

# **Einfluss von intrazellulärer Radikalbildung auf die Kontraktionsfähigkeit adulter Herzmuskelzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des  
Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Solaiman Mufti**

aus Kabul

Gießen, 2008

**Aus dem Physiologischen Institut  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Professor Dr. Dr. H. M. Piper**

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hölschermann

Tag der Disputation: 20.04.2009

Meinen Lieblingmenschen Susan, Diana  
und Wasse Mufti und Agatha Giemsa gewidmet

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Definition der Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Klinische Relevanz .....	1
1.3 Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz .....	2
1.4 Einteilung und Klassifikation.....	2
1.5 Ätiologie und Pathophysiologie .....	4
1.6 Rolle des Renin-Angiotensin-Systems aus pathophysiologischer Sicht .....	4
1.7 Angiotensin II als Effektormolekül beim RAS .....	5
1.8 Folgen erhöhter Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta_1$ .....	7
1.9 Ursache der Hypertrophie .....	7
1.10 Signalwege der myokardialen Hypertrophie.....	8
1.11 Effekte des Angiotensin II im kardiovaskulären System.....	9
1.12 Rolle von Schlüsselenzymen wie NFAT und SERCA bei der Signaltransduktion.....	10
1.13 Prognose der Herzinsuffizienz .....	10
1.14 Aufgabenstellung dieser Arbeit .....	12
<b>2 Material</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Chemikalien.....	13
2.1.2 Spezielle Chemikalien .....	13
2.2 Zusammensetzung verwendeter Medien und Puffer.....	14
2.2.1 Zellkultur.....	14
2.2.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation .....	14
2.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände .....	15
2.3.1 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellkontraktion .....	16
2.3.2 Verbrauchsmaterialien .....	16
2.3.3 Sonstige Geräte .....	16
2.3.4 Software .....	17
<b>2.4 Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.4.1 Isolierung von Herzmuskelzellen.....	18
2.4.2 Versuchstiere .....	18

2.4.3 Präparation von isolierten Myokardzellen adulter Ratten.....	18
2.4.2 Zellkultur.....	19
2.5 Messung im elektrischen Feld.....	19
2.5.1 Messung der Kontraktionsparameter .....	20
2.5.2 Messprotokoll .....	23
2.5.3 Statistik.....	23
2.6 Festlegung der Konzentration verwendeter Pharmaka .....	24
2.7 Immunochemische Charakterisierung.....	24
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
3.1 Charakteristika und Reproduzierbarkeit des Ang II Effektes auf die kontraktile Empfindlichkeit .....	25
3.2 Ang II-abhängige Effekte auf die kardiale Funktion sind TGF- $\beta_1$ -abhängig .....	31
3.3 Effekt des Ang II auf die NFAT Aktivierung und die SERCA Expression .....	36
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1 Ziel der Arbeit .....	45
4.2 Die Rolle des Ang-II bei den intrazellulären Mechanismen der Kardiomyozytenkontraktion.....	45
4.3 Möglichkeiten des angewendeten Versuchmodells .....	45
4.4 Die Wirkung des Zytokins TGF- $\beta_1$ auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene.....	46
4.5 Einfluß der NAD(P)H-Oxidase Aktivierungsantagonisten .....	46
4.6 Diskussion des angewendeten Versuchmodells .....	47
4.7 Diskussion der experimentell induzierten Verminderung der Zellfunktion durch Ang II/ TGF- $\beta_1$ .....	47
4.8 Einfluß der Temperatur auf den Ang II-abhängigen Effekt.....	48
4.9 Kompensation der Zellfunktionminderung durch gesteigerte Ausschüttung der SERCA und die Rolle des NFAT bei diesem Mechanismus .....	49
4.10 Schlussfolgerung.....	50
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>53</b>

---

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>66</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>67</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere, Einheit der elektrischen Stromstärke
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	demineralisiertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheiten
IU	Internationale Einheit
Kg	Kilogramm
L	Liter
M	Mol, Einheit der Stoffmenge
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
NAC	N-Acetylcystein
nm	Nanometer
nM	Nanomolar

---

PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
U	Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
xg	x-fache Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Effekt von Ang II auf die Zellverkürzung.....	25
Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Verminderung der Zellverkürzung durch Ang II.....	26
Abbildung 3: Veränderung von Kontraktionsparameter unter Ang II Einfluß.....	27
Abbildung 4: Eigeneffekt der Temperatur auf die Zellverkürzung .....	30
Abbildung 5: Effekt des Cervastatin auf die Zellverkürzung.....	31
Abbildung 6: Effekt des SB202190 (SB) auf die Zellverkürzung .....	32
Abbildung 7: Effekte des Überstandmediums mit Ang II inkubierten Mediums.....	34
Abbildung 8: Isoliertes Immunglobulin G und zusammen mit TGF- $\beta_1$ .....	35
Abbildung 9: Isoliertes Aprotinin und zusammen mit Ang II .....	36
Abbildung 10: Effekt des Phenylephrin auf SERCA Expression. ....	37
Abbildung 11: Konzentrationsabhängiger Effekt des GSK-3 $\beta$ Inhibitor auf die Zellverkürzung.....	39
Abbildung 12: Einfluss von GSK-3 $\beta$ -Inhibitor auf das Kontraktionsverhalten .....	40
Abbildung 13: NFAT Expression in den Nukleolen .....	41
Abbildung 14: Einfluß des GSK-3 $\beta$ Inhibitors auf die Zellverkürzung bei Ang II-inhibierten Zellen.....	42
Abbildung 15: SERCA Ausschüttung in GSK-3 $\beta$ Inhibitor exponierten Kardiomyozyten .....	44
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Ang II Signaltransduktion .....	51

## 1. Einleitung

Aufgrund der veränderten Altersstrukturen unserer Bevölkerung und durch medizinischen Fortschritt bei Infektionskrankheiten ist die Inzidenz von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in letzten Jahren deutlich gestiegen. Trotz optimaler Therapie sind Mortalität und Morbidität der Herzinsuffizienz weiterhin relativ hoch (Levy D et al., 2002; Lloyd-Jones DM et al., 2002). Durch diese sich stetig bestätigende Feststellung, ergibt sich die Notwendigkeit einer frühen, sicheren Erkennung derjenigen Patienten, die von therapeutischen und/ oder präventiven Maßnahmen profitieren.

### **1.1 Definition**

Pathophysiologisch ist die Herzinsuffizienz definiert als das Unvermögen des Herzens, bei normalen Füllungsdrücken die Körperperipherie ausreichend mit Blut – Sauerstoff und Substraten – zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel in Ruhe oder bei Belastung sicherzustellen.

### **1.2 Klinische Relevanz**

Die Anzahl jährlicher Neuerkrankungen liegt bei 2 bis 12/1 000 (Lloyd-Jones DM et al., 2002; Roger VL et al., 2004). Aufgrund dieser Tatsache ist die Herzinsuffizienz einer der häufigsten internistischen Erkrankungen; mehr als ein Prozent der Bevölkerung westlicher Länder leiden an einer chronischen Herzinsuffizienz. Dabei scheint das Geschlecht eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies belegen die Zahlen bezüglich des Lebenszeitrisko eine Herzinsuffizienz zu erwerben, welche für Frauen und Männer über 40 Jahre etwa gleich sind und bei durchschnittlich 20 Prozent liegen (Lloyd-Jones DM et al., 2002). Diese aktuellen Daten der Framingham-Heart-Studie bestätigen auch die zentrale Bedeutung von Hypertonie und Myokardinfarkt, die drei Viertel des populationsbezogenen Herzinsuffizienzrisikos ausmachen (Yusuf S et al., 2002).

