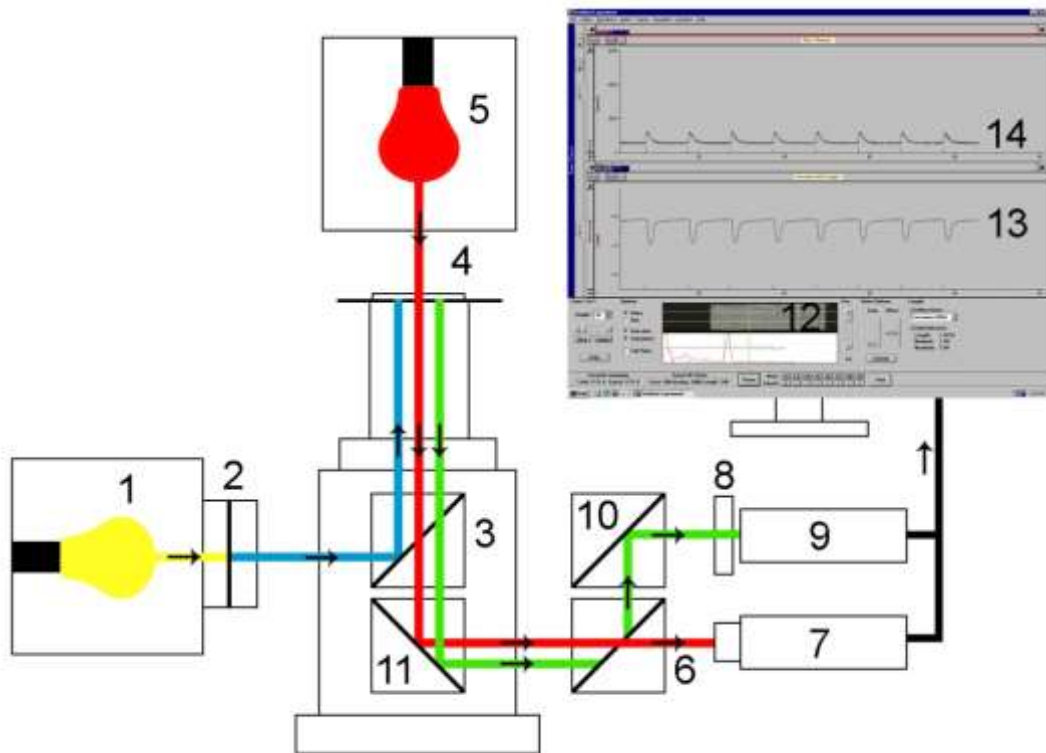


Abb. 2.3 Vereinfachtes Schema des IonOptix Epifluoreszenz-Setups für Fluo-3. **Gelb:** Weißlicht der Xenonlampe; **Blau:** Anregungslicht für Fluo-3 (488 nm); **Rot:** Durchlicht des Mikroskops; **Grün:** Emittiertes Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal; 1. Xenon Lampe; 2. Filtersystem (48 ± 15 nm); 3. Dichroitischer Filterspiegel (505 DCLP); 4. Mit Fluo-3 beladene Myozyten; 5. Rotlichtlampe des Mikroskops; 6. Dichroitischer Spiegel (685 DCLP); 7. MyoCamTM; 8. Filter (535 ± 20 nm); 9. Photomultiplier; 10., 11. Mehrere einfache Spiegel; 12. Herzmuskelzelle am Monitor; 13. Längenänderung der Sarkomere am Monitor; 14. Ca^{2+} -Transienten am Monitor

2.6 Versuchsdurchführung und Versuchsprotokoll

2.6.1 Präparation der Messkammern und der Messanlage

Bevor mit den Messungen am Epifluoreszenzmikroskop begonnen werden konnte, mussten die Myozyten unter anderem auf den speziell entwickelten Messkammern ausplattiert werden. Diese verfügten über einen dünnen Glasboden mit einem darauf sitzenden erhabenen Plastikrahmen. Da die Myozyten während der gesamten Messung stetig mit unterschiedlichen Superperfusionstyroden (siehe auch Kapitel 2.9) umspült wurden, benötigte der Plastikrahmen auch ein kleines Loch für das Absaugsystem. Eine schematische Darstellung der verwendeten Messkammer ist in Abbildung 2.4 abgebildet.

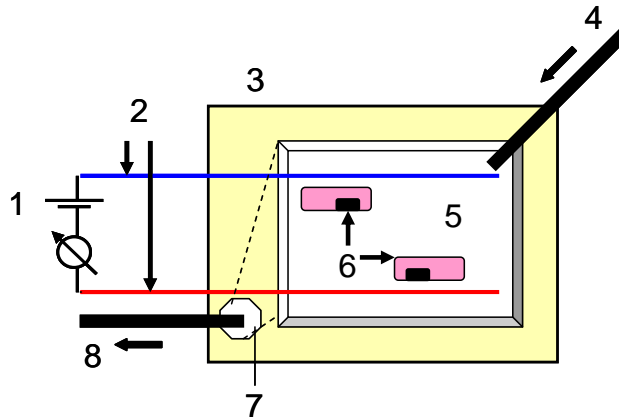


Abb. 2.4 Schematische Darstellung einer Messkammer in der Epifluoreszenz-Messanlage. 1. Spannungsquelle; 2. Stimulationselektrode; 3. Messkammer; 4. Zulauf der Messtyrode; 5. Glasboden; 6. Myozyten; 7. Öffnung für die Absaugung; 8. Absaugung (aus ROKITA 2008, S. 46)

Die Messkammern wurden vor Verwendung mit antibakterieller Seife gereinigt und anschließend mit einem Tuch abgetrocknet. Die Glasböden der Kammern wurden daraufhin mit 1,3 µl Laminin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) laminiert. Laminin besitzt eine adhäsive Eigenschaft und fixiert die Myozyten am Glasboden. Nachdem das Laminin getrocknet war (ca. 10 min), wurden 400 µl der Zellsuspension auf die Kammern verteilt. Für die Sedimentation und die Haftung der Myozyten wurden mindestens 15 min veranschlagt. Etwa acht Messkammern wurden für die Zellen eines Mäuseherzens vorbereitet.

Bevor die Zellen einer Kammer gemessen werden konnten, wurde mit einer Pipette überschüssige Zellsuspension abgenommen und im Anschluss daran die Messkammer mit Fluo-3 AM 15 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation konnte mit der Messung begonnen werden. Um ein besseres Auflösungsvermögen zu gewährleisten, wurde im Ölimmersionsverfahren mikroskopiert. Deshalb wurde auf das Objektiv zunächst ein Tropfen Immersionsöl gegeben. Danach konnte die Messkammer an die Epifluoreszenz-Anlage montiert werden. Der Zulauf der Tyrode, welcher die Zellen der Kammer mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 40 ml/h und einer konstanten Temperatur von $35 \pm 2^\circ\text{C}$ perfundierte, wurde eingestellt, die Absaugung angepasst und die Stimulationstyrode platziert. Die für die Stimulationstyrode benötigte Spannung wurde an die Qualität der isolierten Zellen angepasst. Zunächst wurde die niedrigste Stimulationsspannung eingestellt (Myopacer, ION OPTIX), bei der die Zellen anfangen zu schlagen. Danach wurde von diesem Ausgangswert eine um 25% höhere Spannung eingestellt, welche für das komplette Messprotokoll verwendet

wurde. Im letzten Schritt wurde die Kammer mit der Tyrode etwa 5 min gespült, um Farbstoffreste sowie Zelldetritus und schwimmende Zellen zu beseitigen. Nun konnte mit der Auswahl einzelner Zellen und den Messungen begonnen werden.

2.6.2 Auswahl der Zellen

Bevor einzelne Zellen gemessen wurden, mussten diese sowohl optisch-morphologischen als auch funktionellen Vorgaben entsprechen.

Zellen, die intrazelluläre Veränderungen oder keine erkennbare Querstreifung der Sarkomere aufwiesen sowie Zellen, die sich in Konglomeraten mit anderen Zellen befanden, wurden konsequent von der Messung ausgeschlossen. Auch Zellen, die sich in ihrer Form stark von der für Mäuse typischen Myozytenform unterschieden, wurden nicht gemessen. Abb. 2.5 zeigt eine optisch einwandfreie Herzmuskelzelle, wie sie von der Myozytenkamera am Computer dargestellt wurde.



Abb. 2.5 Exemplarische Computerdarstellung einer Mausmyozyte mit erkennbarer Querstreifung der Sarkomere

2.7 Versuchs- und Messprotokoll

2.7.1 Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung

Um die Kraft-Frequenz-Beziehung zu bestimmen, wurden die Kontraktion und die Ca^{2+} -Transienten bei unterschiedlichen Frequenzen gemessen. Dies erfolgte schrittweise von 0,5 Hz auf 1 Hz, dann auf 2 Hz und schließlich auf 4 Hz. Dabei wurde darauf geachtet, dass jede Zelle unter reproduzierbaren Ruhebedingungen, also ohne Veränderung der Kontraktionsamplitude gemessen wurde (unter sog. *steady-state*-Bedingungen). Jeweils 10-15 Zellverkürzungen und Ca^{2+} -Transienten wurden unter Ruhebedingungen aufgezeichnet und gemittelt. Aus dem Mittelwert wurden dann die jeweiligen Parameter bestimmt. Die fraktionelle Myozytenverkürzung wurde dabei in % der Ruhezelllänge berechnet (siehe Formel 2.2).

$$\text{Fraktionelle Sarkomerverkürzung} = \frac{\text{Diastolische Sarkomerlänge} - \text{Systolische Sarkomerlänge}}{\text{Diastolische Sarkomerlänge}} \times 100$$

Formel 2.2 Berechnung der fraktionellen Myozytenverkürzung

Für die Berechnung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 , wurde die maximale Fluoreszenzintensität der Ca^{2+} -Transienten ($F_{\text{systolisch}}$) während der Systole als Quotient der Fluoreszenz der Zelle während der Diastole ($F_{\text{diastolisch}}$) dargestellt. Dabei wurde von den beiden Werten jeweils die Hintergrundfluoreszenz ($F_{\text{Hintergrund}}$), wie sie in der Umgebung der Zelle vorkam, subtrahiert. F/F_0 berechnet sich also nach folgender Formel:

$$F / F_0 = \frac{F_{\text{diastolisch}} - F_{\text{Hintergrund}}}{F_{\text{systolisch}} - F_{\text{Hintergrund}}}$$

Formel 2.3 Berechnung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0

2.7.2 Bestimmung der Relaxationszeit

Für die Messungen in dieser Arbeit ist die Relaxationszeit (RZ) berechnet worden, die von der Zelle nach Kontraktion benötigt wird, um auf 50% (RZ50%) ihrer Ruhezelllänge zu relaxieren. Entsprechend den Relaxationszeiten für die Zelllänge, wurde für den Ca^{2+} -Abfall diejenigen Relaxationszeiten bestimmt, die die Zelle benötigt um 50% des maximalen Kalziums ($\text{RZ}_{\text{Ca}50\%}$) aus dem Zytosol zu entfernen. Da bei der Maus 90% des Kalziums über die SERCA2a aus dem Zytosol extrudiert werden, eignet sich diese Methode sehr gut dazu, die Funktion der SERCA2a indirekt zu beurteilen. Die restlichen 10% des Kalziums werden über die NCX aus der Zelle entfernt und spielen deshalb bei dieser Messung nur eine untergeordnete Rolle. Die Funktion der NCX wurde in einem weiteren Messprotokoll bestimmt und wird weiter unten im Text aufgeführt.

2.7.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Um den Ca^{2+} -Gehalt des SR zu bestimmen, kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Einerseits die Post-Pausen-Potenzierung und andererseits die koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten. Die Methode der Post-Pausen-Potenzierung

erfolgte im direkten Anschluss an die Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung. Hierbei wurde die Zelle erneut mit einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz stimuliert, bis sie ihren *steady-state* erreichte. Dann wurde die Stimulation für zehn Sekunden unterbrochen. Der Ca^{2+} -Transient, der nach den zehn Sekunden registriert wurde, konnte anschließend mit dem vor der Pause verglichen werden. Die Zunahme des Ca^{2+} -Transients gilt als indirektes Maß für den SR Ca^{2+} -Gehalt (BERS 2001). Abb. 2.6 soll die Methode der Post-Pausen-Potenzierung nochmals veranschaulichen.

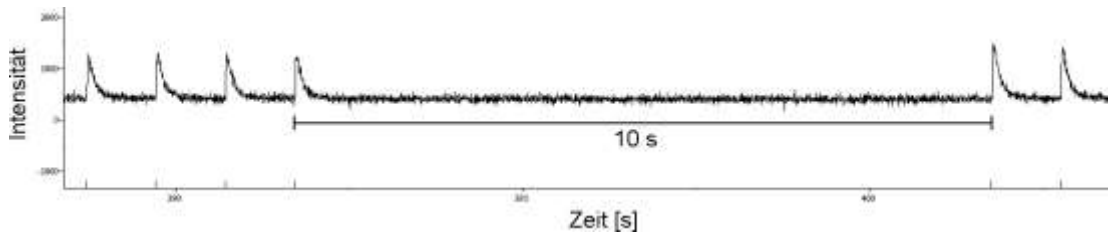


Abb. 2.6 Exemplarischer Ausschnitt einer Originalregistrierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals während einer Post-Pausen-Potenzierung

Anschließend wurde der SR Ca^{2+} -Gehalt mithilfe von koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten gemessen. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Applizierung von koffeinhaltiger Tyrode (siehe Kapitel „Lösungen“) auf die Zelle. Dabei reicht ein einziger Tropfen Koffein aus, der manuell mithilfe einer Injektionsnadel auf die Zelle appliziert wurde. Koffein führt hierbei zu einer reversiblen Öffnung der RyR2, wodurch sich der komplette Ca^{2+} -Gehalt des SR schlagartig in das Zytosol entleert. Die Applikation erfolgte wiederum bei 1 Hz aus dem *steady-state*, wobei die elektrische Stimulation schlagartig unterbrochen und der Koffeintropfen im 1-s-Intervall auf die Zelle appliziert wurde. Der nach Koffeinapplikation registrierte Ca^{2+} -Transient besitzt im Vergleich zu den vorausgegangenen Ca^{2+} -Transienten ein viel höheres Fluoreszenzsignal. Seine Amplitude F/F_0 korreliert in hohem Maße mit der Höhe des SR Ca^{2+} -Gehaltes und macht die Bestimmung des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transients zu einer sehr zuverlässigen Methode für die Beurteilung des SR Ca^{2+} -Gehaltes (BERS 2001). Zur Veranschaulichung ist in Abb. 2.7 ein Ausschnitt einer Originalregistrierung abgebildet, in dem die Methode nochmals verdeutlicht wird.

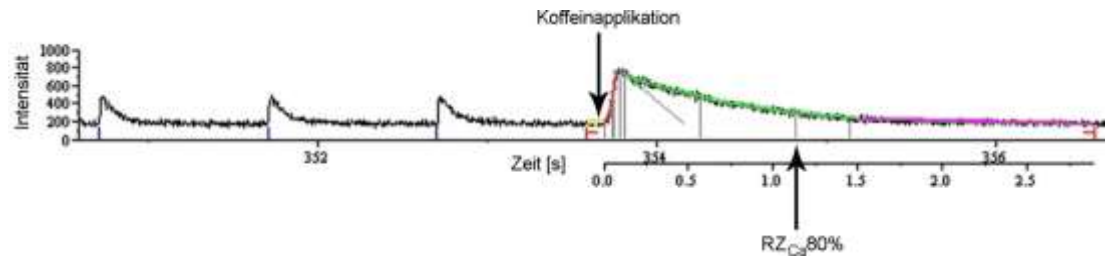


Abb. 2.7 Exemplarischer Ausschnitt einer Originalregistrierung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals vor und nach lokaler Applikation eines Koffeintropfens auf die Zelle. Die hellgrüne Kurve beschreibt den Verlauf der von der Software an den Abfall der Ca^{2+} -Amplitude angenäherten exponentiellen Funktion. $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ beschreibt die Zeitdauer für den Abfall der Ca^{2+} -Amplitude um 80%. Sowohl der Exponent der Funktion als auch die $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ gelten als Indikatoren für die NCX-Funktion

2.7.4 Bestimmung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

Die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung gilt als ein guter Indikator für die Funktionstüchtigkeit und Effektivität der elektromechanischen Kopplung (BERS 2001). Das Verhältnis der Amplitude von Koffein-Transient ($F/F_0 (\text{Koffein})$) zu Ca^{2+} -Transient während der Grundstimulation ($F/F_0 (\text{Grundstimulation})$) eignet sich, um die pro Kontraktion prozentual ausgeschüttete Kalziummenge aus dem SR in das Zytosol qualitativ zu berechnen (*fractional SR Ca^{2+} -release*). Die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung berechnet sich nach folgender Formel.

$$\text{Fraktionelle SR } \text{Ca}^{2+}\text{-Freisetzung} = \frac{F/F_0 (\text{Grundstimulation})}{F/F_0 (\text{Koffein})} \times 100$$

Formel 2.4 Berechnung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

2.7.5 Bestimmung der NCX-Funktion

Aufgrund der durch die Koffeinapplikation induzierten reversiblen Öffnung der RyR2 wird die Ca^{2+} -Extrusion in das SR durch die SERCA2a funktionell ausgeschaltet, da das von den SERCA2a in das SR gepumpte Kalzium sofort wieder über die RyR2 in das Zytosol abgegeben wird. Wie in Abbildung 2.7 zu erkennen, kommt es aber nach Koffeinstimulation trotzdem zu einem Abfall der Fluoreszenz bzw. der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dies beruht auf der Funktion der NCX, die durch die Koffeinapplikation nicht beeinträchtigt sind und infolgedessen Kalzium aus der

Zelle transportieren (BERS 2001). Aus dem Ca^{2+} -Abfall nach Koffeinapplikation ist es deshalb möglich, Rückschlüsse eben nur auf die Funktion der NCX zu ziehen. Für die Auswertung wird einerseits die Relaxationszeit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$) herangezogen, also die Zeit, die benötigt wird, um die maximale Ca^{2+} -Amplitude um 80% im Bezug auf den diastolischen Ausgangswert zu verringern. Je kürzer die Relaxationszeit desto größer ist dabei die Aktivität des NCX. Und andererseits ist es möglich näherungsweise den Exponent τ_{Ca} zu berechnen, der den Krümmungsgrad der monoexponentiellen Kurve beschreibt und damit annäherungsweise die Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol und damit die Funktion des NCX. Ein niedriger τ_{Ca} -Wert bezeichnet einen schnellen Abfall und damit eine schnelle Ca^{2+} -Extrusion bzw. hohe NCX-Aktivität. Die Formel zur Berechnung des Exponenten τ_{Ca} ist nachfolgend dargestellt.

$$\tau_{\text{Ca}} = A \times e^{-\frac{1}{t}}$$

Formel 2.5 Berechnung des Exponenten τ als Maß für die Ca^{2+} -Extrusion aus der Zelle. A: Amplitude des Ca^{2+} -Transienten; t: Zeit; e: Eulersche Zahl

2.7.6 Einfluss der Angiotensin-Rezeptor-Stimulation mit Angiotensin II

Um den rezeptorvermittelten Einfluss von Ang II auf die ventrikulären Herzmuskelzellen *in vitro* zu untersuchen, kam in einer Subserie von Experimenten das synthetisch hergestellte Hormon Ang II (Calbiochem, MERCK KGAA, Darmstadt) zur Anwendung. Dabei handelt es sich um ein zu den Gewebshormonen zählendes Peptidhormon, bestehend aus acht Aminosäuren ($\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$) mit einer Molekülmasse von 1046,18 Da. In der untenstehenden Abb. 2.8 befindet sich die chemische Strukturformel von Ang II.

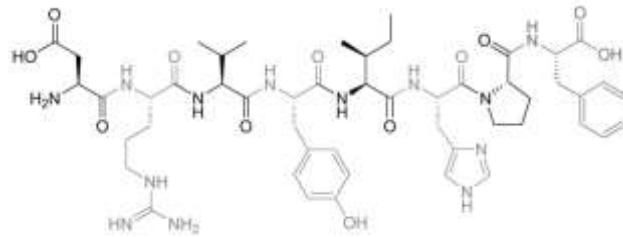


Abb. 2.8 Strukturformel von Angiotensin II. Quelle: Sigma-Aldrich 1996

Ang II besitzt eine hohe Affinität zu AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren und nimmt eine herausragende Rolle in Bezug auf die hämodynamische Regulierung und Struktur des kardiovaskulären Systems ein. Ang II wurde dabei als Zusatz in der Messtyrode in einer Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ eingesetzt.

2.7.7 Einfluss der selektiven AT_2 -Rezeptor-Stimulation mit CGP42112A

In einer weiteren Subserie von Experimenten wurden die Effekte einer selektiven Stimulation des AT_2 -Rezeptors auf Kontraktilität und Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle untersucht. Der AT_2 -Rezeptor-Agonist CGP42112A (Sigma-Aldrich, Steinheim) gilt dabei als ein hochaffiner und hochselektiver Ligand für den AT_2 -Rezeptor (WHITEBREAD et al., 1991). CGP42112A wurde als Zusatz in der Messtyrode in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ eingesetzt. Abb. 2.9 zeigt die Strukturformel von CGP42112A.

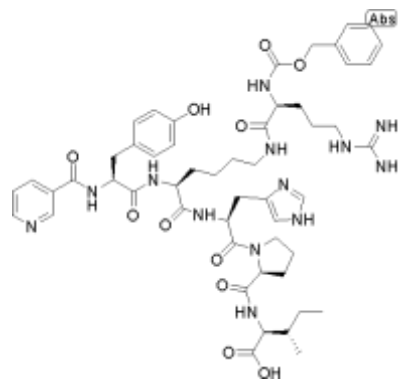


Abb. 2.9 Strukturformel des AT_2 -Rezeptor-Agonisten CGP42112A. Quelle: Sigma-Aldrich 1996

2.7.8 Einfluss der β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin

Um Rückschlüsse auf die generelle Leistungsfähigkeit der untersuchten Herzmuskelzellen zu ziehen, wurde in einer weiteren Subserie von Experimenten der Einfluss der β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin (DL-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol), Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) untersucht. Isoprenalin ist ein Noradrenalin-Derivat, vermittelt seine Wirkung selektiv auf β -Adrenozeptoren und aktiviert β_1 - und β_2 -Rezeptoren. Die Wirkung auf das Herz erfolgt maßgeblich über die Stimulation von β_1 -Rezeptoren, weniger stark über β_2 -Rezeptoren. Dort kommt es im Organismus zu positiv chronotropen, dromotropen, lusitropen und inotropen Effekten. In den schrittmacherinduzierten Einzelzellmessungen dieser Arbeit konnten aber nur die positiv inotropen und lusitropen Wirkungen untersucht werden. Isoprenalin wurde dabei als Zusatz in der Messtyrode in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt. Mit den Aufzeichnungen der Messungen wurde gewartet bis sich die Zellen im *steady-state* befanden. Analog zu den vorhergehenden Untersuchungen, wurden die Kontraktilität und die Ca^{2+} -Transienten, die SERCA2a-Funktion, der SR Ca^{2+} -Gehalt, die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung und die NCX-Funktion untersucht. In Abb. 2.10 ist die Strukturformel von Isoprenalin dargestellt.