### **1.3 Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz**

Es hat sich gezeigt, dass die Herzinsuffizienz deutlich vom Lebensalter abhängt. In der Gruppe der 45- bis 55-Jährigen leiden weniger als ein Prozent an Herzinsuffizienz, jedoch bereits zwei bis fünf Prozent der 65- bis 75-Jährigen und etwa zehn Prozent der über 80-Jährigen (Hoppe UC et al., 2001). Auf den klinischen Schweregrad bezogen zeigen 0,2 Prozent der Bevölkerung mit 40 und mehr Lebensjahren schwerste Herzinsuffizienz bei eingeschränkter Ventrikelleistung, etwa zwei Prozent Herzinsuffizienz aller Schweregrade, etwa 1/5 zeigen Hochrisikokonstellation mit Hypertonie oder erlittenem Myokardinfarkt und mehr als 40 Prozent Hochrisikokonstellation und Übergewicht (Yusuf S et al., 2002).

### **1.4 Einteilung und Klassifikation**

Unverändert gültig und klinisch relevant ist die funktionelle Einteilung der Herzinsuffizienz nach den Kriterien der New York Heart Association (NYHA) (Goldman L et al., 1981; Hoppe UC et al., 2001). Die funktionelle Klassifikation der Herzinsuffizienz nach NYHA-Stadien sieht folgendermaßen aus:

- I Herzerkrankung ohne Symptomatik
  
- II Herzerkrankung mit Beschwerden bei stärkerer Alltagsbelastung
  
- III Herzerkrankung mit Beschwerden bei leichter Alltagsbelastung
  
- IV Herzerkrankung mit Beschwerden bereits in Ruhe

Basierend auf aktuellen Konzepten zur Pathogenese und der weiteren Progression der Herzinsuffizienz, basierend aber auch auf Risikokonstellationen im Vorfeld der manifesten Erkrankung, erfolgte ebenfalls eine aktuelle Stadieneinteilung der American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) (Hunt SA et al., 2001) :

**A** Patienten mit Risikokonstellation für spätere Herzinsuffizienz; keine erkennbaren strukturellen oder funktionellen Abnormalitäten; keine Herzinsuffizienzzeichen

**Beispiele:** Arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, kardiotoxische Substanzen oder Alkoholabusus, rheumatisches Fieber, familiäre Disposition

**B** Patienten mit struktureller Herzerkrankung aber ohne Herzinsuffizienzsymptomatik

**Beispiele:** Linksventrikuläre Hypertrophie oder -fibrose, linksventrikuläre Dilatation oder Hypokontraktibilität, asymptomatischer Herzklappenfehler, früherer Myokardinfarkt

**C** Patienten mit aktueller oder früherer Herzinsuffizienzsymptomatik mit struktureller Herzerkrankung

**Beispiele:** Dyspnoe, Erschöpfung bei systolischer Dysfunktion; asymptomatischer Patient unter Herzinsuffizienztherapie

**D** Patienten mit fortgeschrittener struktureller Herzerkrankung und mit deutlicher Herzinsuffizienzsymptomatik in Ruhe trotz maximaler medikamentöser Therapie

**Beispiele:** Gehäufte Hospitalisierung, Indikation zur Herztransplantation, „Bridging“ beziehungsweise „Assist-Devices“; präfinale Konstellation

### **1.5 Ätiologie und Pathophysiologie**

Zunächst kommt es zu einer kardialen Dysfunktion der Pumpleistung; nachfolgend kommt es zu neurohumoralen Anpassungsvorgängen, wie der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, des sympathischen Nervensystems, verschiedener Zytokine wie das TGF- $\beta_1$ , vasoaktiver Substanzen und anderen mehr (u. a. Anand IS et al., 2003; Benedict CR et al., 1994; Cohn JN et al., 1984; Dzau VJ et al., 1987; Francis et al., 1984; Sigurdsson A et al., 1994). Daraus resultieren periphere Vasokonstriktion, erhöhte myokardiale Inotropie und Chronotropie. Gleichzeitig beobachtet man eine erhöhtes extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen mit erhöhter enddiastolischer Vordehnung des Herzens (Frank-Starling-Mechanismus) mit dem Ziel, die Perfusion lebenswichtiger Organe zu sichern. Ebenfalls mögliche maladaptive Folgen sind ansteigende Kapillardrucke mit der Konsequenz pulmonaler Stauung und peripherer Ödeme, zunehmende Herzbelastung (afterload) durch erhöhten peripheren Widerstand, Arrhythmieeigung, Verschlechterung der koronaren Ischämie durch Katecholamineffekte auf Kontraktilität und Herzfrequenz, Förderung des Zelltodes von Myozyten durch Angiotensin II und Katecholamine sowie pathologischen Umbau (remodeling) des Myokards (Communal C et al., 1998; Dzau VJ et al., 1987; Hoppe UC et al., 2001; Tan LB et al., 1991).

### **1.6 Die besondere Rolle des Renin-Angiotensin-Systems aus pathophysiologischer Sicht**

Eine besondere Funktion bei pathophysiologischen Vorgängen scheint das Renin-Angiotensin-System (RAS) einzunehmen. Das RAS spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z. B. bei der Hypertonie, der koronaren Herzkrankheit (KHK), oder der ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie (Griendling et al., 1993), sowie in der Genese von renalen Erkrankungen, wie z. B. der diabetischen Nephropathie (Gavras et al., 1993), der Glomerulosklerose (Lassegue et al., 1994; Wolf et al., 1996), der interstitiellen Fibrose (Edigo et al., 1996; Johnson et al., 1992), oder des Cyclosporinschadens (Pichler et al., 1995). Die wichtigsten Wirkungen des RAS, wie z.B. Vasokonstriktion, Proliferation und Migration verschiedener Zelltypen, prokoagulatorische/antifibrinolytische Effekte und die Förderung der adrenergen Neurotransmission können durch Ang II-Aktivierung, durch Bradykinin-Hemmung, oder

durch eine Kombination beider Mechanismen erklärt werden (Dzau et al., 1994; Morishita et al., 1992; Lüscher et al., 1993).

### **1.7 Ang II als Effektormolekül beim RAS**

Man unterscheidet zwischen einem zirkulierenden und einem gewebeständigen RAS. Im zirkulierenden RAS wird Angiotensinogen in der Leber produziert und durch Plasma-Renin in Angiotensin I (Ang I) übergeführt. Stimuli für die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen sind u.a. die Reduktion des renalen Perfusionsdruckes, die Verminderung des Natriumchloridtransportes zum distalen Tubulus sowie ein erhöhter Sympathikotonus (Parmley et al., 1989). Ang I wird durch die Einwirkung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) zu Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Das Effektormolekül Ang II entfaltet dann seine Wirkungen über die Vermittlung von spezifischen Ang II-Rezeptoren, von denen bislang die Ang II-Rezeptoren Typ-1 (AT1-Rezeptor) und Typ-2 (AT2-Rezeptor) am besten charakterisiert sind (Bernstein et al., 1993; Timmermanns et al., 1993). Die unterschiedlichen Rezeptoren können von synthetischen Liganden gebunden und blockiert werden.

Bei fortschreitender hämodynamischer Überlastung des Herzens wird das Renin-Angiotensin-System (RAS) und damit sein Effektormolekül Angiotensin II (Ang II) aktiviert. Alle „klassischen“ Ang II Effekte (wie z. B.: Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, renale Natriumabsorption und kardiovaskuläre Hypertrophie) werden heute dem AT1-Rezeptor zugeschrieben (Dzau et al., 1993; Braam et al., 1996). Der AT1-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren, hat 7 Transmembransegmente und hat ein Molekulargewicht von 65 kD. Das kodierende Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 3 (Helin et al., 1997).