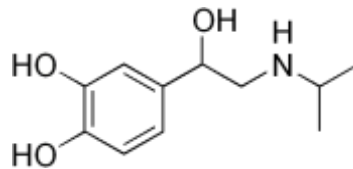


Abb. 2.10 Strukturformel von Isoprenalin. Quelle: Modifiziert nach Sigma-Aldrich 1996

2.8 Erfassung und Auswertung der Daten

Wie bereits oben beschrieben, wurden die Messungen zunächst mit dem Programm IonWizard Acquire Version 4.0 (IonOptix Europe, Wageningen, Niederlande) aufgezeichnet und abgespeichert. Im Anschluss daran, wurden die so erzeugten Messdaten mit dem Programm IonWizard Version 6.0 (IonOptix Europe, Wageningen, Niederlande) analysiert und weiterverarbeitet. Auch die exemplarischen Originalregistrierungen in dieser Arbeit wurden mit diesem Programm generiert.

Die so erzeugten Rohdaten wurden daraufhin in das Programm Microsoft Excel (Microsoft Office Version 2007) exportiert. Dort erfolgte dann die Zusammenfassung in Gruppen, die Tabellenkalkulation und ein Teil der Statistik. Die in dem Ergebnisteil dargestellten Abbildungen zeigen die Mittelwerte der gemessenen

Daten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM: Standard error of the mean) dar, der aus der Standardabweichung nach der Formel 2.6 errechnet wird.

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 2.6 Berechnung des Standardfehlers (SEM); σ : Standardabweichung; n: Anzahl

Ein weiterer Teil der Statistik wie die Analyse mit dem Student's t-Test (gepaart oder ungepaart) oder mit der Zwei-Wege-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (Zwei-Wege ANOVA, Vergleich von longitudinalen Daten mehrerer Gruppen) wurden mit dem Programm SigmaStat Version 3.5 (Access Softec Inc., San Rafael, USA) je nach der entsprechenden Anforderung durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die grafischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm SigmaPlot Version 10.0 (Systat Software, Erkrath), sowie mit Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated) erstellt.

2.9 Lösungen

2.9.1 Herstellung und Zusammensetzung der Isolationstyroden

Lösung	Substanz	Molarität [mM]	
Isolationstyrode ohne Kalzium	NaCl	113	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C
	KCl	4,7	
	KH ₂ PO ₄	0,6	
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2	
	NaHCO ₃	12	
	KHCO ₃	10	
	HEPES	10	
	Taurine	30	
	BDM	500	
	Glukose	5,5	
Phenol-Rot	0.032		

Tab. 2.1 Zusammensetzung der Ca²⁺-freien Isolationstyrode; ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser

Auf der Isolationstyrode aufbauende Tyroden

Lösung	Substanz	Konzentration	gelöst in Isolationstyrode; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C
Stop-Tyrode	BCS	10 %	
	CaCl ₂	0,0125 mM	
Enzym-Tyrode	Liberase® Blendzyme 1	7,5 mg/ml	
	Trypsin (10X)	0,6 %	
	CaCl ₂	0,0125 mM	

Tyroden zum Kalziumaufbau

Schritt I	BCS CaCl ₂	5 % 0,0125 mM	Gelöst in Isolationstyrode; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C
Schritt II	BCS CaCl ₂	5 % 0,025 mM	
Schritt III	BCS CaCl ₂	5 % 0,05 mM	

Tab. 2.2 Zusammensetzung von auf der Isolationstyrode aufbauenden Tyroden: Stop-Tyrode, Enzym-Tyrode, Tyroden des Kalziumaufbaus in drei Schritten

2.9.2 Herstellung und Zusammensetzung des Farbstoffes Fluo-3 AM

Um den einsatzfähigen Fluoreszenz-Farbstoff Fluo-3 AM herzustellen, musste zunächst die nicht-ionische Detergens-Lösung Pluronic (Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Block-Kopolymer, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) hergestellt werden. Pluronic dient dabei als Hilfsstoff, der dem Farbstoff eine erleichterte Passage über die Zellmembran ermöglicht. So konnte die Farbstoff-Inkubationszeit der Myozyten erheblich gesenkt werden. Als Lösungsmittel wurde dafür Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

Lösung	Substanz	Konzentration	
Pluronic-Lösung	Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich)	20 % w/v	gelöst in DMSO

Tab. 2.3 Zusammensetzung der Pluronic-Lösung; Pluronic: Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Block-Kopolymer; DMSO: Dimethylsulfoxid

Nach Herstellung der Pluronic-Lösung wurde der einsatzfähige Farbstoff aus der Farbstoff-Vorratslösung (Farbstoff-Stock, Konzentration 1 mM, gelöst in DMSO)

unter Zusatz von Messtyrode hergestellt. Untenstehend ist die Zusammensetzung tabellarisch dargestellt.

Lösung	Substanz	Konzentration	
Farbstoff-Stock	Fluo-3 AM (TefLabs)	1 mM	gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
Farbstoff-Ansatz für die Experimente	Fluo-3 AM Stock- Ansatz (s. o.)	10 µM	gelöst in Messtyrode bei RT, lichtgeschützte Lagerung bei -20°C
	Pluronic-Lösung	0,02 % w/v	

Tab. 2.4 Zusammensetzung und Herstellung der Farbstoff-Ansätze von Fluo-3 AM

RT: Raumtemperatur; DMSO: Dimethylsulfoxid

2.9.3 Messtyroden

Lösung	Substanz	Molarität [mM]		
Messtyrode mit 1 mM Kalzium	NaCl	140	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C	
	KCl	4		
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1		
	Glukose	10		
	HEPES	5		
	MgCl ₂	1		
	<u>Optional als Zusatz</u>			
	Koffein	10		
	Angiotensin II	5 x 10 ⁻⁴		
	CGP42112A	5 x 10 ⁻³		
Isoprenalin	5 x 10 ⁻⁶			

Tab. 2.5 Zusammensetzung und Herstellung der Messtyroden

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unabhängig voneinander zwei Serien von Experimenten durchgeführt. Zum einen wurden jüngere ATIP1-KO-Mäuse (n=6) im Vergleich zu ihrer Wildtyp-Gruppe (n=6) (**Gruppe A**) und zum anderen ältere ATIP1-KO-Mäuse (n=7) im Vergleich zu ihrer WT-Gruppe (n=7) untersucht (**Gruppe B**). Das Alter der jeweiligen Mäuse in Gruppe A und Gruppe B war signifikant unterschiedlich zueinander (WT Gruppe A versus WT Gruppe B: $6,94 \pm 1,36$ Monate versus $12,95 \pm 6,49$ Monate, $p < 0,05$; ATIP1-KO Gruppe A versus ATIP1-KO Gruppe B: $6,33 \pm 0,44$ Monate versus $16,2 \pm 3,98$ Monate, $p < 0,05$). Innerhalb einer Gruppe war das Alter der Mäuse ähnlich, so dass von einer guten Vergleichbarkeit auszugehen ist. In Gruppe A wurden die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen miteinander verglichen. In Gruppe B wurden zusätzlich zu den basalen Messungen auch Messungen unter Verwendung von Angiotensin II durchgeführt sowie unter Verwendung des AT_2 -Rezeptor-Agonisten CGP42112A und des Noradrenalin-Derivats Isoprenalin. Bei beiden Gruppen wurde das Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis als Marker für die Herzhypertrophie bestimmt. Dabei wurde Gruppe A getrennt von Gruppe B betrachtet.

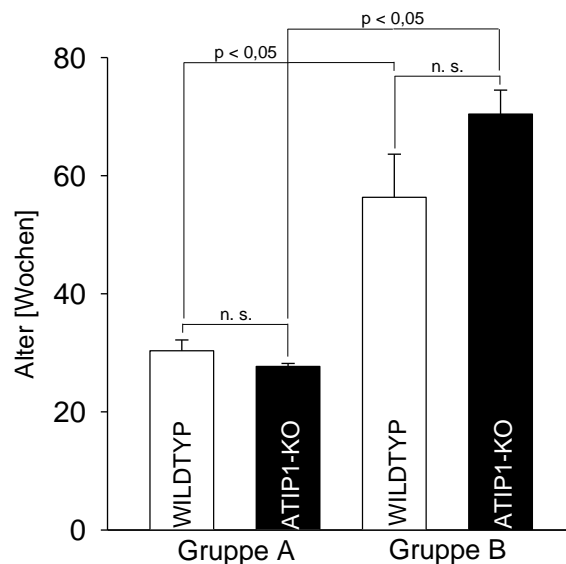


Abb. 3.1 Vergleich des Alters der verwendeten Mäuse in Wochen. Aufgeführt sind die Alter von 6 ATIP1-KO Mäusen und 6 WT-Mäusen in Gruppe A sowie 7 ATIP1-KO-Mäusen und 7 WT-Mäusen in Gruppe B; n. s.: nicht signifikant

3.1 Auswertung des Herz- zu Körpergewicht-Verhältnisses

Betrachtet man das Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis zeigen sich zwischen WT und ATIP1-KO in Gruppe A und Gruppe B keine Unterschiede (s. Abb. 3.2). Anzeichen für eine Herzhypertrophie lassen sich somit bei ATIP1-KO nicht erkennen.

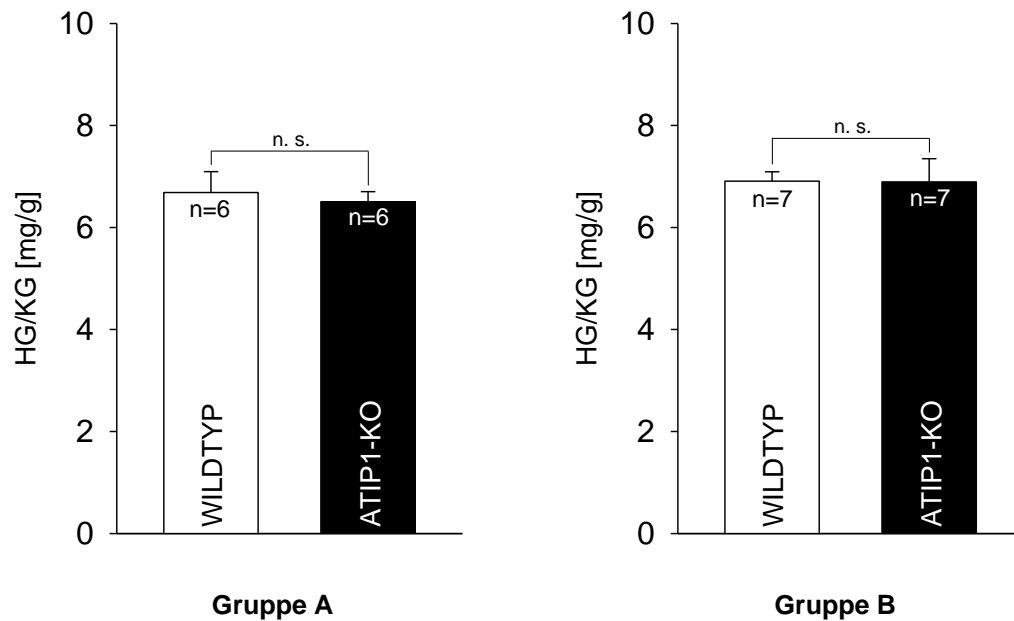


Abb. 3.2 Vergleich des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (HG/KG in mg/g) zwischen WT- und ATIP1-KO-Mäusen

3.2 Funktionelle Messungen am Epifluoreszenzmikroskop

Abb. 3.3 zeigt eine exemplarische Darstellung des gesamten Messprotokolls einer Herzmuskelzelle mit der simultanen Aufzeichnung der Zellverkürzung und der Ca^{2+} -Transienten wie es im Rahmen der Untersuchungen durchgeführt wurde. Zunächst wurde die Kraft-Frequenz-Beziehung sowie die SERCA2a-Funktion anhand variierender Stimulationsfrequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz) untersucht. Mithilfe der sich anschließenden 10 s Post-Pausen-Potenzierung und der Koffeinapplikation wurde der SR Ca^{2+} -Gehalt gemessen. Aus dem Abfall des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten wurde die Funktion des NCX bestimmt.

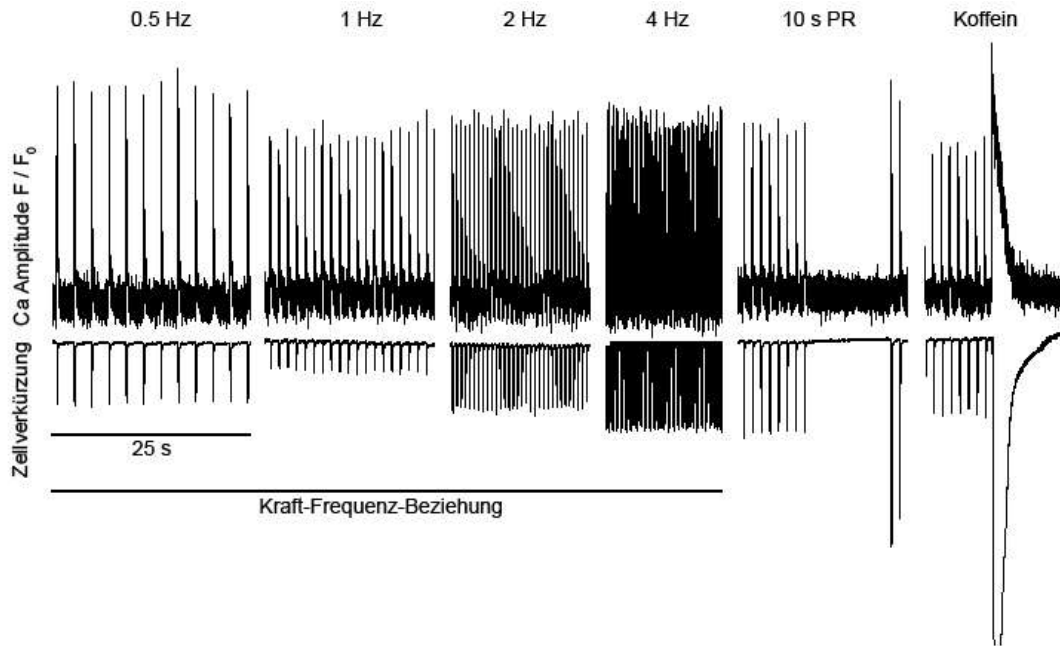


Abb. 3.3 Exemplarische Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Messprotokolls einer Zelle anhand der Registrierung der Ca^{2+} -Transienten und der fraktionellen Zellverkürzung. PR: *post-rest potentiation* (Post-Pausen-Potenzierung)

3.2.1 Funktionelle Messungen in Gruppe A

3.2.1.1 Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung

Bei der Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung unter basalen Bedingungen zeigen sich in der Grundstimulation mit 1 Hz sowie bei allen anderen untersuchten Frequenzen (0,5 Hz, 2 Hz, 4 Hz) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kontraktilität und der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten bei ATIP1-KO im Vergleich zu WT. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abb. 3.4 veranschaulicht. Als statistische Tests dienten der Student's t-Test für den Vergleich der Einzelfrequenzen und der two-way ANOVA für den longitudinalen Vergleich. Dies gilt für alle nachfolgenden Abbildungen.

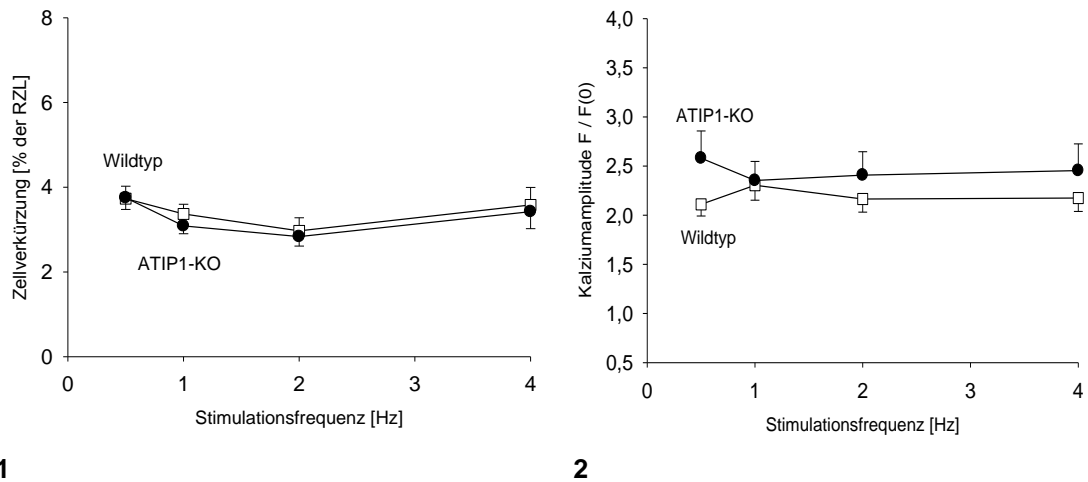


Abb. 3.4 (1) Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung, ausgehend von der Ruhezelllänge (RZL) in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(2)** Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. 39 Zellen aus 6 WT- und 32 Zellen aus 6 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.1.2 Untersuchung der Relaxationszeit

Wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, kann im Mausmodell die Relaxationszeit der Herzmuskelzelle als Maß für die SERCA2a-Funktion dienen. In der vorliegenden Arbeit ist für alle Gruppen die Relaxationszeit bestimmt worden, die die Zeitdauer für die 50%ige Relaxation der Myozyten nach der Kontraktion beschreibt ($RZ_{50\%}$). Man kann analog zur Bestimmung der $RZ_{50\%}$ auch die 50%ige Relaxationszeit der Ca^{2+} -Transienten F/F_0 ($RZ_{Ca50\%}$) messen. Die $RZ_{Ca50\%}$ steht hierbei für die 50%ige Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol nach der Kontraktion.

In Gruppe A (Abb. 3.5) konnten zwischen WT- und ATIP1-KO-Zellen bei der Längenzunahme sowie bei der 50%igen Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol nach Kontraktion keine Unterschiede festgestellt werden.

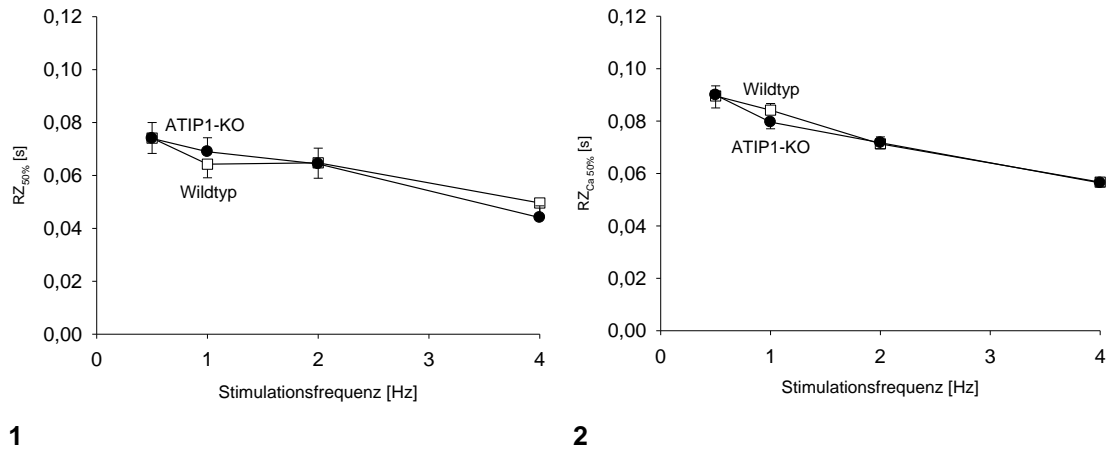


Abb. 3.5 (1) Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($RZ_{50\%}$). **(2)** Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion $RZ_{Ca^{50\%}}$ aus dem Zytosol. 39 Zellen aus 6 WT- und 32 Zellen aus 6 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.1.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Messung der Post-Pausen-Potenzierung

Die Messung der Post-Pausen-Potenzierung ist ein geeigneter Indikator für die Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes. Eine verhältnismäßig größere Post-Pausen-Potenzierung entspricht dabei einem größeren SR Ca^{2+} -Gehalt.

Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, nimmt die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude nach der Pause in beiden Zellgruppen ähnlich zu, was man an der etwa gleichen Steigung der Geraden von vor bis nach der Pause erkennen kann. Dies ist ein Hinweis auf einen verhältnismäßig ähnlichen SR- Ca^{2+} -Gehalt.

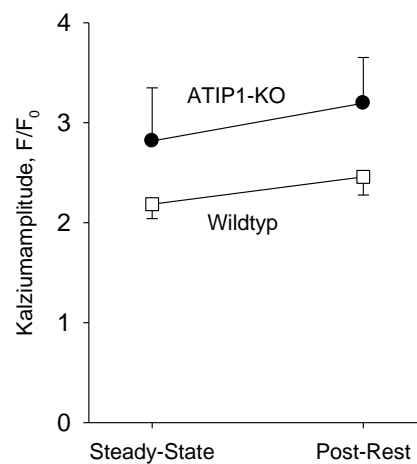


Abb. 3.6 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 . **(1)** Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 vor der Pause (*steady-state*) und nach der Pause (*post-rest*)

Die Bestimmung des SR Ca²⁺-Gehaltes mithilfe lokaler Koffein-Applikation

Eine weitere Methode zur quantitativen Bestimmung des SR Ca²⁺-Gehaltes ist die lokale Koffein-Applikation auf die Zelle.

Das Ergebnis der SR Ca²⁺-Gehalt-Messungen in Gruppe A mittels lokaler Koffein-Applikation ist in Abb. 3.7 dargestellt. Die mittlere Ca²⁺-Amplitude beträgt bei ATIP1-KO $3,2 \pm 0,4$ (n=12), während sie bei WT mit $3,3 \pm 0,4$ (n=18) gemessen wird. Durch diese Messung wird die vorangegangene *post-rest*-Messung bestätigt. Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen, dass der SR Ca²⁺-Gehalt in Gruppe A zwischen ATIP1-KO- und WT-Mäusen in etwa gleich ist.

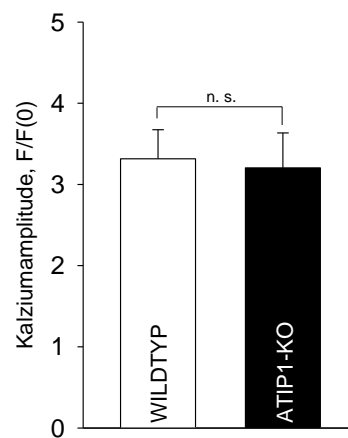


Abb. 3.7 Koffeininduzierte Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀. Mittelwerte aus 18 Zellen von 6 WT- und 12 Zellen von 6 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.1.4 Untersuchung der NCX-Funktion

Wie bereits im Kapitel 2.7.5 beschrieben, kann die NCX-Funktion aus dem Intensitätsverlust des Ca²⁺-Fluoreszenzsignals nach der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude berechnet werden.

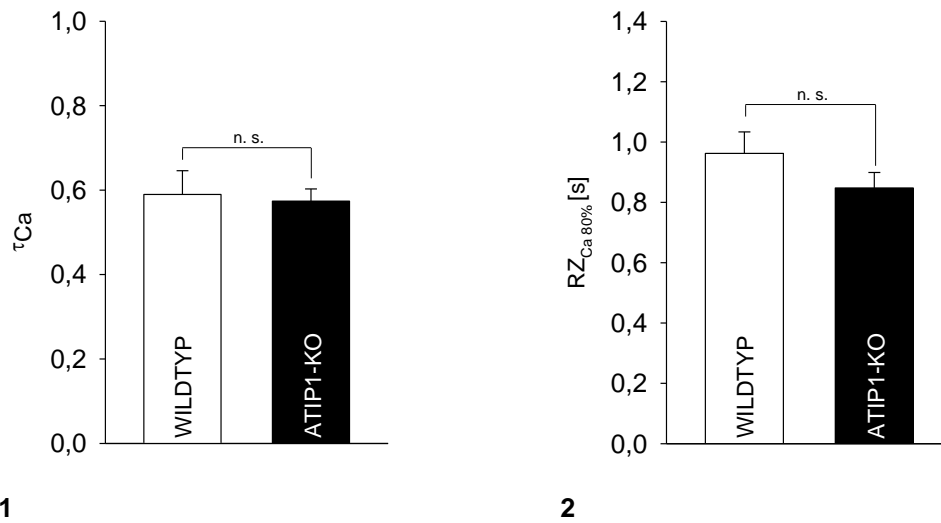
Die Bestimmung der NCX-Funktion mittels der Abfallskonstanten τ_{Ca}

Wie in Abb. 3.8 (1) dargestellt, ist τ_{Ca} bei ATIP1-KO mit $0,57 \pm 0,03$ (n=10) ähnlich hoch wie bei WT mit $0,59 \pm 0,06$ (n=12). Damit fällt die koffeininduzierte Ca²⁺-Amplitude bei beiden Gruppen ähnlich ab, was für eine vergleichbar hohe NCX-Aktivität spricht.

Die Bestimmung der NCX-Funktion mithilfe der Relaxationszeit ($RZ_{Ca80\%}$)

Abb. 3.8 (2) zeigt, dass die $RZ_{Ca80\%}$ bei ATIP1-KO mit $0,85 \pm 0,05$ s (n=10) ähnlich lang wie bei WT ist, bei der sie $0,96 \pm 0,07$ s (n=11) beträgt. Damit wird das Ergebnis aus der Messung der Abfallskonstanten τ_{Ca} bestätigt. Zusammenfassend ergeben

sich aus diesen Untersuchungen keine Unterschiede bezüglich der NCX-Aktivität zwischen WT- und ATIP1-KO-Mäusen.



1

2

Abb. 3.8 (1) Der Exponent τ_{Ca} als Maß für die NCX-Aktivität. Ein hoher τ_{Ca} entspricht dabei einer niedrigen NCX-Aktivität. Mittelwerte aus 12 Zellen von 6 WT- und 10 Zellen von 6 ATIP1-KO-Mäusen. **(2)** Die Relaxationszeit 80% ($RZ_{Ca\ 80\%}$) des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten als Maß für die NCX-Aktivität. Eine lange Relaxationszeit entspricht einer niedrigen NCX-Aktivität. Mittelwerte aus 11 Zellen von 6 WT- und 10 Zellen von 6 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.1.5 Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

Die Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung (*fractional SR Ca^{2+} -release*) zeigt, dass bei ATIP1-KO der Anteil des freigesetzten Kalziums bei Grundstimulation gemessen am SR Ca^{2+} -Gehalt in etwa so hoch ist wie bei WT. Bei WT beträgt die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung $74,7 \pm 3,3\%$ ($n=18$), während sie bei ATIP1-KO $69,8 \pm 4,2\%$ ($n=12$) beträgt.

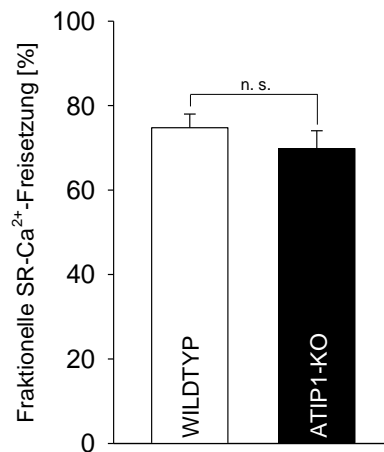


Abb. 3.9 Fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung bei Grundstimulation, gemessen als prozentualer Anteil am SR Ca²⁺-Gehalt. Mittelwerte aus 18 Zellen von 6 WT- und 12 Zellen von 6 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.1.6 Zusammenfassung

Bei den funktionellen Untersuchungen der jungen Mäuse aus Gruppe A lassen sich keine Rückschlüsse auf funktionelle Unterschiede zwischen WT- und ATIP1-KO auf Einzelzellebene feststellen. Die beschriebenen Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

	WILDTYPE	ATIP1-KO
Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis	↔	↔
Kraft-Frequenz-Beziehung	↔	↔
Relaxationszeit	↔	↔
SR Ca ²⁺ -Gehalt	↔	↔
NCX-Funktion	↔	↔
Fraktionelle SR Ca ²⁺ -Freisetzung	↔	↔

Tab. 3.1 Unterschiede von WT- und ATIP1-KO-Mäusen aus Gruppe A in der Übersicht

3.2.2 Funktionelle Messungen in Gruppe B

In Gruppe B wurden die Einzelzellmessungen nicht nur unter basalen Bedingungen, sondern auch unter Einfluss von Angiotensin II sowie unter Einfluss des AT_2 -Rezeptor-Agonisten CGP42112A und des Noradrenalin-Derivats Isoprenalin untersucht.

3.2.2.1 Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung unter basalen Bedingungen

Die älteren ATIP1-KO-Mäuse in Gruppe B zeigen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine signifikant gesteigerte Zellverkürzung in allen gemessenen Frequenzen. Auch das Ergebnis des two-way ANOVAS ist signifikant ($p < 0,02$). Bei den Amplituden der Ca^{2+} -Transienten gab es analog zu Gruppe A keine Unterschiede (s. Abb. 3.10).

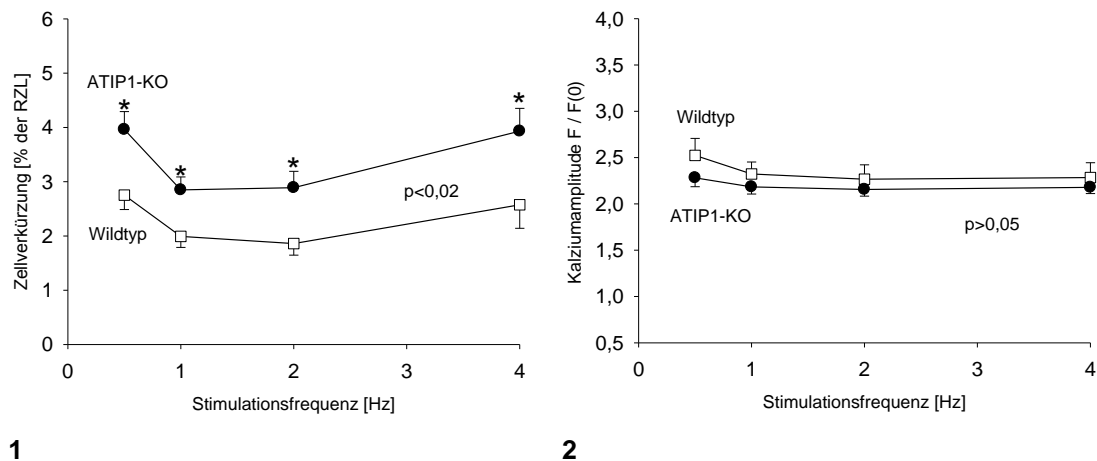


Abb. 3.10 (1) Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung, ausgehend von der Ruhezelllänge (RZL) in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(2)** Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. 30 Zellen aus 7 WT- und 36 Zellen aus 7 ATIP1-KO Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.2.2 Untersuchung der Relaxationszeit

In Gruppe B relaxieren die ATIP1-KO-Zellen signifikant schneller als die WT-Zellen. Bei der Messung des Abfalls der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude kann man erkennen, dass dieser bei ATIP1-KO im Vergleich zu WT ebenfalls beschleunigt ist. Das bedeutet, dass ATIP1-KO-Zellen bei allen Stimulationsfrequenzen weniger Zeit benötigen, um das Kalzium aus dem Zytosol auszuschleusen und damit zu relaxieren.

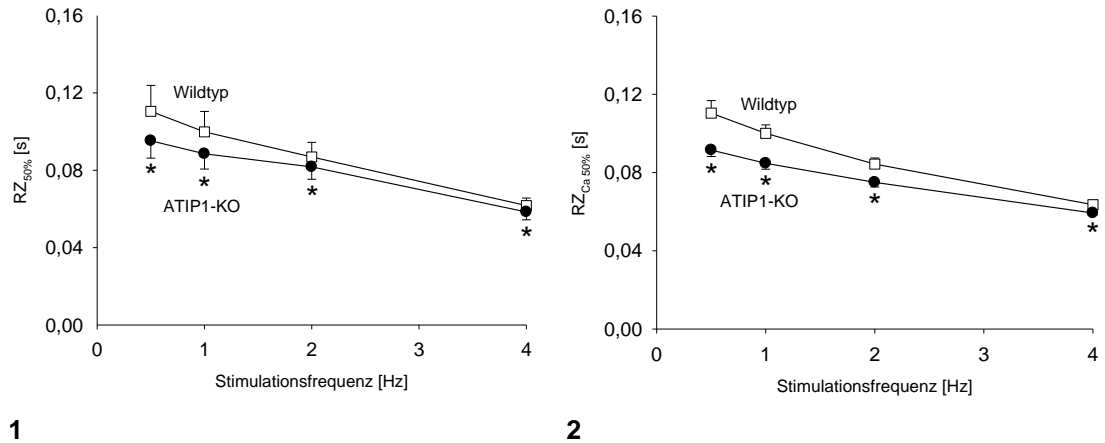


Abb. 3.11 (1) Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($RZ_{50\%}$). **(2)** Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion $RZ_{Ca^{2+}50\%}$ aus dem Zytosol. 31 Zellen aus 7 WT-Mäusen und 38 Zellen aus 7 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.2.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Messung der Post-Pausen-Potenzierung

In Gruppe B zeigen sich wie in Abb. 3.12 dargestellt, keine signifikanten Unterschiede bei den *post-rest*-Messungen der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude zwischen WT und ATIP1-KO. Dies wird in der nachfolgenden Koffein-Messung bestätigt.

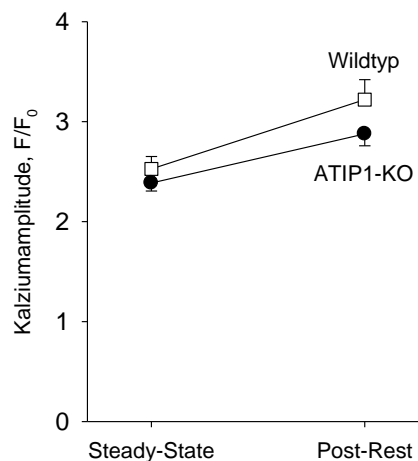


Abb. 3.12 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 . **(1)** Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 vor der Pause (*steady-state*) und nach der Pause (*post-rest*)

Die Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes mithilfe lokaler Koffein-Applikation

Das Ergebnis der SR Ca^{2+} -Gehalt-Messungen mittels lokaler Koffein-Applikation ist in Abb. 3.13 dargestellt. Die mittlere Ca^{2+} -Amplitude in Gruppe B beträgt bei ATIP1-KO $4,5 \pm 0,3$ ($n=33$), während sie bei WT mit $4,5 \pm 0,2$ ($n=27$) gemessen wird. Damit wird das Ergebnis aus den *post-rest*-Messungen bestätigt. Im SR Ca^{2+} -Gehalt zeigen ATIP1-KO- und WT-Mäuse auch in Gruppe B keine Unterschiede.

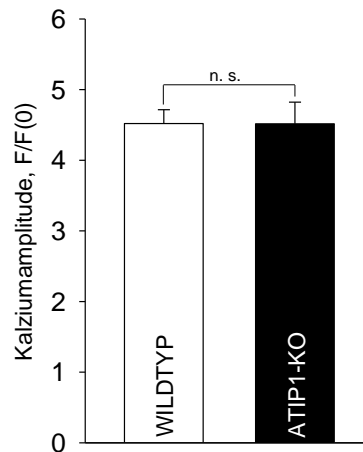


Abb. 3.13 Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 . Mittelwerte aus 27 Zellen von 7 WT- und 33 Zellen von 7 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.2.4 Untersuchung der NCX-Funktion

Die Bestimmung der NCX-Funktion mittels der Abfallskonstanten τ_{Ca}

Analog zu Gruppe A wurde auch in Gruppe B die NCX-Funktion anhand der Abfallskonstanten τ_{Ca} bestimmt. Hier sieht man, dass τ_{Ca} bei ATIP1-KO im Vergleich zu WT in etwa gleich ist (ATIP1-KO: $1,03 \pm 0,07$ ($n=29$) vs. Wildtyp: $1,04 \pm 0,09$ ($n=23$), $p > 0,05$). Somit fällt die koffeininduzierte Ca^{2+} -Amplitude bei ATIP1-KO genauso schnell wie bei WT, was ein Hinweis für eine ähnlich hohe NCX-Aktivität ist.

Die Bestimmung der NCX-Funktion mithilfe der Relaxationszeit ($\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$)

Analog zu den Messungen der Abfallskonstanten ist in Abb. 3.14 zu sehen, dass die $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ in Gruppe B bei ATIP1-KO mit $1,67 \pm 0,11$ s ($n=30$) im Vergleich zu WT, bei der sie $1,58 \pm 0,12$ s ($n=24$) beträgt, in etwa gleich ist. Damit wird das Ergebnis aus der Messung der Abfallskonstanten τ_{Ca} bestätigt. Der NCX weist somit bei ATIP1-KO eine in etwa gleich hohe Aktivität wie bei WT auf.

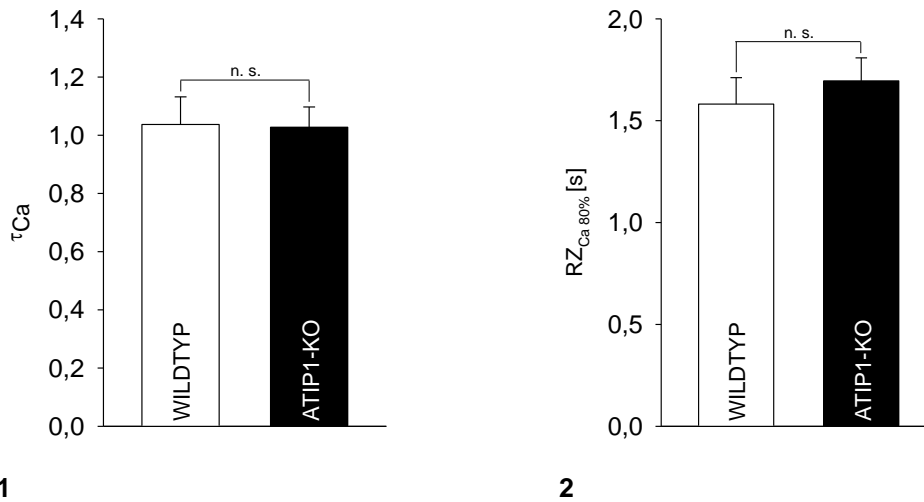


Abb. 3.14 (1) Der Exponent τ_{Ca} als Maß für die NCX-Aktivität. Ein hoher τ_{Ca} entspricht dabei einer niedrigen NCX-Aktivität. **(2)** Die Relaxationszeit 80% ($RZ_{Ca80\%}$) des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transients als Maß für die NCX-Aktivität. Eine lange Relaxationszeit entspricht einer niedrigen NCX-Aktivität. Mittelwerte aus 24 Zellen von 7 WT- und 30 Zellen von 7 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.2.5 Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

Die Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung in Gruppe B (*fractional SR Ca^{2+} -release*) zeigt, dass bei ATIP1-KO der Anteil des freigesetzten Kalziums bei Grundstimulation, gemessen am SR Ca^{2+} -Gehalt, so hoch wie bei WT ist (ATIP1-KO vs. WT: $64,6 \pm 2\%$ ($n=33$) vs. $62,8 \pm 2,5\%$ ($n=27$)).

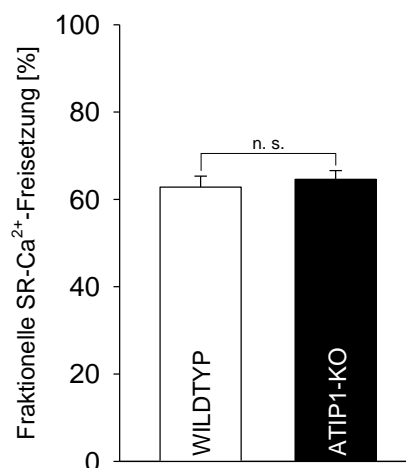


Abb. 3.15 Fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung bei Grundstimulation, gemessen als prozentualer Anteil am SR Ca^{2+} -Gehalt. Mittelwerte aus 27 Zellen von 7 WT- und 33 Zellen von 7 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.2.6 Zusammenfassung

Bei den funktionellen Untersuchungen in Gruppe B zeigen sich unter basalen Bedingungen signifikante Unterschiede zwischen ATIP1-KO und WT hinsichtlich Zellverkürzung und Relaxationszeit. So zeigen Zellen von ATIP1-KO eine erhöhte Kontraktilität und eine schnellere Relaxation. Es konnten jedoch keine Unterschiede im SR Ca^{2+} -Gehalt, in der NCX-Funktion oder in der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in Tabelle 3.2 veranschaulicht.

	WILDTYP	ATIP1-KO
Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis	↔	↔
Kraft-Frequenz-Beziehung	↔	↑
Relaxationszeit	↔	↓
SR Ca^{2+} -Gehalt	↔	↔
NCX-Funktion	↔	↔
Fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung	↔	↔

Tab. 3.2 Unterschiede von WT- und ATIP1-KO-Mäusen unter basalen Bedingungen aus Gruppe B in der Übersicht

3.2.3 Funktionelle Messungen mit Angiotensin II (Ang II)

In Gruppe B wurden WT- und ATIP1-KO-Zellen nicht nur unter basalen Bedingungen miteinander verglichen, sondern auch unter Einfluss von Ang II. Die Ergebnisse sind im weiteren Verlauf beschrieben.

3.2.3.1 Der Einfluss von Ang II auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Ang II bewirkt eine signifikante Erhöhung der Kontraktionsamplitude bei WT schon bei Grundstimulation (1 Hz: $1,9 \pm 0,2$ vs. $3,5 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$), wohingegen es bei ATIP1-KO zu einer signifikanten Erniedrigung der Kontraktionsamplitude kommt (1 Hz: $3,1 \pm 0,5$ vs. $1,8 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$). Dies ist bereits optisch in den Originalregistrierungen festzustellen (s. Abb 3.16). Dieser unterschiedliche Effekt setzt sich bei allen untersuchten Frequenzen fort, wie Abb. 3.17 zeigt.

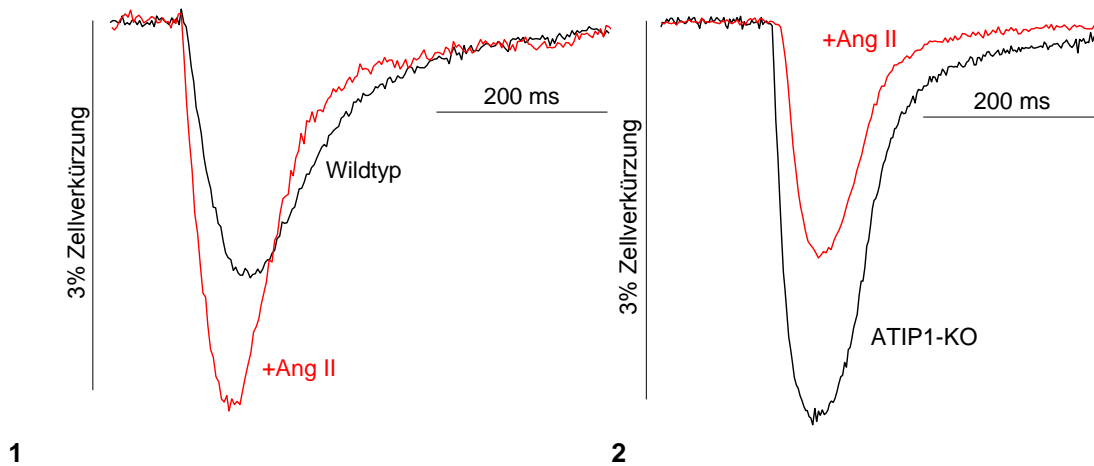


Abb. 3.16 Beispielhafte Originalregistrierungen der Zellverkürzung (in % der RZL) bei der Grundstimulation (1 Hz). **(1)** WT-Zelle im Vergleich zu WT-Zelle unter Einfluss von Ang II. **(2)** ATIP1-KO-Zelle im Vergleich zu ATIP1-KO-Zelle unter Einfluss von Ang II; RZL = Ruhezelllänge

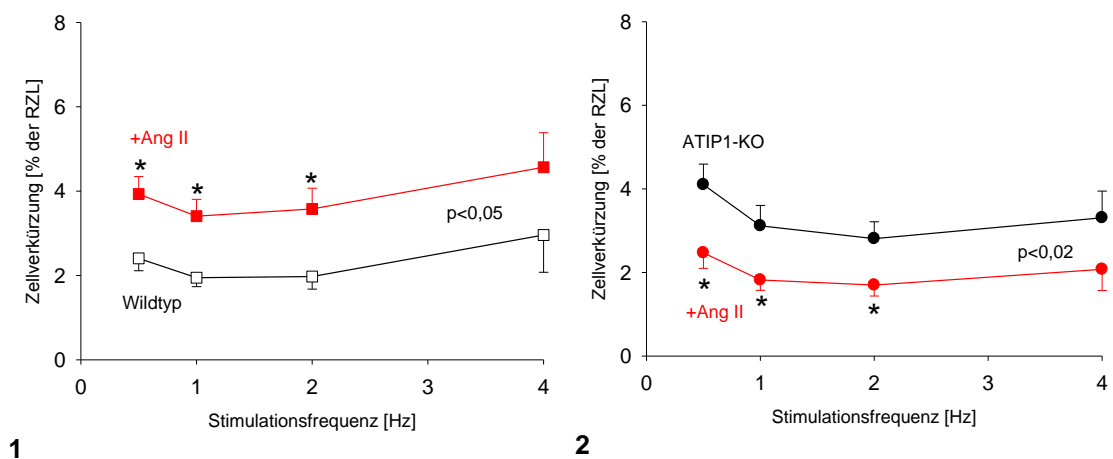


Abb. 3.17 Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 11 WT-Zellen und 14 WT-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 WT-Mäusen. **(2)** 15 ATIP1-KO-Zellen und 15 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

Im Gegensatz dazu bleiben die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten sowohl bei WT als auch bei ATIP1-KO unter Einfluss von Ang II unverändert. Der frequenzabhängige Vergleich der Ca^{2+} -Transienten ist in Abb. 3.18 dargestellt.