Über die Bedeutung des AT2-Rezeptors liegen erst wenige Erkenntnisse vor, obwohl ungefähr 2/3 aller Ang II-Rezeptoren im gesunden und insuffizienten Myokard AT2-Rezeptoren sind (Nozawa et al., 1994). In der Niere sind mehr als 90 % aller Rezeptoren vom AT1-Typ (Wolf et al., 1996). Das codierende Gen liegt beim Menschen auf dem X-Chromosom und die Homologie zum AT1-Rezeptor beträgt 34 % (Helin et al., 1997). AT2-Rezeptoren vermitteln die druckinduzierte Natriurese in einem Rattenmodell (Lo Met al., 1995) sowie die Induktion des Chemokines RANTES in glomerulären Endothelzellen *in vivo* und in ganzen Glomeruli *in vivo* (Wolf et al., 1996). Zusätzlich wurden AT2-Rezeptormedierte antiproliferative Effekte auf Koronarendothelzellen (Stoll et al., 1995), eine Hemmung der

Angiogenese und Vasodilatation bei der Ratte (Munzenmaier et al., 1996), sowie die Induktion von Apoptose (Yamada et al., 1996) beschrieben. Das Proteinprodukt vom c-mas Onkogen, ursprünglich für einen Ang-II Rezeptor gehalten, interferiert am ehesten mit der Ang-II assoziierten Signaltransduktion und ist wahrscheinlich kein eigener Rezeptor (Wolf et al., 1996). Ein aus der Ratte geklonter neuer Rezeptor, welcher keine Homologien zu AT1 und AT2-Rezeptoren hat, besitzt Bindungsdomänen sowohl für Ang II als auch für Vasopressin und wird in der Niere exprimiert (Ruiz-Opazo et al., 1995). Es gibt auch vermehrt Hinweise für einen spezifischen AT4-Rezeptor (Dulin et al., 1995). Andere Effektoren des RAS Ang II ist nicht das einzige aktive Peptid des RAS: Mehrere Ang II Spaltprodukte wie z. B.: Ang III, Ang IV und Ang II (1–7), sind ebenfalls biologisch aktiv (Ardaillou et al., 1997). Ang III hat ähnliche Eigenschaften wie Ang II, bindet auch an die gleichen Rezeptoren und scheint eine wichtige Rolle in der Gehirnphysiologie zu spielen (Ardaillou et al., 1997). Ang IV verfügt im Gegensatz dazu über eigene AT4-Rezeptoren und stimuliert die Synthese des Plasminogenaktivator-Inhibitors Typ-1 (PAI-1) sowie die renale und zerebrale Vasodilatation (Ardaillou et al., 1997).

Die Rolle von Ang IV in der vaskulären, renalen und zerebralen Vasodilatation ist noch nicht genau bekannt. Ang II (1–7) induziert die Bildung von NO (EDRF) und vasodilatatorischen Prostaglandinen und steigert die glomeruläre Filtrationsrate, die renale Harnproduktion, sowie die renale Natriumexkretion (Ardaillou et al., 1997). Intrakardiales RAS Ang II kann im menschlichen Myokard auch unter Umgehung der ACE-Wirkung aus Ang I entstehen, beispielsweise durch das Enzym Chymase (Urata et al., 1993). Andere mögliche Stimulatoren der Ang II-Generierung aus Ang I sind das „chymostatinsensitive Ang II-generating enzyme“ (CAGE) (Urata et al., 1995), welches der Chymase sehr ähnlich ist, und Kathepsin G. Ang II kann aber auch direkt aus Angiotensinogen durch die Einwirkung von Gewebeplasminogenaktivator (t-PA), Kathepsin G, Tonin und chymotrypsin- oder trypsinähnlichen Enzymen entstehen (Urata et al., 1995).

Vasokonstriktion durch Ang II wirkt einerseits durch direkte Aktion auf die glatten Muskelzellen und andererseits durch die Freisetzung von Endothelin und Noradrenalin vasokonstriktorisches (Lüscher et al., 1995). Die Zellproliferation und die Freisetzung von Ang II bewirkt über Stimulation von Proto-Onkogenen (c-myc, c-fos, c-jun u.a.m.) und die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren (basic fibroblast growth factor, bFGF; platelet derived growth factor, PDGF; transforming growth factor beta-1, TGF-beta-1) die Proliferation (Hyperplasie) von glatten Muskelzellen und Fibroblasten, sowie die vermehrte Proteinsynthese (Hypertrophie) in Myozyten (Itoh et al., 1993; Gibbons et al., 1992; Koibuchi et al., 1993; Schorb et al., 1993). Die prothrombotische/antifibrinolytische Wirkung

des Ang II erhöht die Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ-1 (PAI-1) in Endothelzellen (Vaughan et al., 1995), glatten Muskelzellen (Van Leeuwen et al., 1994) und *in vivo* (Ridker et al., 1993), und schwächt so das körpereigene System der Fibrinolyse (Nilsson et al., 1985).

Diese kann zur Auslösung akuter koronarer Syndrome (instabile Angina, akuter Myokardinfarkt) führen, aber auch klinisch stumm verlaufen (Fuster et al., 1994).

### **1.8 Folgen der erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta_1$**

Ang II wirkt über den AT1-Rezeptor auf Fibroblasten und Myozyten und führt in beiden Zellen zu einer gesteigerten TGF- $\beta_1$ -Expression. TGF- $\beta_1$  wirkt dabei als para- und autokriner Signalfaktor und führt dadurch zusätzlich zu einer vermehrten Einlagerung von Extrazellulärmatrix (EZM) (Rosenkranz, 2004). Durch die Proliferation der Fibroblasten unter dem Einfluss des TGF- $\beta_1$  entsteht eine kardiale Fibrose. Die Myozyten reagieren auf TGF- $\beta_1$  mit einer erhöhten Ansprechbarkeit der  $\beta$ -Adrenozeptoren und einer gesteigerten ANF-Expression, welche eine Hypertrophie der Myozyten zur Folge haben. Diese drei Komponenten (EZM-Einlagerung, Fibrose und Myozytenhypertrophie) ergeben zusammen das Bild einer fortschreitenden kardialen Hypertrophie am Übergang zwischen Kompensation und klinisch manifester Herzinsuffizienz. Dieses ist vor allem durch die gesteigerte Expression von TGF- $\beta_1$  gekennzeichnet (Boluyt et al., 1994)

### **1.9 Ursache der Hypertrophie**

Einer der Haupteffekte der gesteigerten TGF- $\beta_1$  ist die Hypertrophie des Muskelgewebes. Die histopathologische Definition der Hypertrophie ist die Volumenzunahme der Zelle ohne zusätzliche Zellteilung. Die Herzhypertrophie beruht also vor allem auf einer Größenzunahme der Kardiomyozyten, welche früh postnatal ihre Teilungsfähigkeit verlieren und sich daher in einem postmitotischen Status befinden (MacLellan et al., 2000). Im Gegensatz zur entwicklungsbedingten und physiologischen Herzhypertrophie kommt es bei der pathologischen Hypertrophie auch zu einer Vermehrung (Hyperplasie) der



Bindegewebszellen (Fibroblasten) und der extrazellulärer Matrix (Kollagen und Fibronectin) (Ritter et al., 2003). Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist die zelluläre Antwort auf biomechanischen Stress. Eingeleitet wird sie durch endokrine, parakrine und autokrine Faktoren, welche eine Vielzahl von membrangebundenen Rezeptoren aktivieren können. Solche Faktoren, welche auf para- oder endokrinen Wege die kardiale Hypertrophie bedingen können, sind z.B. Ang II (Sadoshima et al., 1993), Katecholamine (Zierhut et al., 1989; Iwaki et al., 1990), Schilddrüsenhormone (Dorr et al., 2005) oder IGF (Ito H et al., 1993). Die Umwandlung der auf die Zelle wirkenden mechanischen Kräfte in biochemische Signale wird zum Großteil über Integrine vermittelt. Integrine sind eine Gruppe von Zelloberflächen-Proteinen, welche die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden und somit die physikalische Integration des intra- und extrazellulären Raumes gewährleisten (Force et al., 2002). Auch wenn die Hypertrophie induzierenden Stimuli überwiegend identifiziert sind und den Hauptangriffspunkt der heutigen pharmakologischen Therapie darstellen, ist die Kontrolle der Herzhypertrophie mit den heutigen Mitteln nicht immer möglich. Daher liegt das Hauptaugenmerk der heutigen Forschung in der Aufdeckung und Beeinflussung der Signaltransduktionswege, die das Wachstumssignal vom Rezeptor in den Zellkern weiterleiten und damit die Genexpression verändern.