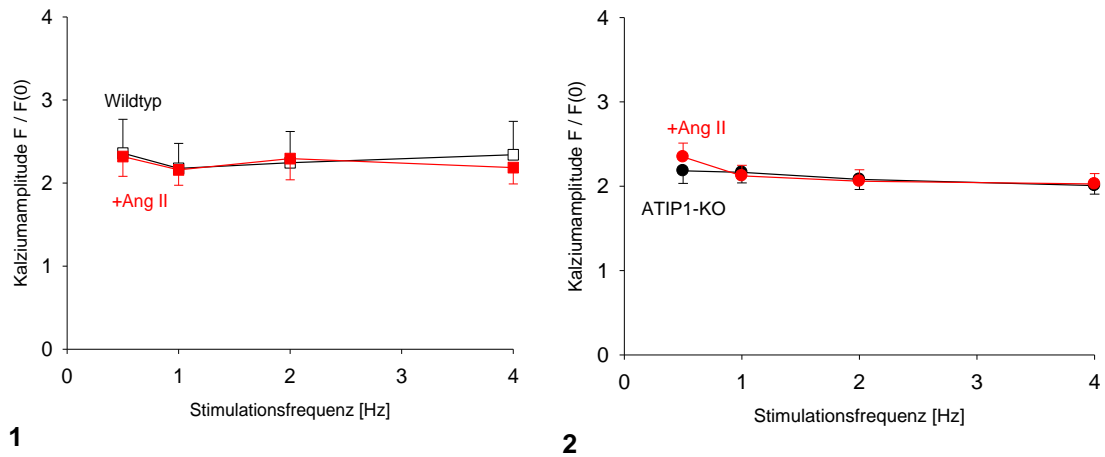


Abb. 3.18 Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 11 WT-Zellen und 11 WT-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 WT-Mäusen. **(2)** 15 ATIP1-KO-Zellen und 15 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 ATIP1-KO Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.3.2 Der Einfluss von Ang II auf die Relaxationszeit

Unter Einfluss von Ang II kommt es zu einer signifikant beschleunigten Relaxation der WT-Zellen bei 0,5 Hz und 4 Hz im Vergleich zur Kontrolle. Im longitudinalen Vergleich ist die Relaxation unter Einfluss von Ang II ebenfalls signifikant beschleunigt ($p < 0,02$). Bei ATIP1-KO kommt es unter Einfluss von Ang II zu keiner Änderung der Relaxationszeit (s. Abb. 3.19).

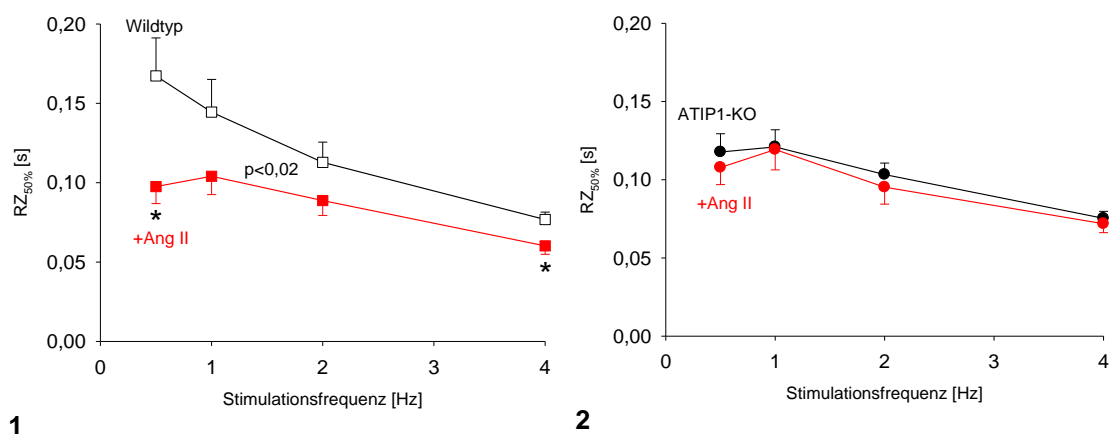


Abb. 3.19 Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($RZ_{50\%}$) unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Ang II. **(1)** 14 WT-Zellen und 11 WT-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 WT-Mäusen. **(2)** 15 ATIP1-KO-Zellen und 15 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

Bei der 50%igen Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol zeigen die Zellen der WT-Mäuse ebenfalls eine tendenzielle Beschleunigung der Ca^{2+} -Extrusion, bei 0,5 Hz sogar signifikant. Ang II hat bei ATIP1-KO dagegen keinen Einfluss auf die 50%ige Ca^{2+} -Extrusion. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abb. 3.20 veranschaulicht.

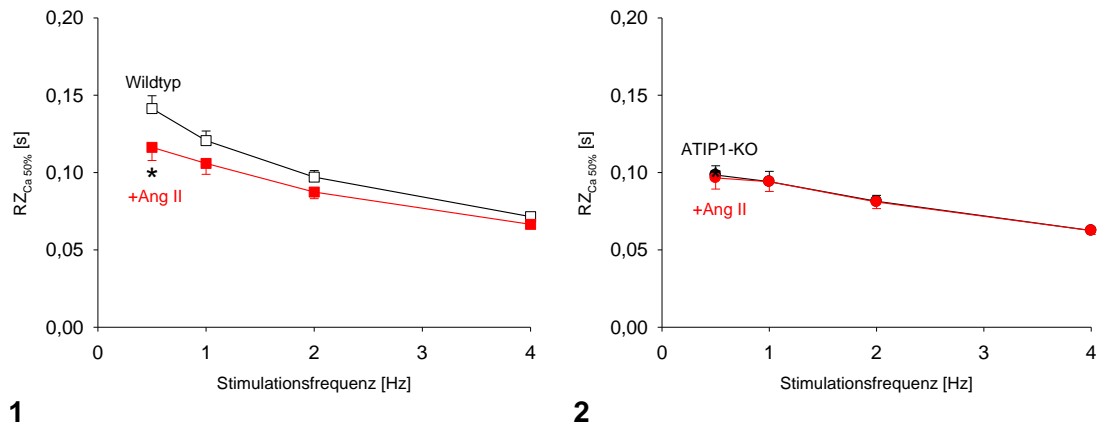


Abb. 3.20 Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion $RZ_{\text{Ca}50\%}$ aus dem Zytosol. **(1)** 11 WT-Zellen und 14 WT-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 WT-Mäusen. **(2)** 15 ATIP1-KO-Zellen und 15 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.3.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Messung der Post-Pausen-Potenzierung

Die Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude zeigt, dass es unter Einfluss von Ang II zu keiner Veränderung vor oder nach der Pause bei WT oder ATIP1-KO kommt. Dies erkennt man auch an der Steigung der Geraden, die bei allen untersuchten Gruppen in etwa gleich ist (s. Abb. 3.21). In der weiter unten gezeigten Koffein-Messung wird dieses Ergebnis bestätigt (s. Abb. 3.22).

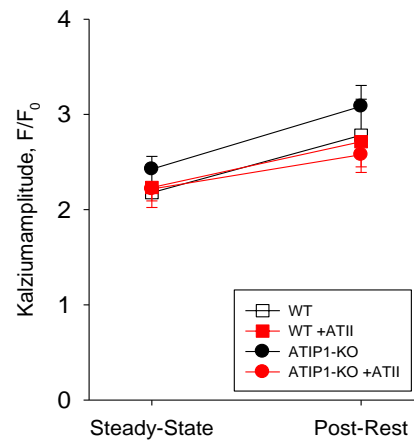


Abb. 3.21 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; **(1)** Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 vor der Pause (*steady-state*) und nach der Pause (*post-rest*). 9 WT-Zellen und 11 Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 WT-Mäusen. 8 ATIP1-KO-Zellen und 10 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II, jeweils aus 2 ATIP1-KO-Mäusen

Die Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes mithilfe lokaler Koffein-Applikation

Das Ergebnis der SR Ca^{2+} -Gehalt-Messungen mittels lokaler Koffein-Applikation unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Ang II ist in Abb. 3.22 dargestellt. Die mittlere Ca^{2+} -Amplitude beträgt bei ATIP1-KO $4,5 \pm 0,3$ ($n=13$) und unter Einfluss von Ang II $4,8 \pm 0,3$ ($n=14$). Bei WT wird sie unter basalen Bedingungen mit $4,3 \pm 0,3$ ($n=9$) gemessen und unter Einfluss von Ang II mit $4,0 \pm 0,3$ ($n=12$). Hier wird das Ergebnis der *post-rest*-Messungen bestätigt.

Ang II beeinflusst den SR Ca^{2+} -Gehalt der gemessenen Zellen somit nicht. Dies gilt sowohl für ATIP1-KO als auch für WT.

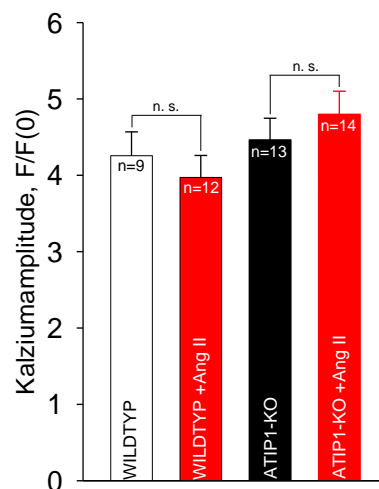


Abb. 3.22 Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 . Mittelwerte aus Zellen von 2 WT- und 2 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.3.4 Bestimmung der NCX-Funktion

Die Bestimmung der NCX-Funktion mittels der Abfallskonstanten τ_{Ca}

Bei ATIP1-KO und WT gleichermaßen, erkennt man bei der Messung der Abfallskonstanten τ_{Ca} , dass die NCX-Aktivität unter Einfluss von Ang II tendenziell höher ist, jedoch nicht signifikant.

Die Bestimmung der NCX-Funktion mithilfe der Relaxationszeit ($RZ_{Ca80\%}$)

Analog zu den Messungen der Abfallskonstanten τ_{Ca} , steigert Ang II tendenziell die Aktivität des NCX sowohl bei ATIP1-KO als auch bei WT. Dies kann man an der Beschleunigung der $RZ_{Ca80\%}$ erkennen, jedoch ebenfalls nicht signifikant (s. Abb. 3.23).

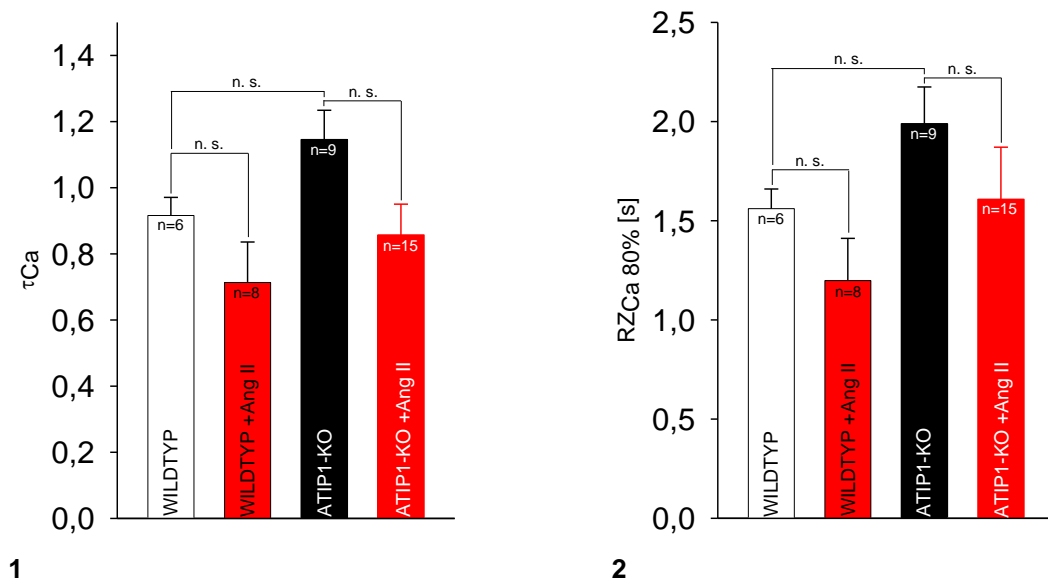


Abb. 3.23 (1) Der Exponent τ_{Ca} als Maß für die NCX-Aktivität. Ein hoher τ_{Ca} entspricht dabei einer niedrigen NCX-Aktivität. **(2)** Die Relaxationszeit 80% ($RZ_{Ca80\%}$) des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transients als Maß für die NCX-Aktivität. Eine lange Relaxationszeit entspricht einer niedrigen NCX-Aktivität

3.2.3.5 Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

Ang II erhöht signifikant die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung bei WT von $59,8 \pm 4,7\%$ (n=8) auf $66,6 \pm 3,1\%$ (n=12). Bei ATIP1-KO hingegen hat der Einfluss von Ang II eine signifikante Erniedrigung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung von $64,2 \pm 3\%$ (n=13) auf $54,6 \pm 2,4\%$ (n=14) zur Folge. Die beschriebenen Ergebnisse sind in untenstehender Abb. 3.24 veranschaulicht.

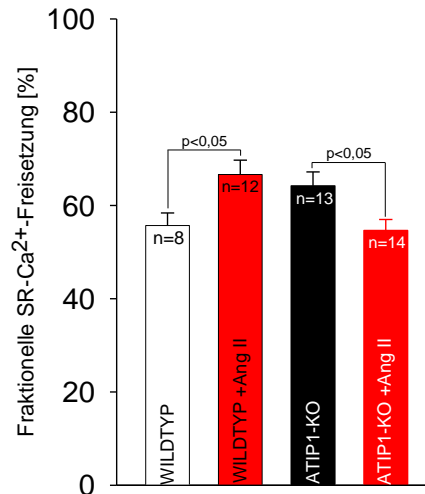


Abb. 3.24 Die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung bei der Grundstimulation, gemessen als prozentualer Anteil am SR Ca²⁺-Gehalt. Mittelwerte von Zellen aus 2 WT- und 2 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit Ang II

Bei WT zeigt sich unter Einfluss von Ang II eine signifikante Zunahme der Kontraktionsamplitude bei allen gemessenen Frequenzen. Auch die Relaxationszeit ist unter Einfluss von Ang II bei WT verkürzt. Bei ATIP1-KO zeigen die Messungen ein gegenteiliges Bild. Hier kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsamplitude unter Einfluss von Ang II. Die Relaxationszeit bleibt unverändert. Ang II erhöht die NCX-Aktivität in beiden Gruppen, steigert die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung bei WT und vermindert dieselbe bei ATIP1-KO. Der SR Ca²⁺-Gehalt bleibt in beiden Gruppen unverändert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 veranschaulicht.

	WT	WT+Ang II	A1-KO	A1-KO+Ang II
Kraft-Frequenz-Beziehung	↔	↑	↔	↓
Relaxationszeit	↔	↓	↔	↔
SR Ca ²⁺ -Gehalt	↔	↔	↔	↔
NCX-Funktion	↔	↔	↔	↔
Fraktionelle SR Ca ²⁺ -Freisetzung	↔	↑	↔	↓

Tab. 3.3 Einfluss von Ang II auf WT einerseits und auf ATIP1-KO (A1-KO) andererseits in der Übersicht

3.2.4 Funktionelle Messungen mit dem AT₂-Rezeptor-Agonisten CGP42112A (CGP)

In Gruppe B wurden WT- und ATIP1-KO-Zellen außerdem unter Einfluss des AT₂-Rezeptor-Agonisten CGP42112A untersucht.

3.2.4.1 Der Einfluss von CGP42112A auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurde mit den Mäusen aus Gruppe B in einer weiteren Serie von Experimenten der Einfluss des AT₂-Rezeptor-Agonisten CGP42112A auf die Kraft-Frequenz-Beziehung der ATIP1-KO- und WT-Zellen untersucht. Durch die Stimulation mit CGP42112A kommt es im Vergleich zu den basalen Werten zu einer signifikanten Steigerung der Zellverkürzung bei WT während der Grundstimulation (1 Hz: $2,0 \pm 0,3$ vs. $3,0 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$), wohingegen CGP42112A bei Zellen der ATIP1-KO-Mäuse eine leicht reduzierte Zellverkürzung bewirkt (1 Hz: $2,7 \pm 0,3$ vs. $2,3 \pm 0,3\%$, n.s.). Dies ist bereits optisch in den Originalregistrierungen festzustellen (s. Abb. 3.25).

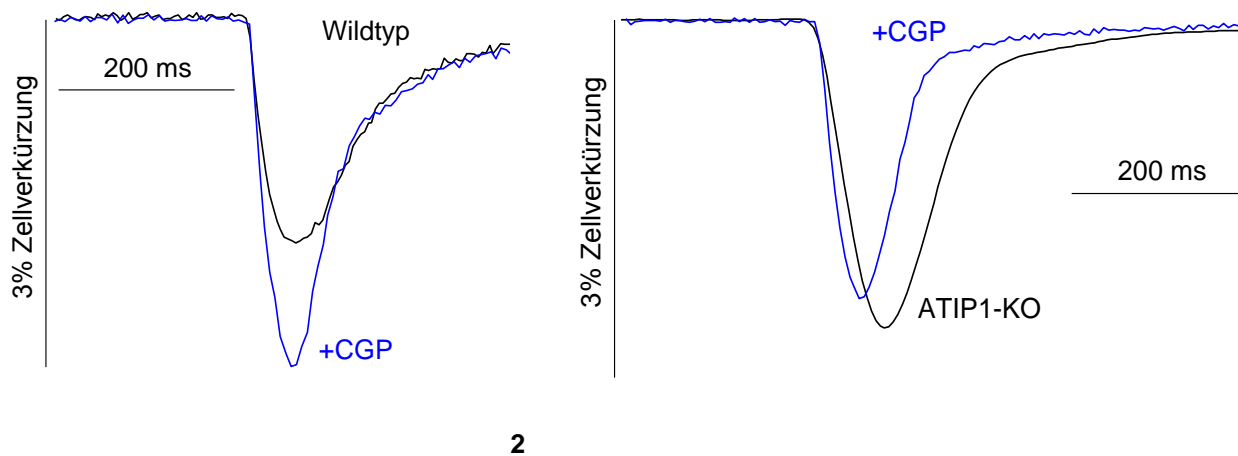


Abb. 3.25 Beispielhafte Originalregistrierungen der Zellverkürzung (in % der RZL) bei der Grundstimulation (1Hz). **(1)** WT-Zelle im Vergleich zu einer WT-Zelle unter Einfluss von CGP42112A. **(2)** ATIP1-KO-Zelle im Vergleich zu einer ATIP1-KO-Zelle unter Einfluss von CGP42112A; RZL = Ruhezelllänge

Dieser Unterschied setzt sich bei allen anderen untersuchten Frequenzen fort, wie in Abb. 3.26 dargestellt ist. Der longitudinale Vergleich zeigt, dass CGP42112A die Kontraktilität von WT durchgehend signifikant steigert ($p < 0,02$). Die Kontraktilität von ATIP1-KO sinkt tendenziell unter Einfluss von CGP42112A, aber nicht signifikant.

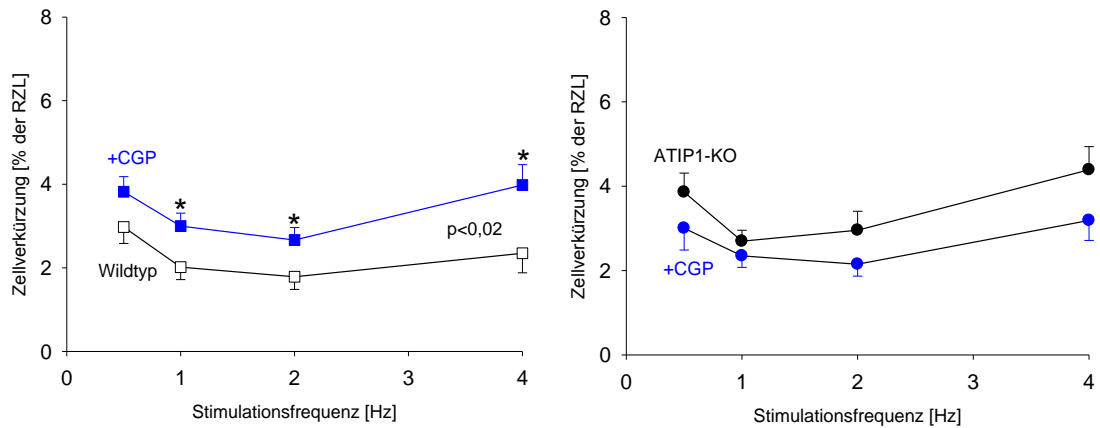


Abb. 3.26 Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 19 WT-Zellen und 25 WT-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 25 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

Bei den Amplituden der Ca^{2+} -Transienten kommt es unter Stimulation mit CGP42112A in keiner der beiden Gruppen zu signifikanten Veränderungen. Der frequenzabhängige Vergleich der Ca^{2+} -Transienten ist in Abb. 3.27 dargestellt.