### **1.10 Signalwege der myokardialen Hypertrophie**

Für verschiedene Signalwege konnte nachgewiesen werden, dass diese an der hypertrophen Reaktion des Herzens beteiligt sind. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalwege sind eine wichtige Verbindung zwischen den externen Stimuli und dem Zellkern über die Phosphorylierung und Regulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. MAPKs können in drei Subfamilien eingeteilt werden: ERK (extracellular-signalregulated kinase), JNKs (Jun N-terminal kinases) und p38 MAPKs (Frey et al., 2003). MAPK Signalwege werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase Rezeptoren, Proteinkinase C, Calcium oder Stress Stimuli aktiviert (Sugden et al., 1999; Yamazaki et al., 1995). Nachgeschaltet erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von Kinasen, welche schließlich in der Phosphorylierung und Aktivierung der drei terminalen MAPKinasen (ERK, JNK, p38) münden. Diese können wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren und damit die Transkription von Genen, die z.B. bei der Hypertrophie hochreguliert werden, induzieren (Garrington et al, 1999; Hefti et al. 1997).

### **1.11 Effekte des Ang II im kardiovaskulären System**

Ang II ist an Prozessen der myokardialen Hypertrophie, Fibrose und Apoptose als Antwort auf Überdruckbelastung beteiligt. Verschiedene Arbeiten haben übereinstimmend die Rolle des Ang II beim Ablauf der Entstehung von Herzdefekten *in vitro* und *in vivo* aufgezeigt (Pfeffer and Pfeffer, 1988; The SOLVD investigators, 1991). Jedoch induziert Ang II nicht direkt hypertrophes Wachstum in adulten Kardiomyozyten von verschiedenen Spezies (Fuller et al., 1990; Wada et al., 1996; Ruf et al., 2002).

Ähnliche Folgerungen wurden auch aus Versuchen an transgenen Mäusen gemacht. Es wurde nämlich festgestellt, dass zwar der Ablauf von Herzerkrankungen bei Überdruckbelastung von Ang II abhängt, jedoch nicht die Induktion der kardialen Hypertrophie (Hamawaki et al., 1998; Harade et al., 1998; Grieve et al., 2006). Deshalb scheinen die Effekte des Ang II auf Kardiomyozyten bedeutender zu sein, als auf die kardialen Wachstumsvorgänge.

Um den Effekt von Ang II auf die Funktion von Kardiomyozyten zu untersuchen haben verschiedene Arbeitsgruppen überprüft, ob Ang II die Zellverkürzung der Kardiomyozyten beeinflusst. Jedoch haben die Ergebnisse kein einheitliches Bild wiedergeben können.

Als eine akute Antwort der Kardiomyozyten auf Ang II fanden die Autoren (Sakurai et al., 2002) eine negative kontraktile Antwort. Andere berichten von einer direkten positiven inotropen Antwort bei isolierten Herzpräparaten von Hunden, Katzen, Kaninchen und Rindern (Kobayashi et al., 1978; Cingolani et al., 2000; Scott et al., 1992; Kass et al., 1980). In humanen ventrikulären Myozyten wurden keine oder gar positive inotrope Effekte gefunden (Holubarsch et al., 1993; Moravec et al., 1990). Negative, positive, und nicht inotrope Effekte an adulten Rattenherzen wurden von einer Arbeitsgruppe (Wikman-Coffelt et al., 1991; Neyses and Vetter, 1989; Diggrell, 1989; Meissner et al., 1998) auch festgestellt.

Ang II Effekte haben Gemeinsamkeiten mit der  $\alpha$ - Adrenorezeptoren Stimulation. So sind zum Beispiel beide Agonisten in der Lage den PLC- abhängigen Signalweg zu aktivieren. Jedoch induziert Ang II im Gegensatz zur  $\alpha$ -Adrenorezeptoren Stimulation die ROS Formation und aktiviert genauso spannungsabhängige Signalwege. Die elementare Grundlage für diese beiden durch Ang II hervorgerufenen Reizantworten ist die Aktivierung von G $\alpha$ q und/oder G $\alpha$  12/13 gekoppelter Rezeptoren. Die Ang II abhängige ROS Formation in Kardiomyozyten induziert die Expression von TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (Schröder et al., 2006; Wenzel et al., 2001; Taimor et al., 2001).

### **1.12 Rolle anderer Schlüsselenzyme, wie NFAT und SERCA2 bei der Signaltransduktion**

Um den Ang II-Effekt möglichst an eine Situation mit chronischer Überdruckbelastung besser zu imitieren, müssen Kardiomyozyten für eine längere Zeit Ang II ausgesetzt sein. Da die manifeste Bioaktivität in Zellkulturen 8 Minuten ist, und irgendeiner Ang II-abhängiger Effekt 24 Stunden später ist, muss die Konsequenz sein, dass die intrazelluläre Signaltransduktion die kurzlebige Rezeptoraktivität in einen langandauernden Effekt transferiert. Während dieser Zeit kann durch eine Rezeptorstimulation eine verstärkte Expression von Schlüsselenzymen resultieren, die in Calciumstoffwechselwege eingreifen und so modulierend auf die kontraktile Antwort wirken können. So haben wir als Beispiel enzymatische Reaktion gezeigt, dass eine  $\alpha$ -Adrenorezeptoren Stimulation notwendig ist um SERCA2A mRNA Expression innerhalb von 4 Stunden und SERCA2A Proteine innerhalb von 24 Stunden zu steigern (Anwar et al., 2005). Es wurde festgestellt, dass dieser Effekt der  $\alpha$ -Adrenorezeptoren Stimulation NFAT abhängig war. In ähnlicher Weise ist die SERCA Expression bei höherer Beanspruchung verstärkt und durch eine NFAT-abhängigen Signalkaskade vermittelt (Kögler et al., 2006). Bezüglich der Veränderung der SERCA Expression haben wir festgestellt, dass der, durch Phenylephrine, negative kontraktile Effekt sich bei höherer Schlagfrequenz normalisierte (Anwar et al., 2005). Die SERCA Aktivität ist bei höheren Schlagfrequenzen bedeutender, wobei die SERCA Expression an eine physiologische positive Druck-Frequenz-Beziehung gekoppelt ist (reviewed in Periasamy and Huke, 2001).

### **1.13 Prognose der Herzinsuffizienz**

Zusammenfassend ist die chronische Herzinsuffizienz gekennzeichnet durch ein Zusammenspiel von hämodynamisch sinnvoller Kompensationsmechanismen, die jedoch zu einer progredienten Dysfunktion struktureller wie funktioneller Eigenschaften des Herzens führen und damit zur weiteren Voranschreiten der Erkrankung beitragen.

Prinzipiell können der chronischen Herzinsuffizienz Herzmuskelschädigungen durch Verlust von myokardialen Gewebe beziehungsweise Myozyten, Druck- und Volumenüberlastungen zugrunde liegen; ebenso können dies Erkrankungen des Perikards, der Herzklappen oder der großen Gefäße sein.

Statistisch ist die Zahl der Todesfälle, die auf Herzinsuffizienz zurückgeführt werden kann, seit 1970 um den Faktor 3 bis 4 gestiegen. Mehr als 90 Prozent treten bei Patienten über 65 Jahren auf (Hoppe et al., 2001; Levy et al., 2002). Dies verhält sich zunächst diametral zu Berichten rückläufiger Koronar- beziehungsweise Hospital-Mortalität (Baker et al., 2003; Polanczyk et al., 2000), sind jedoch auch Ausdruck der zwischenzeitlich erheblich verbesserten Diagnostik und Therapie mit Verschiebung vorzeitiger Mortalität.