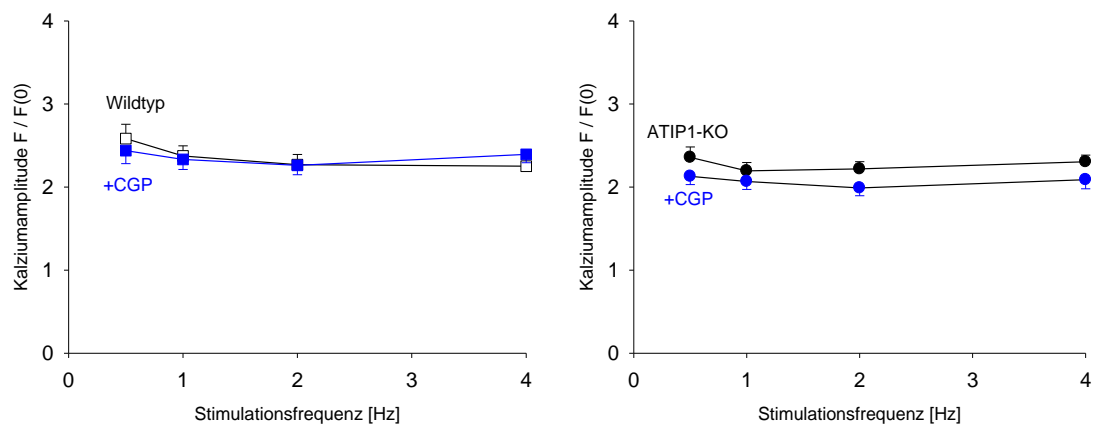
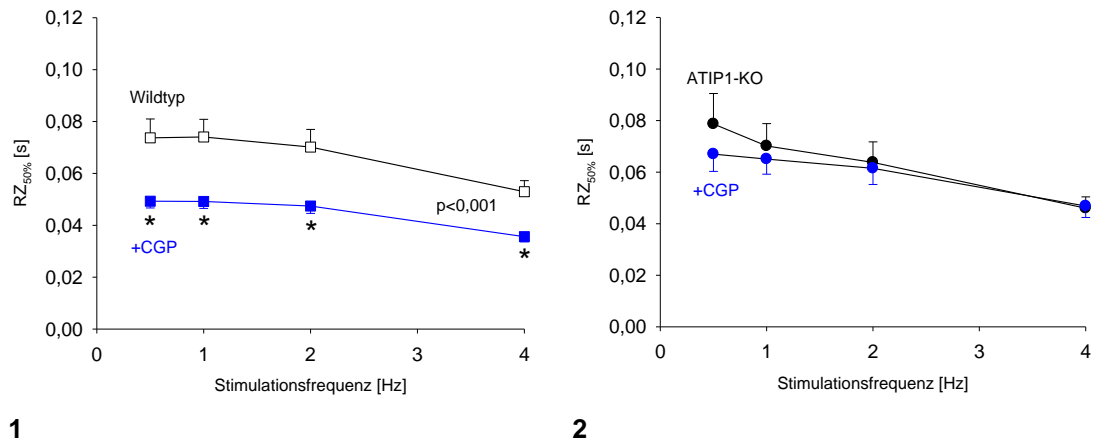


Abb. 3.27 Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 19 WT-Zellen und 25 WT-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 25 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.4.2 Der Einfluss von CGP42112A auf die Relaxationszeit

Unter Einfluss von CGP42112A kommt es zu einer signifikant beschleunigten Relaxation der WT-Zellen bei allen gemessenen Frequenzen ($p < 0,001$).

Im Gegensatz dazu kommt es in der ATIP1-KO-Gruppe unter Einfluss von CGP42112A in keiner der gemessenen Frequenzen zu einer Änderung der Relaxationszeit. In nachfolgender Abb. 3.28 sind die beschriebenen Ergebnisse veranschaulicht.



1

2

Abb. 3.28 Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung ($RZ_{50\%}$) unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von CGP42112A. **(1)** 19 WT-Zellen und 25 WT-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 25 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

Analog dazu verhält es sich bei der 50%igen Ca^{2+} -Extrusion ($RZ_{Ca50\%}$) aus dem Zytosol nach Kontraktion. Diese ist bei WT unter Einfluss von CGP42112A sowohl in den Frequenzen 0,5, 1 und 2 Hz als auch im longitudinalen Vergleich signifikant beschleunigt ($p < 0,02$). Bei ATIP1-KO zeigen die Experimente keine Unterschiede (s. Abb. 3.29).

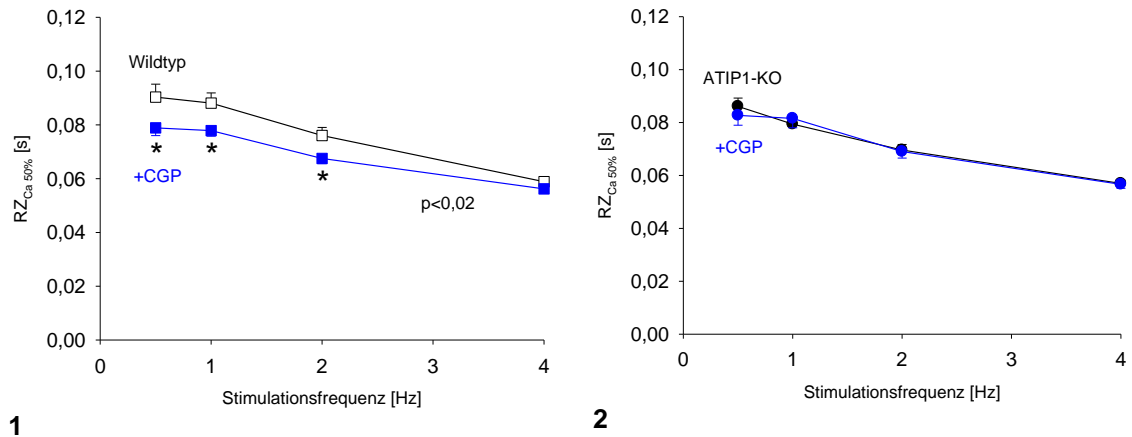


Abb. 3.29 Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion $RZ_{\text{Ca}50\%}$ aus dem Zytosol. **(1)** 19 WT-Zellen und 25 WT-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 25 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.4.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Messung der Post-Pausen-Potenzierung

Die Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude zeigt, dass der Einfluss von CGP42112A zu keiner Veränderung vor oder nach der Pause bei WT oder ATIP1-KO führt (s. Abb. 3.30).

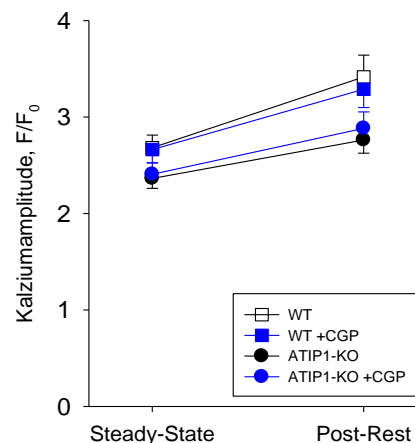


Abb. 3.30 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 ; Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 vor der Pause (*steady-state*) und nach der Pause (*post-rest*). 18 WT-Zellen und 19 WT-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 WT-Mäusen. 18 ATIP1-KO-Zellen und 21 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von CGP42112A, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen

Die Bestimmung des SR Ca²⁺-Gehaltes mithilfe lokaler Koffein-Applikation

Das Ergebnis der SR Ca²⁺-Gehalt-Messungen mittels lokaler Koffein-Applikation unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von CGP42112A bestätigt das Ergebnis aus den *post-rest*-Messungen. Zusammenfassend kann man sagen, dass der AT₂-Rezeptor-Agonist CGP42112A keinen Einfluss auf den SR Ca²⁺-Gehalt bei ATIP1-KO oder WT hat.

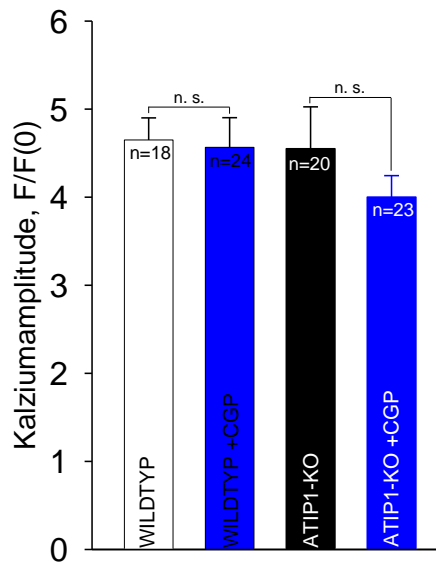


Abb. 3.31 Koffeininduzierte Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀. Mittelwerte aus Zellen von 2 WT-Mäusen und 2 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.4.4 Bestimmung der NCX-Funktion

Die Bestimmung der NCX-Funktion mittels der Abfallskonstanten τ_{Ca}

Bei der Messung der Abfallskonstanten τ_{Ca} wird deutlich, dass CGP42112A weder bei WT noch bei ATIP1-KO die NCX-Aktivität entscheidend beeinflusst.

Die Bestimmung der NCX-Funktion mithilfe der Relaxationszeit (RZ_{Ca80%})

Analog zu den Messungen der Abfallskonstanten ist zu sehen, dass die RZ_{Ca80%} bei ATIP1-KO mit 1,39±0,08 s ähnlich lang ist wie unter Einfluss von CGP42112A, bei der sie 1,18±0,08 s beträgt. Bei WT beträgt sie 1,59±0,16 s und unter Einfluss von CGP42112A 1,69±0,12 s. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der NCX-Funktion zeigen, dass CGP42112A die Aktivität des NCX nicht beeinflusst (s. Abb 3.32).

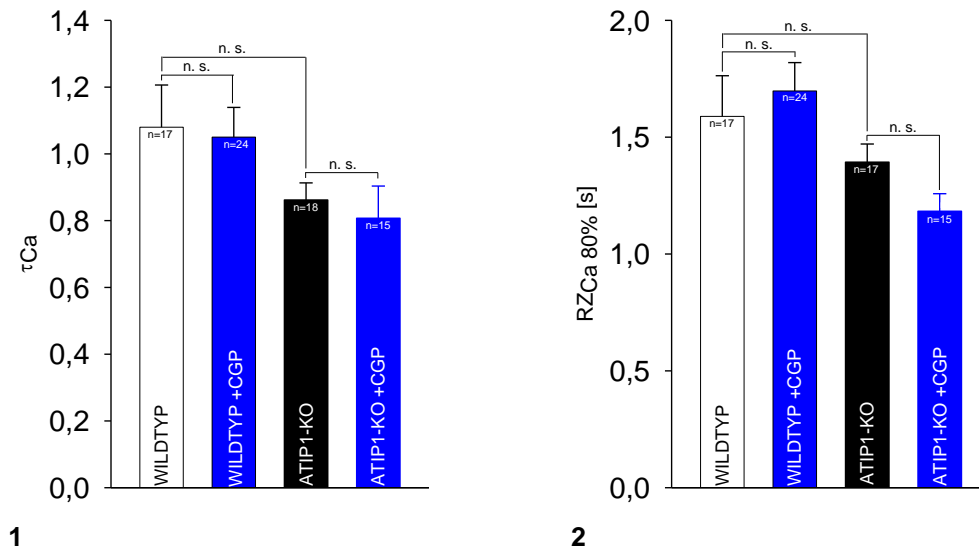


Abb. 3.32 (1) Der Exponent τ_{Ca} als Maß für die NCX-Aktivität. Ein hoher τ_{Ca} entspricht dabei einer niedrigen NCX-Aktivität. **(2)** Die Relaxationszeit 80% (RZ_{Ca80%}) des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten als Maß für die NCX-Aktivität. Eine lange Relaxationszeit entspricht einer niedrigen NCX-Aktivität. Mittelwerte aus Zellen von 5 WT- und 5 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.4.5 Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

CGP42112A erhöht die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung bei WT von $64,4 \pm 2,9\%$ (n=18) nicht signifikant auf $69,6 \pm 2,6\%$ (n=24). Bei ATIP1-KO verhält es sich ähnlich. Hier erhöht CGP42112A die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung kaum merklich von $64,8 \pm 2,8\%$ (n=20) auf $66,8 \pm 2,9\%$ (n=23). Die beschriebenen Ergebnisse sind in nachfolgender Abb. 3.33 veranschaulicht.

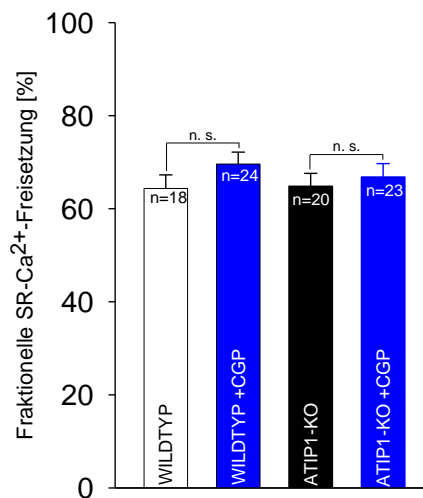


Abb. 3.33 Die fraktionelle SR Ca^{2+} -Freisetzung bei der Grundstimulation, gemessen als prozentualer Anteil am SR Ca^{2+} -Gehalt. Mittelwerte aus Zellen von 5 WT- und 5 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit CGP42112A

Der AT₂-Rezeptor-Agonist zeigt keine Wirkung auf die Zellen der ATIP1-KO-Mäuse. Bei den Zellen der WT-Mäuse dagegen zeigt sich unter Einfluss von CGP42112A eine signifikante Zunahme der Kontraktionsamplitude bei allen gemessenen Frequenzen. Auch die Relaxationszeit ist signifikant beschleunigt. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in Tabelle 3.4 veranschaulicht.

	WT	WT+CGP	A1-KO	A1-KO+CGP
Kraft-Frequenz-Beziehung	↔	↑	↔	↔
Relaxationszeit	↔	↓	↔	↔
SR Ca ²⁺ -Gehalt	↔	↔	↔	↔
NCX-Funktion	↔	↔	↔	↔
Fraktionelle SR Ca ²⁺ -Freisetzung	↔	↔	↔	↔

Tab. 3.4 Einfluss von CGP42112A auf WT einerseits und auf ATIP1-KO (A1-KO) andererseits in der Übersicht

3.2.5 Funktionelle Messungen mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin (ISO)

WT- und ATIP1-KO-Zellen wurden in Gruppe B weiterhin mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin getestet. Die Ergebnisse sind im weiteren Verlauf beschrieben.

3.2.5.1 Der Einfluss von Isoprenalin auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

In einer weiteren Messreihe wurde der Einfluss von Isoprenalin auf die Kraft-Frequenz-Beziehung untersucht. Verglichen mit den basalen Werten kommt es sowohl bei WT zu einer signifikanten Steigerung der Zellverkürzung bei Grundstimulation (1 Hz: 2,0±0,3 vs. 6,1±0,7%, p<0,05) als auch bei ATIP1-KO (1 Hz: 2,7±0,3 vs. 7,2±0,6%, p<0,05). In Abb. 3.34 sind Originalaufzeichnungen der Zellverkürzung bei 1 Hz im Vergleich dargestellt. Bei allen weiteren untersuchten Frequenzen führt Isoprenalin ebenso zu signifikanten Steigerungen der Zellkontraktilität, wie der longitudinale Datenvergleich zeigt (s. Abb. 3.35).

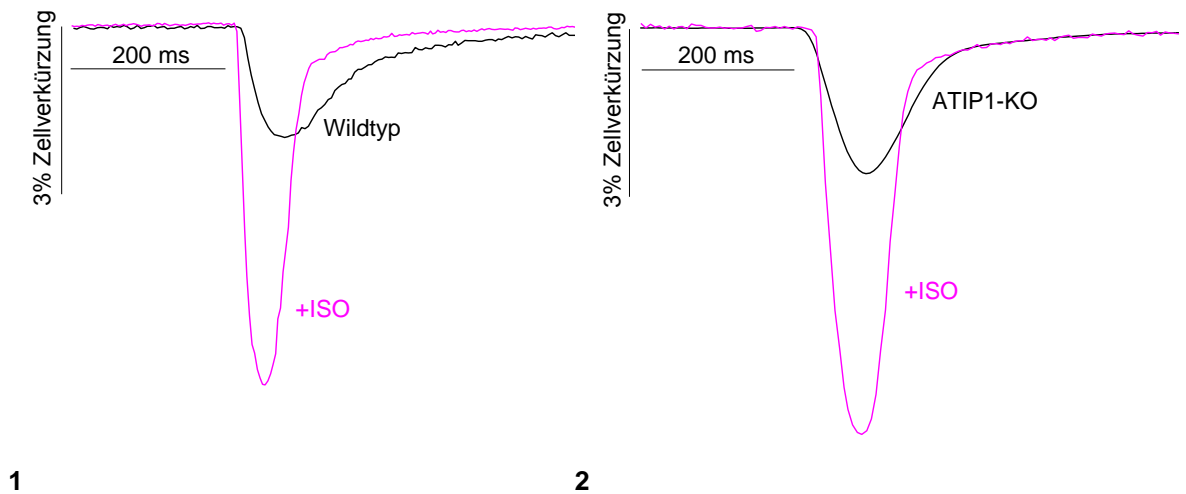


Abb. 3.34 Beispielhafte Originalregistrierungen der Zellverkürzung bei Grundstimulation (1Hz). **(1)** WT-Zelle im Vergleich zu einer WT-Zelle unter Einfluss von Isoprenalin. **(2)** ATIP1-KO-Zelle im Vergleich zu einer ATIP1-KO-Zelle unter Einfluss von Isoprenalin

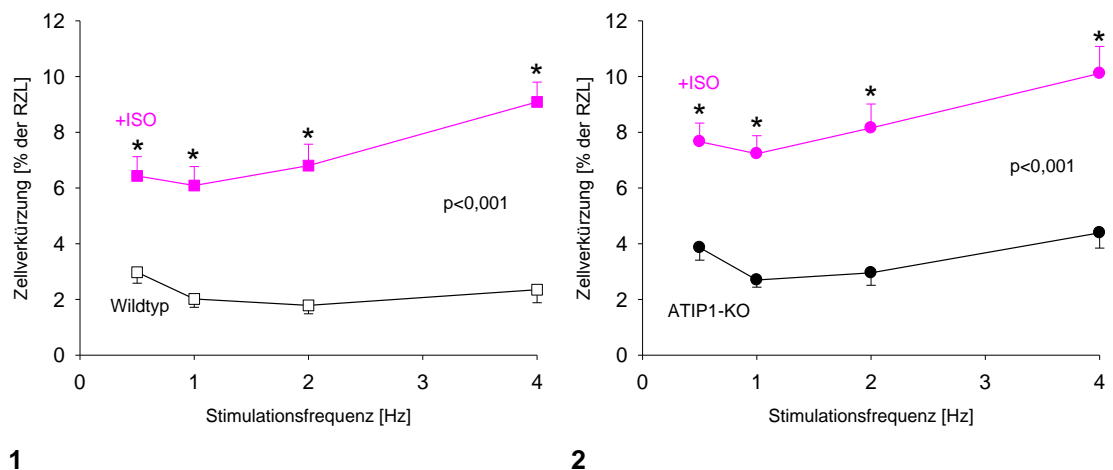


Abb. 3.35 Mittelwerte der prozentualen Zellverkürzung in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 19 WT-Zellen und 24 WT-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 24 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

Analog dazu verhalten sich die Amplituden F/F_0 der Ca^{2+} -Transienten. Bei der Grundstimulation führt Isoprenalin zu einer signifikanten Steigerung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 bei WT (1 Hz: $2,4 \pm 0,1$ vs. $3,3 \pm 0,4$, $p < 0,05$) als auch bei ATIP1-KO (1 Hz: $2,2 \pm 0,1$ vs. $3,2 \pm 0,2$, $p < 0,05$). Der frequenzabhängige Vergleich der Ca^{2+} -

Amplituden unter Stimulation mit Isoprenalin zeigt außer bei 0,5 Hz signifikant erhöhte Amplituden bei WT und ATIP1-KO, wie in Abb. 3.36 dargestellt ist.

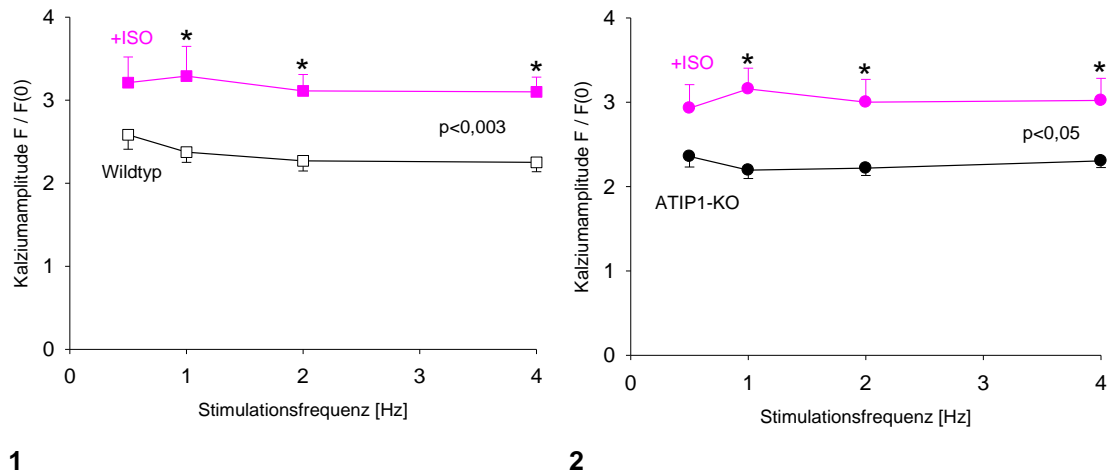


Abb. 3.36 Mittelwerte der Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ in Abhängigkeit von der vorgegebenen Stimulationsfrequenz. **(1)** 19 WT-Zellen und 24 WT-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 24 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.5.2 Der Einfluss von Isoprenalin auf die Relaxationszeit

Unter Einfluss von Isoprenalin kommt es auch zu einer signifikant beschleunigten Relaxation von WT und ATIP1-KO bei allen gemessenen Frequenzen ($p < 0,001$) (s. Abb. 3.37). Analog dazu verhält es sich bei der 50%igen Ca²⁺-Extrusion aus dem Zytosol nach der Kontraktion ($p < 0,001$) (s. Abb. 3.38).

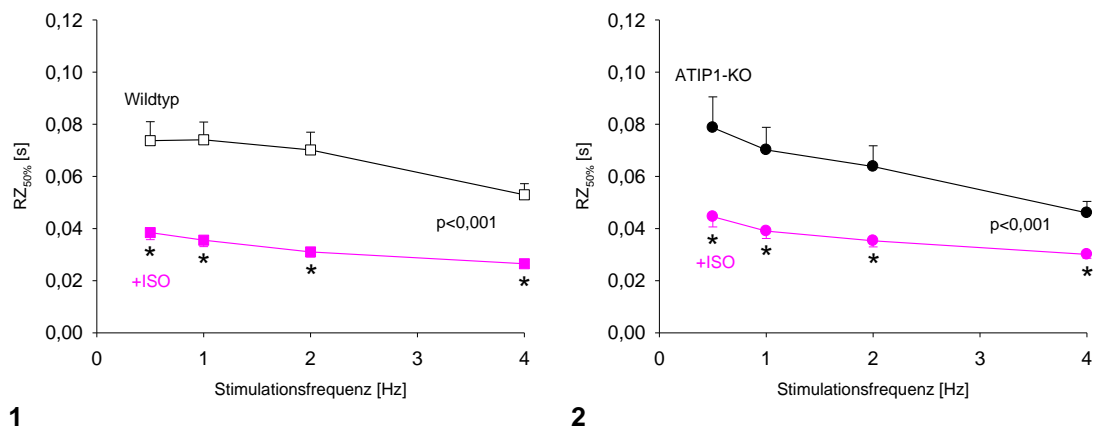


Abb. 3.37 Relaxationszeit 50% der Zellverkürzung (RZ_{50%}) unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Isoprenalin. **(1)** 19 WT-Zellen und 24 WT-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 24 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

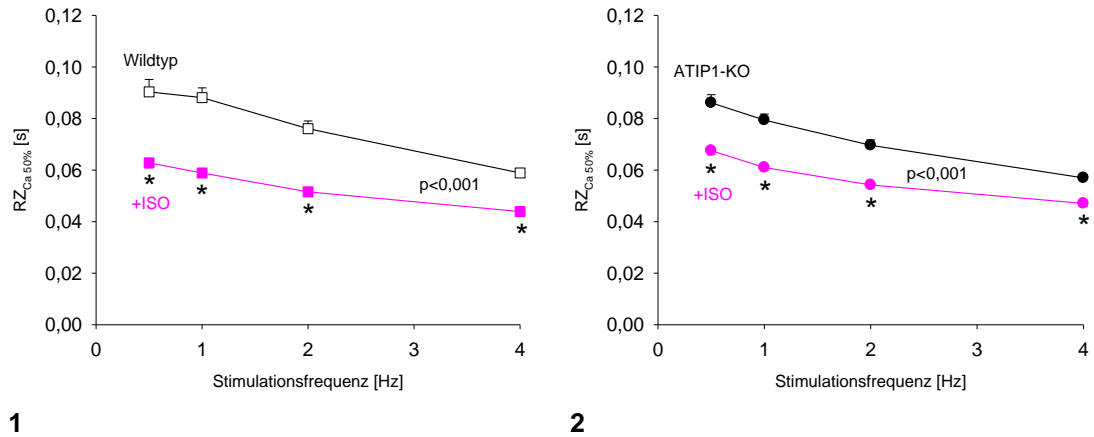


Abb. 3.38 Dauer der diastolischen Ca^{2+} -Extrusion $RZ_{\text{Ca}50\%}$ aus dem Zytosol. **(1)** 19 WT-Zellen und 24 WT-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 WT-Mäusen. **(2)** 23 ATIP1-KO-Zellen und 24 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen; (Student's t-Test; two-way ANOVA)

3.2.5.3 Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes

Messung der Post-Pausen-Potenzierung

In Abb. 3.39 ist zu sehen, dass die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude vor der Pause unter Einfluss von Isoprenalin bei beiden Zellgruppen signifikant erhöht ist. Da die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude unter Einfluss von Isoprenalin schon vor der Pause stark erhöht ist, ist die Zunahme in beiden Gruppen nach der Pause nur geringfügig, was an der relativ flachen Steigung der Geraden zu erkennen ist. WT- und ATIP1-KO-Zellen zeigen eine steiler ansteigende Gerade, schütten also im Vergleich mehr Kalzium nach der Pause in das Zytosol aus. Die Zellen der WT-Mäuse reichen im absoluten Niveau sogar an die Höhe der Ca^{2+} -Transienten unter Isoprenalin ran.

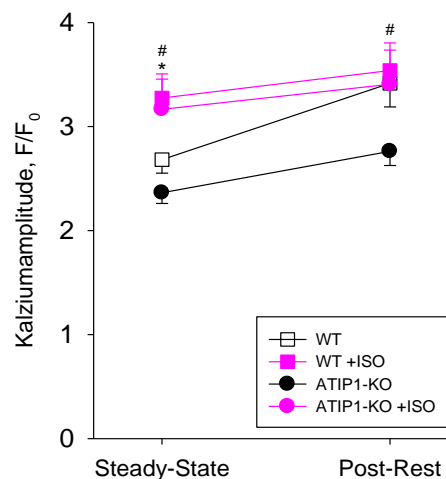


Abb. 3.39 Post-Pausen-Potenzierung der Ca^{2+} -Amplitude F/F_0 . Mittelwerte der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 vor der Pause (*steady-state*) und nach der Pause (*post-rest*); * = signifikant ($p < 0,05$; t-Test) unterschiedlich zwischen WT und WT+ISO. # signifikant ($p < 0,05$; t-Test) unterschiedlich zwischen ATIP1-KO und ATIP1-KO+ISO. 18 WT-Zellen und 20 WT-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 WT-Mäusen. 18 ATIP1-KO-Zellen und 21 ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Isoprenalin, jeweils aus 5 ATIP1-KO-Mäusen

Die Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes mithilfe lokaler Koffein-Applikation

Das Ergebnis der SR Ca^{2+} -Gehalt-Messungen mittels lokaler Koffein-Applikation unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Isoprenalin zeigt nachfolgende Abb. 3.40. Es zeigen sich in diesen Messungen keine signifikanten Unterschiede unter Verwendung des Noradrenalin-Derivats. Zusammenfassend kann man sagen, dass unter Einfluss von Isoprenalin die Zelle pro Kontraktion mehr Kalzium aus dem SR in das Zytosol schleust, aber der absolute Ca^{2+} -Gehalt des SR ähnlich ist. Dieses Ergebnis wird bei der Auswertung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung bestätigt (s. u.).

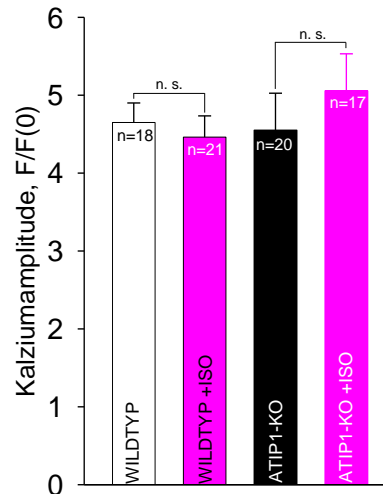


Abb. 3.40 Koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F/F_0 . Mittelwerte aus Zellen von 5 WT-Mäusen und 5 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.5.4 Bestimmung der NCX-Funktion

Die Bestimmung der NCX-Funktion mittels der Abfallskonstanten τ_{Ca}

Die Messung der Abfallskonstanten zeigt deutlich, dass Isoprenalin die NCX-Aktivität bei WT als auch bei ATIP1-KO signifikant steigert (s. Abb. 3.41 **(1)**).

Die Bestimmung der NCX-Funktion mithilfe der Relaxationszeit ($\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$)

Analog zu den Messungen der Abfallskonstanten ist in Abb. 3.41 **(2)** zu sehen, dass die $\text{RZ}_{\text{Ca}80\%}$ bei WT als auch bei ATIP1-KO signifikant länger ist als unter Einfluss von Isoprenalin. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der NCX-Funktion zeigen, dass Isoprenalin die Aktivität der NCX sowohl bei ATIP1-KO als auch bei WT entscheidend steigert.

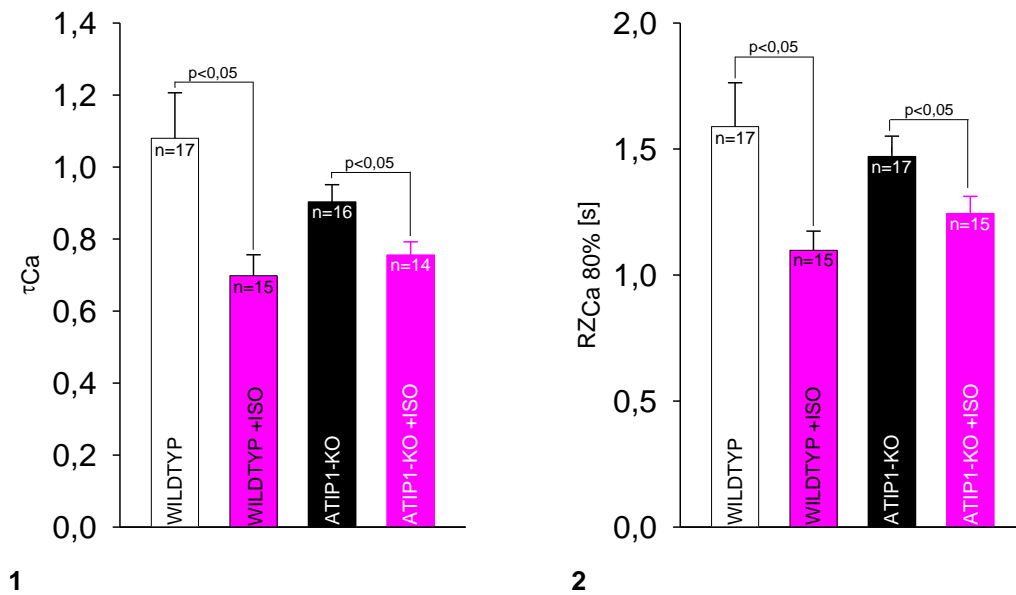


Abb. 3.41 (1) Der Exponent τ_{Ca} als Maß für die NCX-Aktivität. Ein hoher τ_{Ca} entspricht dabei einer niedrigen NCX-Aktivität. **(2)** Die Relaxationszeit 80% ($RZ_{Ca80\%}$) des koffeininduzierten Ca^{2+} -Transienten als Maß für die NCX-Aktivität. Eine lange Relaxationszeit entspricht einer niedrigen NCX-Aktivität. Mittelwerte aus Zellen von 5 WT- und 5 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.5.5 Untersuchung der fraktionellen SR Ca^{2+} -Freisetzung

Isoprenalin erhöht die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bei WT von $64,4 \pm 2,9\%$ (n=18) signifikant auf $84,3 \pm 1,9\%$ (n=21). Bei ATIP1-KO verhält es sich ähnlich. Hier erhöht Isoprenalin die fraktionelle SR- Ca^{2+} -Freisetzung von $64,8 \pm 2,8\%$ (n=20) auf $80,7 \pm 2,7\%$ (n=17). Damit entleert die Zelle unter Einfluss von Isoprenalin pro Kontraktion signifikant mehr Kalzium in das Zytosol als unter basalen Bedingungen. Zwischen WT+ISO und ATIP1-KO+ISO zeigt sich keine Unterschiedlichkeit. Die beschriebenen Ergebnisse sind in untenstehender Abb. 3.42 veranschaulicht.

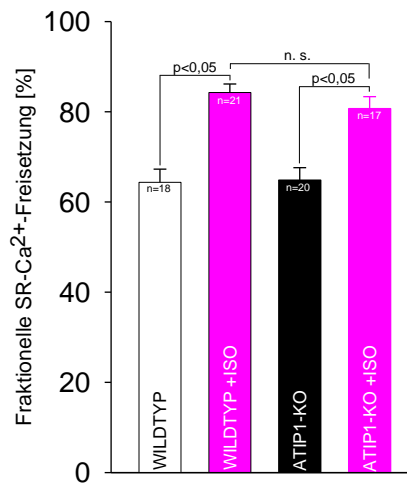


Abb. 3.42 Die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung bei der Grundstimulation, gemessen als prozentualer Anteil am SR Ca²⁺-Gehalt. Mittelwerte aus Zellen von 5 WT- und 5 ATIP1-KO-Mäusen

3.2.5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen mit Isoprenalin

Das Noradrenalin-Derivat Isoprenalin erhöht signifikant die Kontraktionsamplitude sowie die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung und beschleunigt außerdem die Relaxation bei WT als auch bei ATIP1-KO. Unter Einfluss von Isoprenalin konnte außerdem eine signifikant erhöhte NCX-Funktion bei WT als auch bei ATIP1-KO nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in Tabelle 3.5 veranschaulicht.

	WT	WT+ISO	A1-KO	A1-KO+ISO
Kraft-Frequenz-Beziehung	↔	↑	↔	↑
Relaxationszeit	↔	↓	↔	↓
SR Ca ²⁺ -Gehalt	↔	↔	↔	↔
NCX-Funktion	↔	↑	↔	↑
Fraktionelle SR Ca ²⁺ -Freisetzung	↔	↑	↔	↑

Tab. 3.5 Einfluss von Isoprenalin auf WT einerseits und auf ATIP1-KO (A1-KO) andererseits in der Übersicht

4 Diskussion

Frühere Studien über das mitochondriale Tumorsuppressorgen MTUS1 (und das Protein ATIP1) ergaben erste Einsichten hinsichtlich seiner elementaren Funktion in AT_2 -vermittelten Signalwegen, im Renin-Angiotensin-System und in der Krebsentstehung. Interessanterweise konnte ATIP1 auch in gesunden Kardiomyozyten gefunden werden, so dass ein Zusammenhang zwischen der seit langer Zeit bekannten kardialen Expression von AT_2 -Rezeptoren und ATIP1 wahrscheinlich, aber noch nicht untersucht war (DI BENEDETTO et al. 2006, LEMARIE und SCHIFFRIN 2010). Ziel dieser Arbeit ist es, die physiologische Funktion von ATIP1 im Herzen näher zu definieren. Dabei wurden Versuche mit ATIP1-KO-Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Einzelzellmessungen der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig, dass unter akutem Angiotensin II-Stress, ATIP1 ein wichtiger Bestandteil in einer über den AT_2 -Rezeptor vermittelten Kaskade ist und einen signifikanten Einfluss auf die elektromechanische Kopplung im Mäuseherzen hat. Im Folgenden werden die Ergebnisse vor dem Hintergrund der bislang veröffentlichten Daten zum Themenkreis von ATIP1 diskutiert.

4.1 ATIP1-KO-Mäuse entwickeln keine Herzhypertrophie

MTUS1 ist ein Tumorsuppressorgen und spielt eine kausale Rolle bei der Kanzerogenese zahlreicher wichtiger Krebserkrankungen. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass eine verminderte ATIP1-Expression zu gesteigerter Zellproliferation führt. Hierbei wird die Expression von ATIP1 auf Transkriptionsebene auch durch das bekannte Tumorsuppressorgen bzw. Transkriptionsfaktor p53 reguliert. P53 interagiert mit der Promoterregion des ATIP1-Gens und führt so zu gesteigerter ATIP1-Expression (CHEN et al. 2011). Diesem Regulationsweg entsprechend wurde in Untersuchungen von Patienten mit Kolon- oder Prostatakarzinom eine signifikant verminderte ATIP1-Expression nachgewiesen (ZUERN et al. 2010, LOUIS et al. 2010).

In der Tat ist der AT_2 -Rezeptor über eine komplexe Signalkaskade in der Lage, Wachstumsfaktoren und MAP-Kinasen zu hemmen und damit Zellwachstum und Zellproliferation zu inhibieren. ATIP1 wurde hier als früher und wichtiger Baustein dieser Signalkaskade identifiziert (REUDELHUBER 2005, NOUET et al. 2004). Im Einklang mit dieser Funktion ist ATIP1 in der Lage, Rezeptor-Tyrosinkinasen unabhängig von G-Proteinen zu transinaktivieren und Wachstumsfaktoren wie bspw. den IGF, EGF und bFGF zu hemmen (ELBAZ et al. 2000). Insofern bietet ein genetischer Knockout des ATIP1, wie er in dieser Arbeit im Mausmodell zur

Anwendung kommt, die Möglichkeit, zum einen die Funktion des Proteins ATIP1 zu untersuchen, zum anderen aber auch vor dem Hintergrund der engen Interaktion von AT₂-Rezeptor und ATIP1, den AT₂-Rezeptor-Signalweg aus dieser Perspektive heraus indirekt näher zu charakterisieren.

Die Rolle des AT₂-Rezeptors hinsichtlich kardialer Hypertrophie bleibt umstritten und die Studien, die bislang zu diesem Thema veröffentlicht wurden, zeigen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So konnten BOOZ und BAKER (1996) an kultivierten Myozyten von Ratten zeigen, dass der AT₂-Rezeptor die über den AT₁-Rezeptor vermittelte kardiale Wachstumsstimulation zum Teil antagonisiert und so kardiale Hypertrophie verhindert. In Einklang mit diesen Ergebnissen führte die Blockade des AT₂-Rezeptors in hypertrophierten Rattenherzen mit dem selektiven Antagonisten PD123319 unter Ang II-Stimulation zu einem verstärkten Wachstum des linken Ventrikels (BARTUNEK et al. 1999). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie mit AT₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen, dass durch das selektive Ausschalten des AT₂-Rezeptors die linksventrikuläre Hypertrophie als Ergebnis eines erhöhten Blutdrucks verhindert werden konnte (SENBONMATSU et al. 2000).

Die Untersuchung der Herzhypertrophie mit ATIP1-KO-Mäusen bzw. deren WT-Wurfgeschwistern mit dem gleichen gemischten genetischen Hintergrund (129/OlaxC57Bl/6) wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ATIP1-KO-Mäuse (n=35) im Vergleich zu WT-Mäusen (n=10) nach 12 Lebensmonaten ein im Verhältnis signifikant höheres Herz- zu Körpergewicht entwickelten (p=0,006). In der durchgeführten Autopsie nach 12 Monaten zeigte keine der WT-Mäuse und 28% der untersuchten ATIP1-KO-Mäuse eine Herzhypertrophie. Hieraus kann man schließen, dass nicht jede ATIP1-KO-Maus zwangsläufig eine Herzhypertrophie entwickelt (ZUERN et al. 2012). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ATIP1-KO-Mäuse zeigen weder bei den jungen noch bei den älteren Mäusen ein im Verhältnis höheres Herz- zu Körpergewicht und damit keine Herzhypertrophie. Die Diskrepanz zu der Arbeit von ZUERN et al. könnte zum einen durch das unterschiedliche Alter der Mäuse oder zum anderen aufgrund der geringeren Fallzahl in der vorliegenden Arbeit bedingt sein. In dieser Arbeit wurde das Herzgewicht von jeweils sechs ATIP1-KO- und sechs WT-Mäusen in Gruppe A sowie jeweils sieben ATIP1-KO- und sieben WT-Mäusen in Gruppe B ausgewertet.

4.2 Einfluss von ATIP1 auf die elektromechanische Kopplung unter basalen Bedingungen und unter beta-adrenerger Stimulation

Ob ATIP1 als ein Effektorprotein des AT₂-Rezeptors direkten Einfluss auf die Myozytenkontraktilität und den Ca²⁺-Haushalt hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bis heute gibt es nach meinem besten Wissen keine Studie, die diese Fragestellung bearbeitet hat. Da wie oben beschrieben, ein Zusammenhang zwischen dem AT₂-Rezeptor und ATIP1 im Sinne eines gemeinsamen Signalweges wahrscheinlich ist, aber im Herzen noch nicht untersucht wurde, wird im Folgenden zunächst die Literatur hinsichtlich des AT₂-Rezeptors und der elektromechanischen Kopplung näher beleuchtet, um anschließend die Daten der vorliegenden Arbeit vor diesem Hintergrund zu diskutieren.

Die Rolle des AT₂-Rezeptors im Hinblick auf die Regulation der Kontraktilität des Herzens ist bislang unklar, da die bisher veröffentlichten Arbeiten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse lieferten. An Papillarmuskeln von Kaninchenherzen konnte unter Verwendung eines AT₂-Agonisten (H-9395) allein oder in Kombination mit einem AT₁-Antagonisten (ZD-7155) ein negativer ino- und lusitroper Effekt gezeigt werden (CASTRO-CHAVES et al. 2008).

In transgenen Mäusen mit einer selektiven Überexpression des AT₂-Rezeptors wurde die Auswirkung von Ang II auf die Hämodynamik untersucht. In dieser Studie konnte mittels Langendorff-Perfusion gezeigt werden, dass die Überexpression des AT₂-Rezeptors die positiv chronotrope Wirkung von Ang II abschwächt, ohne jedoch die kardiale Kontraktilität zu beeinflussen. Auch die über den AT₁-Rezeptor peripher vermittelte Erhöhung des Blutdrucks wird durch AT₂-Rezeptor-Überexpression abgeschwächt. Diese abgeschwächten Antworten waren unter Vorbehandlung mit dem AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD123319 vollständig rückläufig (MASAKI et al. 1998). Eine Studie unter Verwendung von AT₂-Rezeptor-KO-Mäusen bestätigte die Ergebnisse von MASAKI et al. (ICHIKI et al. 1995). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser beiden Studien, dass der AT₂-Rezeptor unter Ang II-Stimulation keinen Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens hat.

In den ersten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führte ich Messungen unter basalen Bedingungen durch, in denen es herauszufinden galt, ob sich bereits der alleinige Verlust von ATIP1 auf Kontraktilität und Kalziumstoffwechsel auswirkt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kontraktilität auf Einzelzellebene bei jungen ATIP1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT bei allen gemessenen Frequenzen nahezu identisch ist (Gruppe A). Dazu passend zeigen auch die Ca²⁺-Transienten-Amplituden F/F₀ keine signifikanten Unterschiede. Die aufgehobene Expression von ATIP1 hat in

dieser Gruppe also keinen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung. Interessanterweise zeigt sich aber in den Einzelzellmessungen der älteren Mäuse (Gruppe B) eine signifikant gesteigerte Kontraktilität bei ATIP1-KO, was die Ergebnisse von CASTRO-CHAVES et al. (2008) unterstützt. Bei den Amplituden der Ca^{2+} -Transienten gab es analog zu den jüngeren Mäusen keine Unterschiede. Dies ist ein interessantes Ergebnis, und die Ursachen können unterschiedlich sein. Beispielweise kann es in frühen Stadien der kompensierten Herzhypertrophie zu gesteigerter Myozytenkontraktion durch Verlängerung des Aktionspotenzials und durch vermehrte Expression der schweren Myosinketten als herzprotektive Maßnahme kommen und zwar auch ohne Veränderung des Herz- zu Körpergewicht-Verhältnisses (BROOKSBY et al. 1992). In Anbetracht der schon veröffentlichten Studien über ATIP1 als wachstumshemmenden Faktor könnte dies ein Erklärungsansatz für eine gesteigerte Myozytenkontraktilität trotz fehlender Herzhypertrophie bei den älteren Mäusen sein. Zudem kann eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente und der mit ihnen assoziierten Proteine (z. B. Troponine) diese Ergebnisse erklären, was in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde (s. 4.3).