Diese Vermutung bestätigt auch die Framingham-Studie, welche tatsächlich eine Sterblichkeitsabnahme nach Auftreten von Herzinsuffizienz festgestellt hat (Levy et al., 2002). So ging die 1- beziehungsweise 5-Jahres-Mortalität für Männer von 30 und 70 Prozent (im Zeitraum 1950 bis 1969) auf 28 und 59 Prozent (1990 bis 1999), die für Frauen von 28 und 57 Prozent (1950 bis 1969) auf 24 Prozent und 45 Prozent (1990 bis 1999) zurück (Levy et al. 2002). Entsprechend früheren Berichten war die Sterblichkeit bei Männern höher als bei Frauen (Ho et al., 1993; Hoppe et al., 2001; Levy et al. 2002). Generell verschlechtert sich die Prognose mit zunehmender kardialer Funktionseinschränkung, ist jedoch beeinflussbar durch therapeutische Maßnahmen. Studienergebnisse wiesen für Patienten mit NYHA-Stadien II und III unter Therapie mit ACE-Hemmern eine 1-Jahres-Mortalität von 9 bis 12 Prozent aus gegenüber 52 Prozent bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ohne diesbezügliche Therapie (Cohn et al., 1991; Hoppe et al., 2001; The CONSENSUS Trial Study Group, 1987; The SOLVD Investigators, 1991). Patienten mit systolischer Dysfunktion haben eine schlechtere Prognose als die mit diastolischer Dysfunktion bei jährlicher Sterblichkeit von 15 bis 19 Prozent versus 8 bis 9 Prozent (Gottdiener et al., 2002; Vasan et al., 1999).

### **1.14 Aufgabenstellung dieser Arbeit**

Die Intention dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob Ang II in ähnlicher Weise eine Zellverkürzung bei Kardiomyozyten bewirkt wie eine  $\alpha$ -Adrenorezeptoren Stimulation oder es doch Veränderungen der Zellverkürzung hervorruft, verknüpft mit dem differentiellen Wege der Induktion des TGF- $\beta_1$ . In letzterem Falle wollten wir ebenfalls wissen, ob die Zellverkürzung durch verstärkte Expression der SERCA via NFAT Aktivierung zu einer Verbesserung führen würde. Um die neuen Ergebnisse mit den früheren vergleichen zu können, wurden Ang II Effekte auf die Zellverkürzung nach 24 Stunden untersucht.

## 2. Material

### 2.1.1 Chemikalien

Angiotensin-II	Sigma, Taufkirchen
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Dextran	Sigma, Taufkirchen
DTE	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
KCN	Sigma, Taufkirchen
Medium 199	Biochrom, Berlin
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.2. Spezielle Chemikalien

g-CSF	Sigma, Taufkirchen
L-NA	Sigma, Taufkirchen
GSK-i	Calbiochem, Bad Soden
SB 212090	Calbiochem, Bad Soden

## 2.2 Zusammensetzung verwendeter Medien und Puffer

### 2.2.1 Zellkultur

- Medium 199 Earl`s Salts                    9,8 g/l
  
- **CCT-Kulturmedium**

Medium 199 Hepes gepuffert	x ml
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid	100 Mol/l
  
- **Powell-Medium**

NaCl	110 mMol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25 mMol/l
Glucose	11 mMol/l
KCL	2,6 mMol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mMol/l
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mMol/l
  
- **M199/HEPES**

HEPES	15 mMol/l
-------	-----------

auf pH 7,4, titriert und sterifiltriert

### 2.2.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation

- **Calcium-Stammlösung**

CaCl <sub>2</sub>	100 mMol/l
-------------------	------------
  
- **Collagenase-Puffer**

Powell-Medium	40 ml
Collagenase	25 mg
Calciumchlorid-Stammlösung	12,5 $\mu$ l

- **Gradienten-Lösung**

Powell-Medium	x ml
Albumin	4% (wt/vol)
CaCl <sub>2</sub>	1 mMol/l

### Vor- und Ausplattieren

- **Vorinkubationsmedium**

Medium 199 HEPES gepuffert	x ml
FCS	4% (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

- **Ausplattiermedium**

Medium 199 HEPES gepuffert	100 ml
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Penicillin	100 IU / ml
Streptomycin	100 g/ml

## 2.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände

### Zellkultur

Brutschrank	Kendro, Hanau
Gewebehacker	Harvard Scientific, Holliston, MA, USA
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes
Mikroskop TMS-F	TMS-F von Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Primaria Falcon (Typ 3803)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
50 ml Röhren (Falcon 2070)	Becton Dickinson, Heidelberg



### **2.3.1 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellkontraktion**

Interface INT 4	Scientific Instrumenths GmbH, Heidelberg
Lichtmikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Japan
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Japan
Stimulator	Physiologisches Labor der Justus-Liebig-Universität Giessen

### **2.3.2 Verbrauchsmaterialien**

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterifilter (0,2µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser	Sigma, Taufkirchen
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

### **2.3.3 Sonstige Geräte**

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Glasrührer	Schott, Mainz
Küvetten	Bio-Rad, München
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

**2.3.4 Software**

Excel

Microsoft

Mucell

Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

Image-Quant

Molekular Dynamica, Krefeld

SPSS

SAS Software-Version 6.11

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

#### **2.4.2 Versuchstiere**

Die Myozyten wurden aus den adulten männlichen Wistar-Ratten (Lebendgewicht 200-300 g) isoliert. Die etwa 12 Wochen alten Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Nahrung (Standard-Futter Altromin) und Wasser.

#### **2.4.3 Präparation von isolierten Myokardzellen adulter Ratten**

Zunächst wurden die Ratten mittels Diethyläther narkotisiert und durch einen Genickbruch getötet. Der Thorax der Versuchstiere wurde eröffnet und mediastinale Strukturen dargestellt, so dass Herz, Lunge und Aorta angehoben und freipräpariert werden konnten. Anschließend wurden sowohl Lunge als auch Herz mit einer Schere abgetrennt und in eine bereitstehende Petrischale mit kalter (+4°C) physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dort wurde das dem Herzen noch anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt und die Aorta weiter freipräpariert. Das Herz wurde danach mit der Aorta an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und rezirkulierend perfundiert. Das in dem Herzen verbliebene Blut wurde zunächst mit 40 ml Powell-Medium für 25 Minuten mit 50 ml Collagenasepuffer ausgewaschen. Die Flussrate betrug etwa 2-3 ml/min pro Herz. Vor und während der Perfusion wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Nach Perfusionsende wurden Vorhöfe und Aorta entfernt. Das Gewebe des Ventrikels wurde mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Unter Carbogenbegasung wurde im Collagenaepuffer mit 1% Albumin bei 37°C das Gewebe während eines 15-20 minütigen wiederholten Ansaugens mit einer 10 ml-Pipette weiter aufgetrennt.

Die so entstandene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur durch ein Nylonnetz (200 µm Porengröße) filtriert, um die verbliebene Gewebsanteile abzutrennen. Das Filtrat wurde anschließend bei 25 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Durch diese Prozedur wurden störende Gewebebestandteile wie zerfallene Zellen und kleinere Zellen (wie z.B. Endothelzellen) von den intakten und eumorphen Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde mit Powell-Medium, welches 200 mMol/l CaCl<sub>2</sub> enthielt, aufgenommen und nochmals bei 25 g für zwei Minuten zentrifugiert. Zur beschleunigten Sedimentation wurde erneut bei 300 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Dabei wanderten Aggregate aus vorwiegend intakten Zellen auf den Boden der

Reagenzgläser und bilden dort ein lockeres Sediment. Dieses Sediment, welches zu ca. 80% aus intakten stabförmigen Zellen bestand, wurde für die Kurzzeitkultur in modifizierten Kulturmedium 199 (CCT Medium) resuspendiert.

#### **2.4.2 Zellkultur**

Die Gewebekulturschalen wurden am Vortag (14-16 Stunden vor der Aufnahme der isolierten Myozyten) mit ca. 1,0-1,5 ml Vorinkubationsmedium (siehe 2.2.2) vorbeschichtet und im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Diese Vorinkubation war für eine erfolgreiche Anheftung der Zellen nach der Präparation notwendig. Kurz vor dem Ausplattieren der präparierten Kardiomyozyten aus den Kulturschalen wurde dieses Medium abgesaugt. Das Zellpellet, welches aus dem letzten Schritt der Präparation hervorgeht wurde mit einer vorgeschriebenen Menge Ausplattiermedium (25 ml pro Herz) aufgenommen. Pro Schale wurde dann 1 ml der Zellsuspension ausplattiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es handelt sich hierbei um eine Kurzzeitkultur, die zu einem rekonvaleszierenden Zustand der Zellen nach der Präparation führen soll. Des Weiteren führte die Kurzzeitkultur dazu, dass die abgerundeten und nicht haftenden Zellen entfernt und die verbleibende Kultur zu ca. 90% intakte stäbchenförmige Myozyten enthielt. Nach dieser Prozedur wurden die verbliebenen Zellen mit verschiedenen Substanzen inkubiert und anschließend Messungen durchgeführt. Es handelte sich stets um Übernachtskulturen (22-24 Stunden).

#### **2.5. Messung der Myozytenkontraktion im elektrischen Feld**

Diese Methode wurde bereits von Schlüter et al. 1997 beschrieben. Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld wurde mit Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Die Gewebekulturschale, mit den inkubierten Zellen wurde auf den Objektivtisch eines Mikroskops mittels einer speziellen Halterung fixiert und mit einem Spezialdeckel verschlossen. Der Deckel hatte vier quadratisch zueinander angeordnete Bohrlöcher. Diese dienten dazu, dass ein Draht vom Elektrostimulator als Kathode angeschlossen werden konnte, in das Medium eintauchen konnte und durch die über die benachbarte Bohröffnung wieder herausgeführt werden konnte. Die beiden anderen Bohrlöcher wurden analog mit einem Draht versehen und im Sinne einer Anode verwendet, so dass letztendlich ein geschlossener Stromkreislauf entstand. Im Kulturmedium lagen durch diese Versuchsanordnung die zwei horizontal verlaufenden Drähte gegenüber.

Zwischen diesen beiden Drähte (Anode und Kathode) entwickelte sich bei elektrischer Stimulation gemäß den Gesetzen klassischer Elektrodynamik ein elektrisches Feld auf. Bringt man einen Myozyten in das Feld ein, so wird auf diesen Körper eine Kraft in Richtung negativer Elektrode ausgeübt. Die Größe der Kraft hängt von der Probeladung  $+Q$  und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Die elektrische Feldstärke ist definiert als Quotient aus der Kraft  $F$  und der Ladung  $Q$ . Die Schreibweise gibt an, dass es sich bei der Kraft  $F$  und der Feldstärke  $E$  um gerichtete Größen, Vektoren, handelt. Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur anschließenden Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Der überwiegende Großteil der Zellen nahm die Frequenzvorgabe an. Diejenigen Zellen, die die Frequenzvorgabe nicht annahmen, wurden bei der Messung der Kontraktionsparameter nicht berücksichtigt. Es war möglich den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorzugeben, indem man die Stimulationsfrequenz veränderte.

### ***2.5.1 Messung der Kontraktionsparameter***

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Während der Stimulation der Zellen in der Kulturschale, befand sich diese auf dem Objektisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war eine Beobachtung der kontrahierenden Zellen möglich. An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Zeilenkamera. Mit ihrer Hilfe war es möglich, Zellgrenzen zu erfassen. Als Zeilenkamera bezeichnet man einen digitalen Kameratyp, der keinen zweidimensionalen Sensor besitzt, sondern nur eine einzelne Sensorzeile. Das Bild entsteht durch die relative Bewegung des Objektes oder des Objektstroms zur Kamera. So können auch bei hohen Geschwindigkeiten der Objekte noch scharfe Bilder aufgenommen werden. Es ist hierbei möglich Bilder mit rechteckigen Pixeln zu erzeugen, indem die Geschwindigkeit des vorbeifahrenden Produktes der Zeilenzeit der Kamera angepasst wird. Im Unterschied zu Matrix- oder Flächenkameras ist die Chipfläche von Zeilenkameras wesentlich kleiner. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit von Verunreinigungen durch Staubpartikel geringer und es können Zeilenkameras mit sehr hohen Auflösungen gefertigt werden. Bildverarbeitende Systeme, die Zeilenkameras nutzen, werden sowohl für Qualitätssicherungsaufgaben wie auch Sortierverfahren eingesetzt. Durch

die Möglichkeit, hohe Objektgeschwindigkeiten zu nutzen, lassen sich sehr hohe Durchsatzraten erzielen.

Bei der anderen Kamera handelte es sich um eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor.

Um eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste diese so positioniert werden, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu musste man die jeweilige Kulturschale so bewegen, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, die Zeilenkamera wurde dann gedreht bis sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5 V/cm geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Dadurch, dass die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm, wurden verschieden starke y-Auslenkungen auf dem Oszillographen dargestellt. Anhand ihrer horizontalen Bewegung konnten die Amplituden der Zellgrenzen dargestellt und identifiziert werden. Dadurch wurde es möglich, die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen zeitgleich zu beobachten, dieser wurde als Zweikanaloszillograph betrieben. Auf dem zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert. Es wurde eine Triggermarke des Interface, der ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes gelegt. Erreichte die ansteigende Spannung des jeweiligen Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), so konnte der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzeichnen. Diese Stelle konnte man am Bildschirm des Oszillographen im zweiten Kanal in Form eines Sprunges der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe erkennen.

Man beobachtete bei der Kontraktion folgendes Phänomen: Bei Veränderung der Amplitudenposition des Zellbildes (im Laufe der Kontraktion), so veränderte sich auch die Position, an der der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sie ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild konnte man beobachten, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Es war damit möglich, die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen zu beobachten. An der anderen Zellkante wurde analog verfahren. Die Informationsdaten der

Interface-Spannungszustände wurden anhand eines Registriergerätes mit einem Computer aufgezeichnet.

Auf diesem war das Programm MUCELL der Firma Scientific Instruments GmbH installiert. Das Programm war in der Lage, aus der Information Spannung aus bzw. an Länge der Zelle zu einem definierten Zeitpunkt zu registrieren. Anhand der registrierten Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit darstellte, dies ergab eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle zeigte. Anhand der jeweils einsetzenden Längenverkürzung erkannte der Computer den jeweiligen Beginn einer Kontraktion.

Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte die folgenden Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion („Time to peak“) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde
6. Die Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke („R90-Wert“)

Aus diesen Parametern wurde als weiterer Parameter errechnet:

Der Quotient  $\Delta L/L$ : Man bilde die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge und dividiere diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. In Prozent ausgedrückt zeigt  $\Delta L/L$  an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.

### **2.5.2 Messprotokoll**

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz je viermal gemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Die auf diese Weise erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden mit dem Programm Excel weiterverarbeitet: Aus diesen jeweiligen vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt.

### **2.5.3 Statistik**

Die Einzelkontraktionen wurden jeweils aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und der Mittelwert aus diesen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen in einem Experiment verglichen, wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA) und anschließend ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Die Varianzanalyse (englisch: **ANALYSIS OF VARIANCE, ANOVA**) ist eine spezifische Form der statistischen Datenanalyse. Sie wurde 1920 von R.A. Fischer für biologische Zwecke entwickelt. Die Varianzanalyse befasst sich mit folgender Problemstellung: Eine Grundgesamtheit wird unter einem bestimmten Gesichtspunkt in k Teilmengen eingeteilt. Zieht man aus jeder Teilmenge je eine Stichprobe, so werden sich im Allgemeinen für ein Merkmal X in jeder Stichprobe ein anderer Mittelwert und eine andere Streuung ergeben. Mit Hilfe der Varianzanalyse lässt sich untersuchen, ob die sich ergebenden Unterschiede zwischen den Stichprobenergebnisse so gering sind, dass sie als zufallsbedingt anzusehen sind, oder ob die Unterschiede mit großer Sicherheit auf Unterschiede zwischen den Teilmengen zurückzuführen sind, aus denen die Stichproben gezogen wurden (Wiedling, „Statistische Verfahren“, 1979). Daten mit  $p < 0,05$  wurden als voneinander statistisch signifikant bezeichnet.