Um die generelle Leistungsfähigkeit und Ansprechbarkeit gegenüber beta-adrenerger Stimulanzien der ATIP1-KO-Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit auch eine Messreihe mit dem Noradrenalin-Derivat Isoprenalin durchgeführt. Isoprenalin wirkt über adrenerge β_1 -Rezeptoren am Herzen. Dadurch wird die Adenylcyclase aktiviert, welche die Synthese des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) katalysiert. Aufgrund der erhöhten cAMP-Konzentration kommt es zur Aktivierung des Enzyms Proteinkinase A (PKA), wodurch es u. a. zu einer Phosphorylierung der LTCCs kommt und dadurch zu erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol mit der Folge einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und damit zu einer Steigerung der Kontraktilität (BERS 2002). Außerdem ist die PKA in der Lage, Phospholamban und Troponin I zu phosphorylieren. Hierbei kann es zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA2a bis um den Faktor vier kommen. Zusammen mit dem verstärkten PKA-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bewirkt die gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR eine verbesserte Kontraktilität (positiv inotroper Effekt) und durch die Disinhibition von PLB eine Beschleunigung der Relaxation (positiv lusitroper Effekt) (PERIASAMY et al. 2008).

Isoprenalin steigert in den Experimenten dieser Arbeit die Kontraktilität sowohl bei ATIP1-KO als auch bei WT in beiden Gruppen, wie erwartet, signifikant. Auch die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden F/F₀ sind, wie erwartet, signifikant erhöht. Hier zeigen sich unter Isoprenalin-Stimulation keine Unterschiede zwischen WT- und ATIP1-KO-

Mäusen. Während der Stimulation mit Isoprenalin kam es bei ATIP1-KO zu keinem vorzeitigem Ableben der Zellen oder zu Arrhythmien. Dies bedeutet zusammenfassend, dass allein der Verlust von ATIP1 keinen Einfluss auf die Isoprenalin-getriggerte beta-adrenerge Stimulationsfähigkeit auf Einzelzellebene hat und dass die vorliegenden Experimente keine Hinweise darauf zulassen, dass ATIP1 im beta-adrenergen Signalweg, zumindest bei der hier verwendeten Konzentration des Isoprenalins von 5×10^{-6} mM eine Rolle spielt.

4.3 ATIP1 hat einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung unter Angiotensin II-Stress

Unter basalen Bedingungen kommt es in der Gruppe der älteren Mäuse bei ATIP1-KO zu einer signifikant gesteigerten Zellverkürzung in allen gemessenen Frequenzen im Vergleich zu den WT-Mäusen, wobei sich die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten nicht unterschieden (s. o.).

Interessanterweise zeigen die Experimente unter Einfluss von Ang II eine signifikant gesteigerte Zellverkürzung bei den Kardiomyozyten der WT-Mäuse. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Ang II bei den ATIP1-KO-Zellen zu einer signifikant verringerten Zellverkürzung. Die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden allerdings, blieben in beiden Gruppen unverändert. Das bedeutet, dass Ang II über den AT_2 -Rezeptor und damit auch über ATIP1 einen relevanten Einfluss auf die Kontraktilität und die elektromechanische Kopplung hat, nicht aber auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel.

Die positiv inotrope Wirkung von Ang II wurde bereits in mehreren Spezies beschrieben und wird hauptsächlich auf eine über den AT_1 -Rezeptor vermittelte Signaltransduktion zurückgeführt. So konnte der positiv inotrope Effekt unter Einfluss von Ang II aufgrund einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten durch eine Aktivitätssteigerung der LTCCs in Myozyten von Katzen in zwei getrennten Studien beschrieben werden (SALAS et al. 2001, PETROFF et al. 2000). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls eine Inotropiesteigerung an Kaninchenmyozyten durch eine unter Einfluss von Ang II erhöhte Konzentration von 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP3) beobachtet werden (ISHIHATA und ENDOH 1993). Das synergistische Zusammenspiel des AT_1 - und des AT_2 -Rezeptors hinsichtlich der Generierung des *second messengers* IP3 ist unbestritten. IP3 vermag sowohl die Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern als auch die Sensitivität der Myofibrillen für Kalzium zu erhöhen und ist somit direkt beteiligt an einer Steigerung der Zellverkürzung (MATTIAZZI 1997). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Blockierung des AT_1 -Rezeptors mit dem Antagonisten Losartan unter Einfluss von Ang II zu einer Reduktion von intrazellulärem IP3 um

71% führt, wohingegen die Blockierung des AT₂-Rezeptors mit dem Antagonisten PD123319 immerhin zu einer Reduktion von IP₃ um 40% führt (GOUTSOULIAK und RABKIN 1998). Diese Daten implizieren eine wichtige Rolle des AT₂-Rezeptors hinsichtlich der positiv inotropen Kaskade, möglicherweise unabhängig von einer messbaren Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration unter Stimulation von Ang II und untermauern somit die Ergebnisse dieser Arbeit.

Allerdings sind die genauen intrazellulären Mechanismen bis heute noch nicht vollständig verstanden und so zeigen andere Studien auch gegenteilige Resultate. So wurde unter Ang II-Stimulation an isolierten Myozyten von Ratten sogar ein negativ inotroper Effekt gezeigt (PALOMEQUE et al. 2006). In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des AT₂-Rezeptors keinen Einfluss auf die positiv inotrope Wirkung von Ang II hat. Man muss einschränkend unterstreichen, dass hier ventrikuläre Papillarmuskeln von Kaninchen verwendet wurden und keine isolierten Mausmyozyten. Wie für den AT₁-Rezeptor weiter oben beschrieben, kann ein Speziesunterschied sehr wohl auch für den AT₂-Rezeptor gelten. Zusätzlich war das Studiendesign von WATANABE und ENDOH auf das Antagonisieren mit selektiven Antagonisten für den AT₁- und den AT₂-Rezeptor ausgelegt, nicht jedoch auf die direkte Stimulation mit bspw. CGP42112A, einem selektiven Agonisten für den AT₂-Rezeptor, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Weiterhin wurden die Kaninchenstreifen nur mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert (WATANABE und ENDOH 1998). Und LEFROY et. al (1996) beobachteten weder an humanen, noch an isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen und Ratten, Effekte unter Einfluss von Ang II. Die Wissenschaft hat sich - zusammenfassend betrachtet - zum aktuellen Zeitpunkt darauf geeinigt, dass Ang II bezüglich der Inotropie deutliche Speziesunterschiede zeigt. Die Ursache dafür ist unklar.

Nicht berücksichtigt wurde in all diesen Studien die Differenzierung zwischen dem Einfluss von Ang II auf den AT₁-Rezeptor einerseits oder auf den AT₂-Rezeptor andererseits. Fakt bleibt jedoch, dass die Kontraktilitätssteigerung unter Ang II das Endprodukt einer komplexen Interaktion von verschiedenen Zellbestandteilen, Proteinen und Mechanismen ist. Aus den Experimenten dieser Arbeit geht hervor, dass Ang II keinen inotropiesteigernden Einfluss auf die Myozyten von ATIP1-KO-Mäusen ausübt, wohl aber auf die Myozyten der WT-Mäuse. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schliessen, dass in unserem Mausmodell ATIP1 und darüber hinaus auch dessen regulierender AT₂-Rezeptor im Zusammenspiel mit den schon beschriebenen und verstandenen Wirkungen des AT₁-Rezeptors, eine essentielle Rolle in der durch Ang II vermittelten positiv inotropen Kaskade spielt.

Wie oben beschrieben, erhöht IP₃ die intrazelluläre Kalziumkonzentration. In den Experimenten dieser Arbeit kommt es aber weder bei ATIP1-KO noch bei WT zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Transienten und das obwohl es bei WT unter Einfluss von Ang II zu einer signifikanten Steigerung der Zellkontraktion kommt. Dies kann mehrere Ursachen haben. An isolierten Kaninchenherzen konnte gezeigt werden, dass der positiv inotrope Effekt von Ang II nicht auf die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration rückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine Sensitivitätserhöhung der Myofibrillen für Kalzium aufgrund einer durch Ang II vermittelten pH-Alkalisierung (IKENOUCI et al. 1994). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Na⁺/H⁺-Exchanger (NHE) mit einem selektiven Inhibitor, den positiv inotropen Effekt von Ang II aufhebt. Der NHE ist in der Lage die intrazelluläre Natriumkonzentration im Austausch mit Protonen zu erhöhen. Dies führt wiederum zu einer Alkalisierung des intrazellulären pH-Werts und damit zu einer Sensitivitätserhöhung der Myofibrillen für Kalzium (LIU et al. 2010). Entsprechend konnte RAJAGOPAL et al. (2006) zeigen, dass Ang II diesen Effekt hauptsächlich durch eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt. Die PKC ist an der Aktivierung von Ionentransporter wie dem Na⁺/H⁺-Austauscher oder dem Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher beteiligt, welche den intrazellulären pH-Wert zu alkalisieren vermögen. Auch speziesspezifische Unterschiede könnten diese Unterschiede erklären.

Ein ganz anderer Grund für die mangelnde Erhöhung der Ca²⁺-Transienten-Amplituden in dieser Arbeit könnte der verwendete Farbstoff Fluo-3 AM sein. Dieser Farbstoff hat ein sehr gutes Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundrauschen, allerdings gelingt die Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration nur indirekt kalkuliert. Trotzdem könnte man in folgenden Arbeiten mit Farbstoffen arbeiten, die eine direkte Bestimmung der absoluten Ca²⁺-Konzentration zulassen wie bspw. Indo-1 AM oder Fura-2 AM, welche allerdings ein schlechteres *signal-to-noise*-Verhältnis zeigen. Um die Frage der Sensitivitätserhöhung der Myofibrillen für Kalzium an isolierten Mausmyozyten aufgrund einer pH-Alkalisierung durch Ang II zu erörtern, könnte man in Zukunft auch pH-Messungen durchführen und den Phosphorylierungsstatus (z. B. von Troponin I) untersuchen. Weitere Forschung ist notwendig um die offenen Fragen und Diskrepanzen zu erklären. Klar ist jedoch, dass die durch Ang II vermittelte Steigerung der Inotropie das Endprodukt eines komplexen Zusammenwirkens mehrerer Mechanismen ist, welche durch dieses Hormon ausgelöst werden.

Um den über den AT₂-Rezeptor vermittelten Signalweg im Hinblick auf die Transduktion über ATIP1 besser entschlüsseln zu können, führte ich zudem eine

Reihe von Experimenten mit dem AT₂-Agonisten CGP42112A durch. CGP42112A ist ein hochaffiner und in seiner Potenz mit Ang II vergleichbarer, selektiver AT₂-Agonist, der nicht an den AT₁-Rezeptor bindet (WHITEBREAD et al. 1991). Auch hier führte die Stimulation, ähnlich wie bei Ang II, zu einer signifikanten Steigerung der Zellkontraktilität bei den Zellen der WT-Mäuse, nicht aber bei den Zellen der ATIP1-KO-Mäuse, bei denen ich eine leicht reduzierte Zellkontraktilität unter Einfluss von CGP42112A beobachten konnte, also ähnlich zu dem beschriebenen Effekt von Angiotensin II. Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten blieb auch hier weitgehend unverändert. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese einer voll funktionsfähigen Signalkaskade über den AT₂-Rezeptor bei WT-Mäusen und eine Störung dieser bei ATIP1-KO-Mäusen, wobei hier ATIP1 ein Schlüsselprotein zu sein scheint, dass zu veränderter Kontraktilität auf Einzelzellebene führt.

4.4 SERCA2a-Aktivität in ATIP1-KO-Mäusen

Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnten in Gruppe A keine Unterschiede zwischen jungen WT- und ATIP-KO-Mäusen bezüglich der Relaxationseigenschaften der Myozyten festgestellt werden. Weder bei der Längenzunahme nach maximaler Kontraktion, noch beim Abfall der Ca²⁺-Transienten-Amplitude zeigen sich Unterschiede. Dies bedeutet im Umkehrschluss auch, dass die Aktivität der SERCA2a bei WT und ATIP1-KO in dieser Gruppe in etwa gleich ist. Bei den älteren Mäusen aus Gruppe B zeigte sich analog zu gesteigerter Zellkontraktilität bei ATIP1-KO-Zellen eine signifikant schnellere Relaxation als bei WT-Zellen unter basalen Bedingungen. Die in dieser Arbeit gemessene Funktion des NCX wies aber keine Unterschiede auf und so kann man annehmen, dass eine erhöhte SERCA2a-Aktivität für die schnellere Relaxation der ATIP1-KO-Zellen verantwortlich ist (s. auch 4.6). Für den AT₂-Rezeptor wurde in der Vergangenheit die Fähigkeit zur Aktivierung unterschiedlicher Phosphatasen wie bspw. der Serin/Threonin-Phosphatase 2a oder der Phosphotyrosin-Phosphatase postuliert (NAKAJIMA et al. 1995). Phospholamban inhibiert im dephosphoryliertem Zustand die SERCA2a und wird vornehmlich durch eine PKA- oder CaMKII-vermittelte Signalkaskade phosphoryliert, was zu einer Disinhibition der SERCA2a und damit zu einem erhöhten Ca²⁺-Uptake in das SR führt. CaMKII phosphoryliert hierbei Phospholamban am Threonin an Position 17 (MATTIAZZI et al. 2006). Ein Erklärungsansatz wäre, dass bei ATIP1-KO-Zellen durch eine verminderte Aktivierung von Phosphatasen Phospholamban vermehrt in einem phosphoryliertem Zustand vorliegt und dass es deshalb zu einer gesteigerten Disinhibition der

SERCA2a kommt und damit zu einer schnelleren Relaxation. Im Übrigen könnte durch eine verminderte Aktivierung von Phosphatasen auch kardiales Troponin I vermehrt phosphoryliert vorliegen. Im phosphorylierten Zustand erhöht Troponin I durch eine Konformationsänderung die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofibrillen und erhöht die Ca^{2+} -Dissoziation von Troponin C und führt dadurch zu einer schnelleren Relaxation. Troponin I wird vornehmlich durch einen PKA-vermittelten Mechanismus phosphoryliert und trägt mitunter zu dem positiv lusitropen Effekt unter beta-adrenerger Stimulation bei. Die durch den AT_2 -Rezeptor aktivierte Protein Phosphatase 2 hat die Fähigkeit, Troponin I zu dephosphorylieren (LAYLAND et al. 2004). Diese Annahme bleibt jedoch rein spekulativ und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Auch eine erhöhte SERCA2a-Expression kann man in Betracht ziehen, was jedoch ebenfalls nicht untersucht wurde. Interessanterweise ist die Aktivität der SERCA2a bei den Zellen der jüngeren ATIP1-KO-Mäuse im Vergleich zur WT-Gruppe in den Messungen dieser Arbeit unverändert. Daraus kann man schlussfolgern, dass es durch den Knockout von ATIP1 erst im Rahmen des Alterungsprozesses zu einer vermehrten SERCA2a-Aktivität oder -Expression bei ATIP1-KO-Mäusen einerseits, oder aber im Gegenteil zu einer verringerten SERCA2a-Aktivität oder -Expression bei WT-Mäusen kommt. Frühere Studien konnten eine verringerte Expression und Aktivität der SERCA2a bei Tieren und Menschen mit Herzinsuffizienz zeigen (KAWASE et HAJJAR 2008). Weitere Studien sind notwendig um den Einfluss von ATIP1 auf die SERCA2a noch genauer zu entschlüsseln. Tatsache bleibt aber, dass ATIP1 nicht nur eine Schlüsselrolle bei der Kontraktion, sondern auch bei der Relaxation spielt und somit relevanten Einfluss auf das Ca^{2+} -Handling der Zelle hat.

Isoprenalin steigert in Experimenten dieser Arbeit, wie erwartet, auch die Relaxation der Zellen von ATIP1-KO- und WT-Mäusen. Dies liegt zum einen an einer wie oben beschriebenen PKA-vermittelten Phosphorylierung von PLB und damit an einer Aktivitätssteigerung der SERCA2a. Zum anderen konnten die Untersuchungen der NCX-Aktivität in dieser Arbeit zeigen, dass ebenfalls eine gesteigerte NCX-Funktion mitverantwortlich für die beschleunigte Relaxation ist. So steigerte Isoprenalin den Abfall der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude nach Koffeinapplikation bei WT und bei ATIP1-KO signifikant. Die durch die PKA vermittelte Phosphorylierung des NCX wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert und trägt hier vermutlich zu der gesteigerten Relaxation bei (PERCHENET et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht untersucht. Die Steigerungsstärke der Relaxation unter Isoprenalin war zwischen ATIP1-KO und WT in etwa gleich. Das bedeutet, dass der

Verlust von ATIP1, wie erwartet, keinen Einfluss auf die über den β_1 -Adrenozeptor vermittelte Stimulation durch Isoprenalin hat.

In Gruppe B wurde in dieser Arbeit außerdem der Einfluss von Ang II auf die Relaxation der Zellen untersucht. Interessanterweise beschleunigt Ang II die Relaxation nur bei Zellen von WT-Mäusen, nicht aber von ATIP1-KO-Mäusen. Analog dazu verhalten sich auch die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden. In einer Studie von RAJAGOPAL et al. (2006) wurde an isolierten Mausmyozyten ein positiv inotroper und positiv lusitroper Effekt unter Einfluss von Ang II nur bei Zellen von WT-Mäusen, nicht aber bei Zellen von AT_1 -Rezeptor-KO-Mäusen festgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ang II diesen Effekt hauptsächlich durch eine Aktivierung der PKC vermittelt. Eine Phosphorylierung des NCX durch die PKC und damit eine Aktivitätssteigerung wurde in anderen Studien beschrieben und passt zu der tendenziell gesteigerten NCX-Funktion in den Messungen mit Ang II (IWAMOTO et al. 1996). In einer anderen Studie konnte an Mausmyozyten des linken Ventrikels ebenfalls eine positiv lusitrope Wirkung unter Einfluss von Ang II gezeigt werden. Hier wurde aber eine erhöhte nNOS-Produktion, sowie eine Steigerung der Phosphorylierung von Phospholamban und damit eine Aktivitätserhöhung der SERCA2a für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Eine genaue Differenzierung hinsichtlich der beteiligten AT-Rezeptoren fand nicht statt (JIN et al. 2012).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in dieser Arbeit beschriebene positiv lusitrope Wirkung von Ang II in der Literatur zum Teil bereits beschrieben ist. In der Regel wird hierbei eine über den besser erforschten AT_1 -Rezeptor vermittelte Signalkaskade verantwortlich gemacht.

Um weitere Klarheit über den AT_2 -Rezeptor und dessen assoziiertes Effektorprotein ATIP1 zu erhalten, führte ich in Gruppe B eine weitere Messreihe durch, diesmal mit dem selektiven AT_2 -Agonisten CGP42112A. Interessanterweise zeigt sich hier analog zu den Ergebnissen mit Ang II eine beschleunigte Relaxation und ein beschleunigter Abfall der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden nur bei Zellen der WT-Mäuse, nicht aber bei Zellen der ATIP1-KO-Mäuse. Diese Beobachtung verstärkt die Annahme einer essentiellen Rolle des AT_2 -Rezeptors und von ATIP1 hinsichtlich der Zellrelaxation und betont dessen Wichtigkeit bezüglich der elektromechanischen Kopplung und des Ca^{2+} -Haushalts der untersuchten Kardiomyozyten.

4.5 ATIP1 ohne messbaren Einfluss auf den SR Ca²⁺-Gehalt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ca²⁺-Gehalt des SR mithilfe von *post-rest*-Messungen und Koffein-Applikationen bestimmt. In Gruppe A zeigen sich bei den jüngeren Mäusen unter basalen Bedingungen keine Unterschiede im SR Ca²⁺-Gehalt zwischen ATIP1-KO und WT. Nachdem es in dieser Gruppe aber auch keine Unterschiedlichkeiten bei Kontraktion, Relaxation, SERCA2a- und NCX-Aktivität gegeben hat, überrascht dieses Ergebnis nicht. Bei den älteren Mäusen aus Gruppe B zeigen sich unter basalen Bedingungen ebenfalls keine Unterschiede im SR Ca²⁺-Gehalt. In dieser Gruppe kontrahieren ATIP1-KO-Zellen aber signifikant stärker und relaxieren signifikant schneller als WT-Zellen. Aufgrund der mutmaßlich höheren SERCA2a-Aktivität oder -Expression bei ATIP1-KO-Mäusen könnte man auch einen höheren SR Ca²⁺-Gehalt erwarten. Da dies aber nicht der Fall ist und auch die NCX-Funktion in den Messungen dieser Arbeit keine Unterschiede zu der bei WT aufweist, muss man von einem in etwa gleichen sarkoplasmatischen Netto-Ca²⁺-Gehalt bei ATIP1-KO- und WT-Mäusen ausgehen und eine vor allem gesteigerte Aktivität der SERCA2a, aber auch eine gesteigerte SR Ca²⁺-Freisetzung bei ATIP1-KO, für die funktionellen Unterschiede verantwortlich machen.

Zudem konnte jüngst von BODE et al. (2011) an Ratten gezeigt werden, dass eine erhöhte bzw. verminderte SERCA2a-Aktivität generell nur einen relativ geringen Einfluss auf den SR Ca²⁺-Gehalt hat.

Unter Einfluss von Ang II kontrahieren und relaxieren Zellen der WT-Mäuse signifikant schneller. ATIP1-KO-Mäuse kontrahieren signifikant geringer. Die Mechanismen, die diese funktionellen Unterschiede erklären könnten, wurden bereits weiter oben diskutiert. In den Messungen des SR Ca²⁺-Gehaltes ändert sich unter Stimulation unter Ang II aber nichts. In mehreren Studien konnte die verminderte SERCA2a-Expression und das gestörte Ca²⁺-Handling bei herzinsuffizienten Zellen nach Myokardinfarkt durch eine Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mit ACE-Hemmstoffen wie Captopril und Imidapril, aber auch mit dem AT₁-Rezeptor-Blocker Losartan normalisiert werden (SHAO et al. 1999, 2005). Im Umkehrschluss vermindert Ang II als wichtigster Effektor des RAS laut diesen Studien die SERCA2a-Expression, vermindert den SR Ca²⁺-Gehalt und stört nachhaltig den Kalziumstoffwechsel der Zelle. Diesen Studien gemeinsam ist aber eine längerfristige Behandlung mit ACE-Hemmern oder Losartan. In den Experimenten dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ang II auf die Myozyten in Echtzeit und ohne Vorbehandlung untersucht. Hierbei kam es zu keiner Änderung im SR Ca²⁺-Gehalt. Auch unter Einfluss von CGP42112A und Isoprenalin konnten

bei den älteren Mäusen aus Gruppe B keine Unterschiede im SR Ca^{2+} -Gehalt festgestellt werden.