## **2.6 Festlegung der Konzentration verwendeter Pharmaka**

Die Zellen wurden dort wo es angebracht war mit pharmakologischen Agonisten oder Inhibitoren ausgesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der angewandten Substanzen basierten entweder auf der initialen Konzentration-Wirkungskurve wie im Abschnitt Ergebnisse angezeigt (GSK-3 $\beta$ -Inhibitor) oder auf den bisher veröffentlichten Arbeiten: Ang II (Wenzel et al., 2001), SB202190 (Wenzel et al., 2005), TGF- $\beta_1$ -neutralisierende Antikörper (Schlüter et al., 1995), und Aprotinin (Taimor et al., 1999). Es wurde jeweils die Konzentration gewählt, die den höchsten Effekt erzielte. Die Konzentration der Substanzen TGF- $\beta_1$  und Cerivastatin basierte auf noch nicht veröffentlichten Daten einer Gruppe die hier nicht genannt ist aufgrund von verschiedenen Auswertungsmethoden. Der GSK-Inhibitor ist ein phosphoryliertes Peptid, welches als ein spezifischer Substrat-Inhibitor der GSK-3 $\beta$  wirkt. Der Inhibitor wurde in einer zellpermeablen, myristoylierten Form mit Glycin Spacer (Myr-N-GKEAPPAPPQSPN-NH<sub>2</sub>) verwendet. Die höchste effektive Dosis dieses Inhibitors war bei unserer Arbeit (50  $\mu$ M) identisch zu der Angabe eines potenten GSK-3 $\beta$ -Inhibitors in intakten HEK293 Zellen (Plotkin et al., 2003). S-nitroso-acetyl-D, L-penicillamine (SNAP) wurde als NO Donator verwendet, und zwar bei einer Konzentration bei der vorher schon Kardiomyozyten bearbeitet wurden (Langer et al., 2003). Alle Substanzen, die in diesem Kapitel genannt wurden, sind von der Merck KGaA (Darmstadt, Germany) erhalten worden.

## **2.7 Immunochemische Charakterisierung**

Durch Immunblotting wurde auf der Ebene der Proteine SERCA2 Expression festgestellt. Die für das Immunblotting notwendigen Proteinproben wurden, wie Schreckenber *et al.*, 2004 bereits beschrieben haben, präpariert. Unmittelbar kurz nach der Stimulation wurden die Zellen mit einem Lysepuffer (Mischverhältnis: 50 mM Tris-HCl, pH 6.7, 2% (w/v) SDS, 2% (v/v) Mercaptoethanol, und 1 mM Orthovanadate) lysiert. Die Nukleinsäure wurde mit Benzonase angedaut (Merck, Darmstadt, Germany). Die Proteine wurden durch SDS-Elektrophorese unter hohen Lösungsvermögen (Acrylamide/Bisacrylamide 30:1) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese gingen die Proteine durch Halbtrocken-Blotting zu einer nitrozellulose –verstärkte Phase über. Die Platten waren saturiert mit 2 % (w/v) bovinen Albuminserum und für 2 Stunden mit Antikörpern inkubiert. Es wurde ein Antikörper verwendet, der gegen SERCA2 gerichtet war, verwendet (polyclonal antibody C-20, Santa Cruz, USA). Zu Belastungskontrollen wurden die Blots mit einem Aktin-Antikörper (monoclonal anti-actin clone AC-40, Sigma, USA) untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakteristika und Reproduzierbarkeit des Ang II Effektes auf die kontraktilen Empfindlichkeit

Der Effekt des Ang II auf die Zellverkürzung wurde als erstes untersucht. Die Zellen wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Ang II inkubiert. Anschließend wurden die Zellschalen unter ein Mikroskop gestellt, welches mit einer Zeilenkamera verbunden war, wodurch Zellverkürzungen wahrgenommen werden konnten. Eine repräsentative Einzellaufnahme ist in Abbildung 1 dargestellt. Zur Ermittlung einer optimalen Konzentration für die durch Ang II vermittelten Effekte wurde eine Konzentrationswirkungskurve an adulten, isolierten Kardiomyozyten von Ratten erstellt. Die signifikantesten Effekte waren bei einer Konzentration von 100 nM Ang II zu beobachten (s. Abbildung 2A). Um einen maximalen Effekt zu erreichen, wurde Ang II in allen weiteren Versuchen in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Die Ang II (100 nM) exponierten Kardiomyozyten entwickelten eine verminderte Zellverkürzung verglichen mit der Kontrollgruppe.

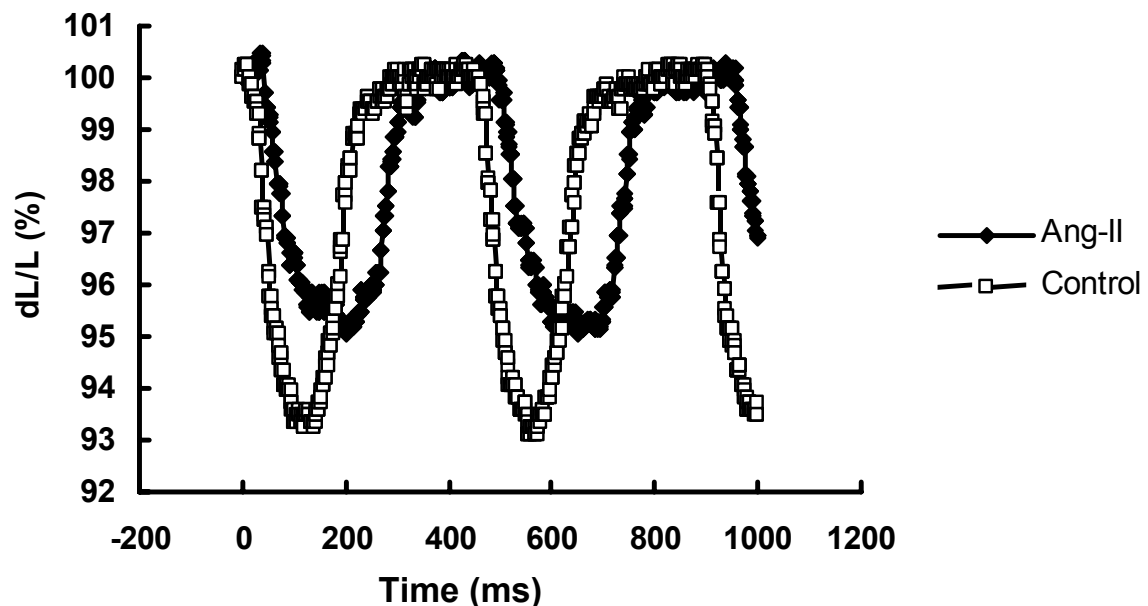
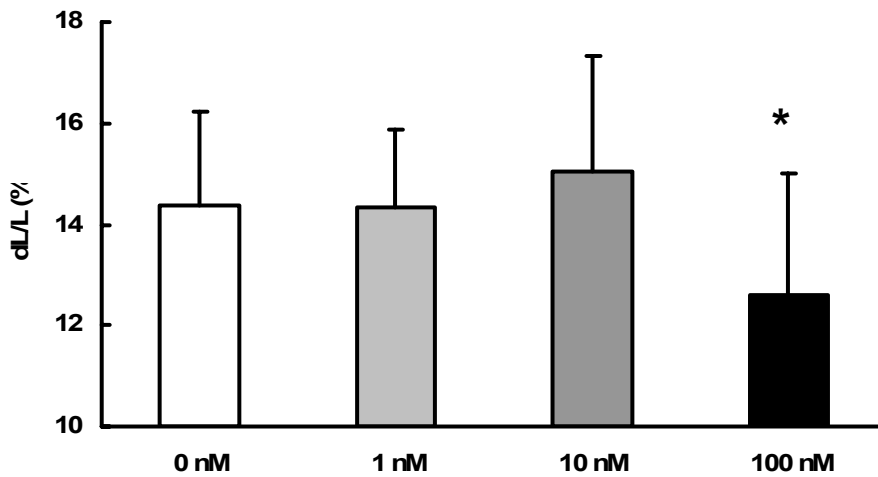
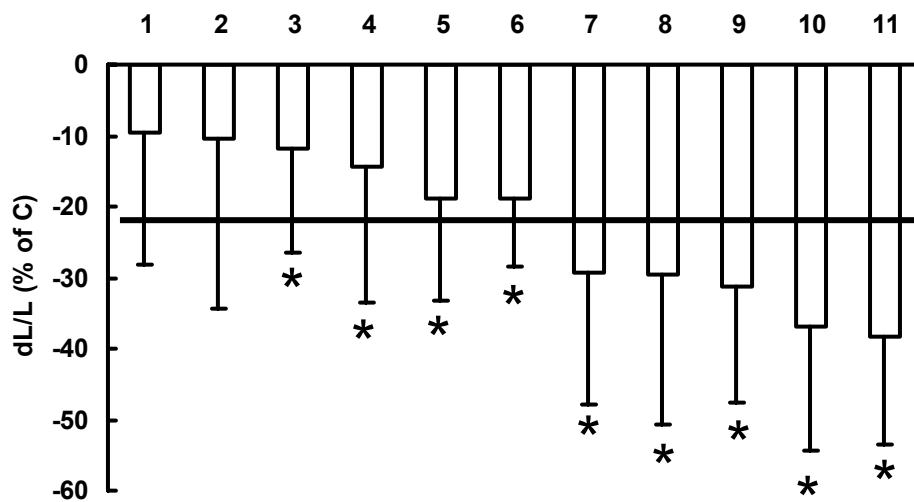