4.6 ATIP1 beeinflusst die Aktivität des NCX nicht

Unter basalen Bedingungen ist der NCX bei ATIP1-KO- und WT-Mäusen in beiden Gruppen etwa gleich aktiv, der Abfall der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude nach Koffein-Applikation ist also gleich schnell. Da in Gruppe B die ATIP1-KO-Zellen eine schnellere Relaxation aufweisen, kann man vermuten, dass dies die Folge einer verstärkten SERCA2a-Funktion ist, welche hauptsächlich für die Relaxation verantwortlich ist. Weder die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase, noch der mitochondriale Ca^{2+} -Uniport üben üblicherweise entscheidende Einflüsse auf die Ca^{2+} -Extrusion während der Diastole aus (BERS 2001). Eine verstärkte Aktivität dieser beiden Transportsysteme kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ang II-Stimulation führt in den Messungen dieser Arbeit zu einer tendenziell verstärkten NCX-Funktion bei ATIP1-KO- und WT-Mäusen. Eine Hochregulation der NCX-Expression wäre auch möglich, ist aber unwahrscheinlich, da in den Experimenten dieser Arbeit die Effekte in einer akuten Applikation von Ang II untersucht wurden und eine Expressionsänderung in diesem kurzem Zeitraum eher nicht stattfinden würde. Eine Phosphorylierung des NCX durch die PKC über einen Ang II-vermittelten Signalweg ist beschrieben und passt damit zu den oben genannten Ergebnissen (IWAMOTO et al. 1996). Ang II steigert also nicht nur die Aktivität der SERCA2a, sondern auch des NCX und führt darüber zu einer gesteigerten Relaxation der WT-Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es bei ATIP1-KO-Zellen zu keiner Änderung der Relaxation unter Einfluss von Ang II, obwohl der NCX tendenziell stärker aktiviert wird. Somit kann man vermuten, dass die SERCA2a durch Ang II bei ATIP1-KO-Mäusen in ihrer Funktion beeinträchtigt wird. Der AT_2 -Rezeptor-Agonist CGP42112A steigert ebenso signifikant die Relaxation bei WT-Mäusen wegen seiner Selektivität mutmaßlich über eine AT_2 -Rezeptor- / ATIP1-vermittelte Signalkaskade. Die Aktivität des NCX wird aber nicht beeinflusst. Interessanterweise verübt CGP42112A auf die Zellen von ATIP1-KO-Mäusen keinerlei Einfluss. Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass der AT_2 -Rezeptor und weitaus mehr ATIP1 von besonderer Bedeutung in der über Ang II- bzw. CGP42212A-vermittelten Signalkaskade sind. Die aufgehobene Wirkung von Ang II auf die SERCA2a bei ATIP1-KO-Mäusen untermauert hier nochmal die wichtige Funktion von ATIP1. Isoprenalin erhöht in den Experimenten sowohl die NCX-Funktion bei ATIP1-KO- als auch bei WT-Mäusen signifikant.

4.7 Fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung

Das Verhältnis der Amplitude von Koffein-Transient zu Ca²⁺-Transient während der Grundstimulation eignet sich, die pro Kontraktion prozentual ausgeschüttete Kalziummenge aus dem SR in das Zytosol qualitativ zu berechnen. Das in der Systole über den LTCC einströmende Kalzium führt über den Mechanismus der Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Freisetzung (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-Release*, CICR) zu einer Öffnung der RyR2 (FABIATO 1983). Das so in die Zelle gelangende Kalzium genügt der Zelle zur Kontraktion. Die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung hängt also maßgeblich von der Aktivität der LTCC und der RyR2 sowie vom SR Ca²⁺-Gehalt ab und gilt als guter Indikator für die Funktionstüchtigkeit und Effektivität der elektromechanischen Kopplung (BERS 2001). In dieser Arbeit wurde die Funktion der LTCC bei den untersuchten Mäusen nicht untersucht. Dies wäre mit einem Dihydropyridin wie Nifedipin in Zukunft möglich. Der SR Ca²⁺-Gehalt ist unter basalen Bedingungen sowie in den Messungen mit Ang II, CGP42112A und Isoprenalin bei ATIP1-KO- und WT-Mäusen unverändert. Die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung ist in den Messungen mit Ang II bei ATIP1-KO-Zellen signifikant erniedrigt, d. h. pro Schlag wird prozentual weniger Kalzium in das Zytosol geschleust. Dies könnte an einer verminderten RyR2- oder LTCC-Aktivität liegen und passt zu den Ergebnissen der verminderten Kontraktilität bei ATIP1-KO-Zellen unter Einfluss von Ang II. Wie zu erwarten, führte die Stimulation mit Isoprenalin zu einer signifikanten Erhöhung der fraktionellen SR Ca²⁺-Freisetzung, denn einerseits steigert Isoprenalin durch Aktivierung der PKA die Phosphorylierung der LTCCs, andererseits die Phosphorylierung der RyR2 (CARTER et al. 2011). Bei gleichem SR Ca²⁺-Gehalt führt das faktisch zu einer erhöhten fraktionellen SR Ca²⁺-Freisetzung. Prozentuale Unterschiede zwischen ATIP1-KO und WT gab es aber nicht. Nicht beeinflusst wurde die fraktionelle SR Ca²⁺-Freisetzung durch den AT₂-Rezeptor-Agonist CGP42112A.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Verwendung von ATIP1-Knockout-Mäusen zum ersten Mal gezeigt werden, dass sowohl der AT₂-Rezeptor als auch das mit diesem Rezeptor interagierende „AT₂-interacting Protein 1“ (ATIP1) funktionellen Einfluss auf die Kontraktilität und die elektromechanische Kopplung des Herzens auf Einzelzellebene haben. Es wurden Experimente mithilfe der Epifluoreszenzmikroskopie an zwei Gruppen von Mäusen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Weder bei den jungen noch bei den älteren Mäusen verursachte der Verlust von ATIP1 ein höheres Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis und damit eine Herzhypertrophie. Bei den jungen Tieren konnten auch in den funktionellen Messungen unter basalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen ATIP1-KO-Mäusen und der WT-Kontrolle festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigen Experimente mit älteren Mäusen unter basalen Bedingungen eine erhöhte Kontraktilität sowie eine verstärkte Zellrelaxation bei ATIP1-KO-Mäusen. Diesen vergleichsweise positiv inotropen Effekt kann man am ehesten durch eine erhöhte fraktionelle SR Ca²⁺-Ausschüttung erklären. Für die schnellere Zellrelaxation kommt eine erhöhte SERCA2a-Aktivität in Betracht, da in den Messungen dieser Arbeit die NCX-Funktion keine Unterschiede aufwies. Interessanterweise führte die Stimulation mit Ang II zu einer signifikant stärkeren Kontraktion bei Zellen der WT-Mäuse und zu einer signifikant verringerten Kontraktion bei Zellen der ATIP1-KO-Mäuse. Analog dazu kam es unter Einfluss von Ang II zu einer schnelleren Relaxation der WT-Zellen. Die Ergebnisse der Messungen mit dem AT₂-Agonisten CGP42112A standen in Analogie zu den Messungen mit Ang II. Diese Beobachtung zeigt, dass ATIP1 ein relevanter Bestandteil in einer über den AT₂-Rezeptor vermittelten Kaskade ist, welche einen wichtigen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung im Herzen hat. Um die generelle Leistungsfähigkeit der ATIP1-KO-Mäuse ins Verhältnis zu der der WT-Mäuse zu setzen, stimulierte ich in einer weiteren Messreihe über den β-adrenergen Weg mit Isoprenalin. Hier zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen ATIP1-KO- und WT-Tieren. Dies bedeutet, dass der Verlust von ATIP1 keine Auswirkungen auf den β-adrenergen Signalweg hat.

Die pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern und den AT₁-Antagonisten hat einen hohen Stellenwert. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben vermehrt Aufschluss über die Rolle des weniger verstandenen AT₂-Rezeptors und über ATIP1 auf kardialer Ebene. Damit könnten eventuell neue pharmakologische Ansätze zur Therapie und Prophylaxe der Herzinsuffizienz gefunden werden.

6 Literaturverzeichnis

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA (1999): Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11, S23-29

Ardailou R (1999): Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11, S30-39

Atlas SA (2007): The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13, 9-20

Baenkler HW, Goldschmidt H, Hahn JW, Hinterseer M, Knez A, Lafrenz M, Möhlig M, Pfeiffer AF, Schmidt HH, Spranger J et al. (2007): *Kurzlehrbuch Innere Medizin*; 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Lorell BH (1999): Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation* 99, 22-25

Berk BC, Corson MA (1997): Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 80, 607-616

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

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

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

Bode EF, Briston SJ, Overend CL, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA (2011): Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 589, 4723-4729

Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A (2005): The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 115, 3306-3317

Booz GW, Baker KM (1996): Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 28, 635-640

Bossen EH, Sommer JR, Waugh RA (1981): Comparative stereology of mouse atria. *Tissue Cell* 13, 71-77

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM (1940): The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 98, 283-298

Brooksby P, Levi AJ, Jones JV (1992): Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 10, 521-527

Brown MJ (2006): Direct renin inhibition – a new way of targeting the renin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7, 7-11

Carey RM, Siragy HM (2003): Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24, 261-271

Carey RM, Jin XH, Siragy HM (2001): Role of the angiotensin AT₂ receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am J Hypertens* 14, 98S-102S

Carter S, Pitt SJ, Colyer J, Sitsapesan R (2011): Ca²⁺-dependent phosphorylation of RyR2 can uncouple channel gating from direct cytosolic Ca²⁺ regulation. *J Membr Biol* 240, 21-33

Castro-Chaves P, Soares S, Fontes-Carvalho R, Leite-Moreira AF (2008): Negative inotropic effect of selective AT₂ receptor stimulation and its modulation by the endocardial endothelium. *Eur J Pharmacol* 578, 261-269

Chen Z, Liu X, Wang C, Jin Y, Wang Y, Wang A, Zhou X (2011): p53 regulates the expression of human angiotensin II AT₂ receptor interacting protein (ATIP1) gene. *Oncol Lett* 2, 919-922

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL et al. (1989): Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 196-203

De Waard M, Gurnett CA, Campbell KP (1996): Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. *Ion Channels* 4, 41-87

Di Benedetto M, Bieche I, Deshayes F, Vacher S, Nouet S, Collura V, Seitz I, Louis S, Pineau P, Amsellem-Ouazana D et al. (2006): Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins, ATIP. *Gene* 380, 127-136

Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ (1996): Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94, 2756-2767

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T et al. (2001): Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103, 1955-1960

Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C (2000): Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinol* 14, 795-804

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14

Fatt P, Katz B (1953): The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol* 120, 171-204

Ferrario CM (2006): Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7, 3-14

Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RH (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 57, 20-27

Fujita T, Mogi M, Min LJ, Iwanami J, Tsukuda K, Sakata A, Okayama H, Iwai M, Nahmias C, Higaki J et al. (2009): Attenuation of cuff-induced neointimal formation by overexpression of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 1. *Hypertension* 53, 688-693

Fuhrquist F, Saijonmaa O (2008): Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264, 224-236

Goutsouliak V, Rabkin SW (1998): Comparison of angiotensin II type-1 and type-2 receptor antagonists on angiotensin II-induced IP₃ generation in cardiomyocytes. *Gen Pharmacol* 30, 367-372

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450

Hagiwara S, Ozawa S, Sand O (1975): Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65, 617-644

Handa RK (2001): Characterization and signaling of the AT(4) receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *J Am Soc Nephrol* 12, 440-449

Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ (1997): Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 19022-19026

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T (1995): Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377, 748-750

Ihara M, Urata H, Kinoshita A, Suzumiya J, Sasaguri M, Kikuchi M, Ideishi M, Arakawa K (1999): Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta. *Hypertension* 33, 1399-1405

Ikenouchi H, Barry WH, Bridge JH, Weinberg EO, Apstein CS, Lorell BH (1994): Effects of angiotensin II on intracellular Ca²⁺ and pH in isolated beating rabbit hearts and myocytes loaded with the indicator indo-1. *J Physiol* 480, 203-215

Institute of Laboratory Animal Resources: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press, Washington 1996

Ishihata A, Endoh M (1993): Pharmacological characteristics of the positive inotropic effect of angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 108, 999-1005

Iwai M, Chen R, Li Z, Shiuchi T, Suzuki J, Ide A, Tsuda M, Okumura M, Min LJ, Mogi M et al. (2005): Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 112, 1636-1643

Iwai N, Inagami T (1992): Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 298, 257-260

Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M (1996): Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem* 271, 13609-13615

Jin CZ, Jang JH, Wang Y, Kim JG, Bae YM, Shi J, Che CR, Kim SJ, Zhang YH (2012): Neuronal nitric oxide synthase is up-regulated by angiotensin II and attenuates NADPH oxidase activity and facilitates relaxation in murine left ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1274-1281

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*. 4. Auflage Springer Verlag Berlin, 1996

Kawase Y, Hajjar RJ (2008): The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5, 554-565

Kim S, Iwao H (2000): Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52, 11-34

Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007): The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18, 208-214

Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N (1996): Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem* 271, 22729-22735

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch* 61, 291-332

Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Diez J (1998): Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* 98, 535-540

Layland J, Grieve DJ, Cave AC, Sparks E, Solaro RJ, Shah AM (2004): Essential role of troponin I in the positive inotropic response to isoprenaline in mouse hearts contracting auxotonically. *J Physiol* 556, 835-847

Lefroy DC, Crake T, Del Monte F, Vescovo G, Dalla Libera L, Harding S, Poole-Wilson PA (1996): Angiotensin II and contraction of isolated myocytes from human, guinea pig, and infarcted rat hearts. *Am J Physiol* 270, H2060-2069

Lemarie CA, Schiffrin EL (2010): The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11, 19-31

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274, H1335-1347

Liu H, Cala PM, Anderson SE (2010): Na/H exchange inhibition protects newborn heart from ischemia/reperfusion injury by limiting Na⁺-dependent Ca²⁺ overload. *J Cardiovasc Pharmacol* 55, 227-233

Louis SN, Chow L, Rezmann L, Krezel MA, Catt KJ, Tikellis C, Frauman AG, Louis WJ (2010): Expression and function of ATIP/MTUS1 in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 70, 1563-1574

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631-640

Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca²⁺-handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2249-2258

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904-911

Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M et al. (1998): Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 101, 527-535

Mattiazzi A (1997): Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness? *J Pharmacol Toxicol Methods* 37, 205-214

Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Said M, Kranias EG (2006): The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions. *Braz J Med Biol Res* 39, 563-572

Meissner G (1994): Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56, 485-508

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989): Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264, 8171-8178

Miura S, Saku K, Karnik SS (2003): Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res* 26, 937-943

Mogi M, Iwai M, Horiuchi M (2007): Emerging concepts of regulation of angiotensin II receptors: new players and targets for traditional receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2532-2539

Molecular Probes (Invitrogen Corporation): A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Molecular Probes, Carlsbad 2007

Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N (1996): Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 1211-1222

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ (1995): The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10663-10667

Nickenig G, Harrison DG (2002): The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105, 393-396

Noda K, Feng YH, Liu XP, Saad Y, Husain A, Karnik SS (1996): The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* 35, 16435-16442

Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M et al. (2004): Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279, 28989-28997

Page IH, Helmer OM (1940): A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med* 71, 29-42

Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M (2006): Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H96-106

Perchenet L, Hinde AK, Patel KC, Hancox JC, Levi AJ (2000): Stimulation of Na/Ca exchange by the beta-adrenergic/protein kinase A pathway in guinea-pig ventricular myocytes at 37 degrees C. *Pflugers Arch* 439, 822-828

Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ (2008): Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77, 265-273

Petroff MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A (2000): Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol* 529 Pt 1, 189-203

Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC et al. (1992): Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327, 669-677

Pillai JB, Gupta M, Rajamohan SB, Lang R, Raman J, Gupta MP (2006): Poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice are protected from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1545-1553

Pinali C, Kitmitto A (2014): Serial block face scanning electron microscopy for the study of cardiac muscle ultrastructure at nanoscale resolutions. *J Mol Cell Cardiol* 76, 1-11

Rajagopal K, Whalen EJ, Violin JD, Stiber JA, Rosenberg PB, Premont RT, Coffman TM, Rockman HA, Lefkowitz RJ (2006): Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16284-16289

Reinemund J, Seidel K, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe F, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y, Menk M et al. (2009): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes. *Biochem Pharmacol* 77, 1795-1805

Reudelhuber TL (2005): The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension* 46, 1261-1262

Ringer S (1883): A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol* 4, 29-43

Rokita A: Der Einfluss der konditionalen Überexpression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) im Herzen auf die Kontraktilität und den Kalzium-Stoffwechsel von ventrikulären Herzmuskelzellen. Med. Diss. Göttingen 2008

Romero JC, Reckelhoff JF (1999): State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34, 943-949

Ross R (1999): Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, König S, Wittig B, Egido J (2000): Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86, 1266-1272

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J (2001): Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 321-329

Sag CM, Dybkova N, Neef S, Maier LS (2007): Effects on recovery during acidosis in cardiac myocytes overexpressing CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 43, 696-709

Salas MA, Vila-Petroff MG, Palomeque J, Aiello EA, Mattiazzi A (2001): Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1957-1971

Scoote M, Williams AJ (2002): The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. *Cardiovasc Res* 56, 359-372

Scriven DR, Dan P, Moore ED (2000): Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79, 2682-2691

Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M (2003): Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J* 17, 1180-1182

Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T (2000): Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 106, R25-29

Shao Q, Ren B, Zarain-Herzberg A, Ganguly PK, Dhalla NS (1999): Captopril treatment improves the sarcoplasmic reticular Ca(2+) transport in heart failure due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1663-1672

Shao Q, Ren B, Saini HK, Netticadan T, Takeda N, Dhalla NS (2005): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and gene expression in congestive heart failure are modified by imidapril treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1674-1682

Sigma-Aldrich Inc.: Strukturformeln von Angiotensin II, CGP42112A, Isoprenalin. Product Information Sheet. Sigma-Aldrich, St Louis 1996

Simmerman HK, Jones LR (1998): Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78, 921-947

Sitsapesan R, Williams AJ (2000): Do inactivation mechanisms rather than adaptation hold the key to understanding ryanodine receptor channel gating? *J Gen Physiol* 116, 867-872

Skeggs LT Jr, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP (1954): The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med* 99, 275-282

Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G et al. (2010): Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *J Am Coll Cardiol* 55, 2330-2342

Speth RC, Kim KH (1990): Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine6 angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 169, 997-1006

Statistisches Bundesamt (2016): Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>, letzter Abruf vom 31.03.2016

Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, Bader M, Unger T (2010): The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11, 67-73

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC et al. (1992): Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40, 409-419

Tigerstedt R, Bergmann PG (1898): Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol* 8, 223-71

Touyz RM, Berry C (2002): Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35, 1001-1015

Treiny R, Jurevicius J (2008): L-type Ca²⁺ channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)* 44, 491-499

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

Tsien R, Pozzan T, Rink TJ (1982): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94, 325-354

van de Wal RM, Plokker HW, Lok DJ, Boomsma F, van der Horst FA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Voors AA (2006): Determinants of increased angiotensin II levels in severe chronic heart failure patients despite ACE inhibition. *Int J Cardiol* 106, 367-372

Vaughan DE (2002): Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *Am J Hypertens* 15, 3S-8S

Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH (2002): Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol* 18, 1331-1339

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH et al. (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS (2013): Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 18, 1063-1077

Watanabe A, Endoh M (1998): Relationship between the increase in Ca²⁺ transient and contractile force induced by angiotensin II in aequorin-loaded rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 37, 524-531

Weber KT (1997): Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96, 4065-4082

Weil J, Schunkert H (2006): [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin Res Cardiol* 95 Suppl 4, 1-15

Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M (1989): Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 284-291

Whitebread SE, Taylor V, Bottari SP, Kamber B, de Gasparo M (1991): Radioiodinated CGP 42112A: a novel high affinity and highly selective ligand for the characterization of angiotensin AT₂ receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1365-1371

Williams AJ, West DJ, Sitsapesan R (2001): Light at the end of the Ca²⁺-release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Q Rev Biophys* 34, 61-104

Wright JW, Harding JW (1994): Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 21-53

Zuern C, Heimrich J, Kaufmann R, Richter KK, Settmacher U, Wanner C, Galle J, Seibold S (2010): Down-regulation of MTUS1 in human colon tumors. *Oncol Rep* 23, 183-189

Zuern C, Krenacs L, Starke S, Heimrich J, Palmetshofer A, Holtmann B, Sendtner M, Fischer T, Galle J, Wanner C et al. (2012): Microtubule associated tumor suppressor 1 deficient mice develop spontaneous heart hypertrophy and SLE-like lymphoproliferative disease. *Int J Oncol* 40, 1079-1088

Danksagung

In erster Linie will ich meinem Betreuer und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. L. S. Maier für die Überlassung meines interessanten Dissertationsthemas und für die permanente Unterstützung vor, während und nach der Verfassung meiner Dissertationsschrift danken. So war es mir möglich, einen Einblick in die kardiologische Grundlagenforschung zu gewinnen. Die Arbeit, vor allem während der experimentellen Phase meiner Dissertation, hat mich gelehrt, wissenschaftlich, genau und zielorientiert zu arbeiten. Mein Dank gilt ebenfalls dem komplettem Laborteam von Prof. Dr. med. L. S. Maier, allen voran Dr. med. A. Rokita, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Ich wurde am 20.02.1985 in Pforzheim geboren. Danach besuchte ich die Grundschule in Nördlingen bis zur dritten Klasse. Nachdem wir nach Schriesheim umgezogen waren, besuchte ich dort weiterhin die Grundschule und anschließend das Kurpfalz-Gymnasium. 2004 absolvierte ich dort mein Abitur. Danach war ich als Zivildienstleistender in der Kopfklinik Heidelberg tätig, wo ich überwiegend im Zentral-OP eingesetzt war. Nach dem Zivildienst begann ich 2005 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Jahr 2009 nahm ich bei Herrn Prof. Dr. med. L. S. Maier die experimentelle Arbeit an meiner Dissertation auf. 2010 absolvierte ich ein klinisches Semester in Berlin im Rahmen der Ausbildungskooperation zwischen der Universität Göttingen und den HELIOS Kliniken Berlin. Ich beendete im Jahr 2012 mein Studium mit der Approbation zum Arzt. Meine praktischen Erfahrungen gewann ich in zahlreichen Famulaturen und während des Praktischen Jahres im Bereich der Inneren Medizin, der Chirurgie, der Neurologie und der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Hier war ich zwischenzeitlich tätig in Berlin, in der Schweiz und in Florenz im Rahmen des europäischen Austauschprogrammes ERASMUS. Während des Studiums und auch während meiner praktischen Arbeit als Student interessierte ich mich sehr für die Innere Medizin. So begann ich nach Studiumsende meine Arbeit als Assistenzarzt der Inneren Medizin in Weinheim, wo ich bis heute tätig bin. Mein Interesse gilt hier allen Bereichen der Inneren Medizin sowie der Notfall- und Intensivmedizin, so dass mein primäres Ziel zunächst der Facharzt für Innere Medizin ist.