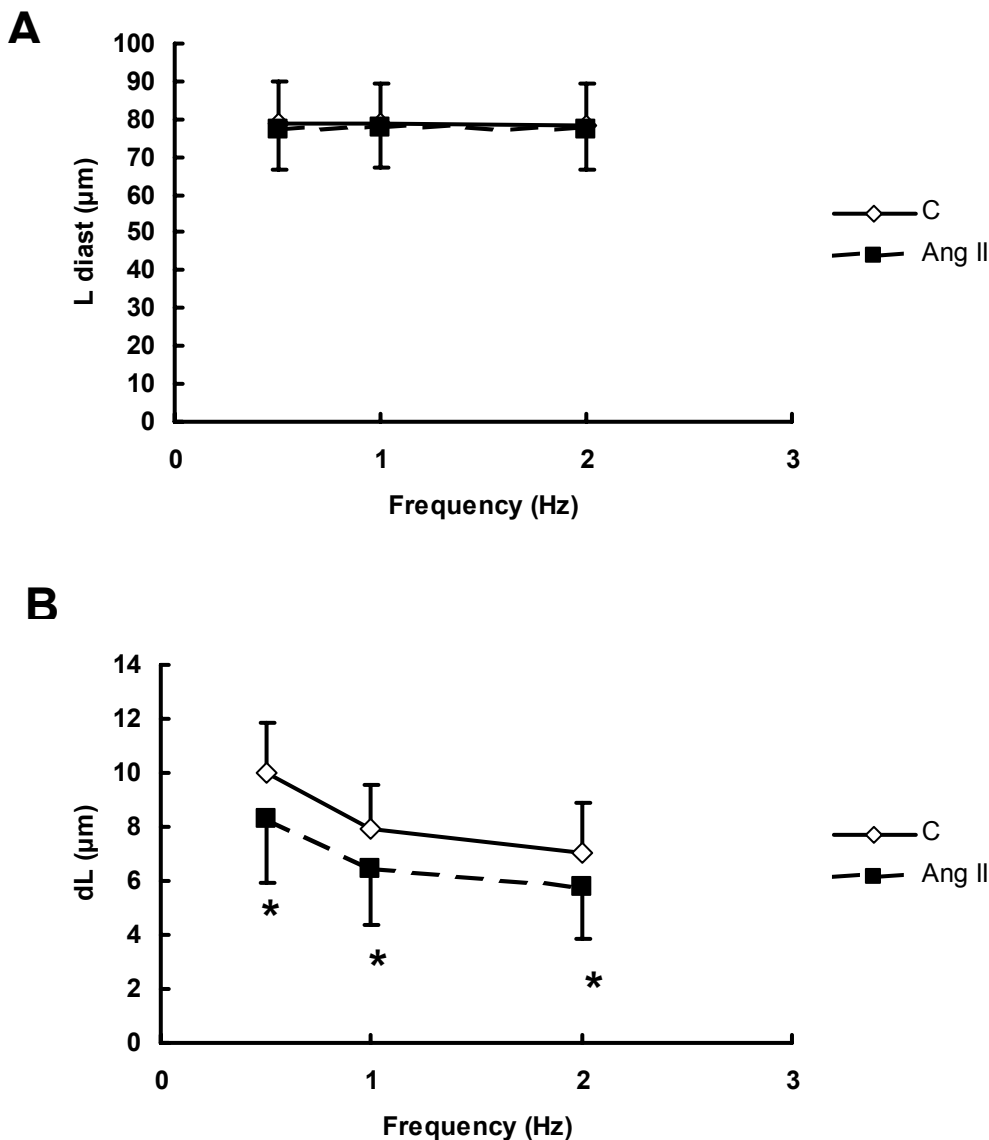
Abbildung 1: Effekt von Ang II auf die Zellverkürzung. Repräsentative Einzellaufnahmen einer Zelle in Abwesenheit (offenes Symbol) oder in Gegenwart (gefülltes Symbol) von Ang II (100 nM) für 24 Stunden.

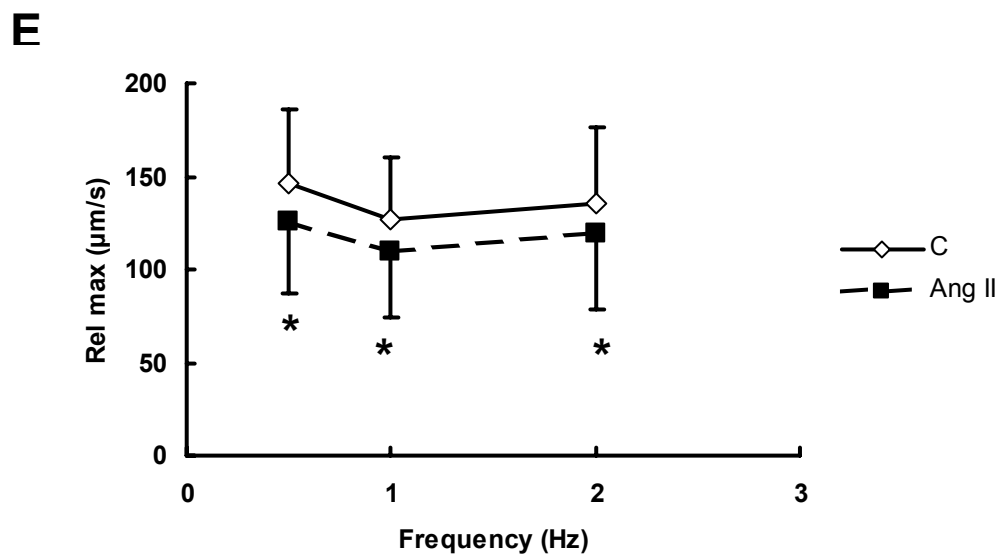
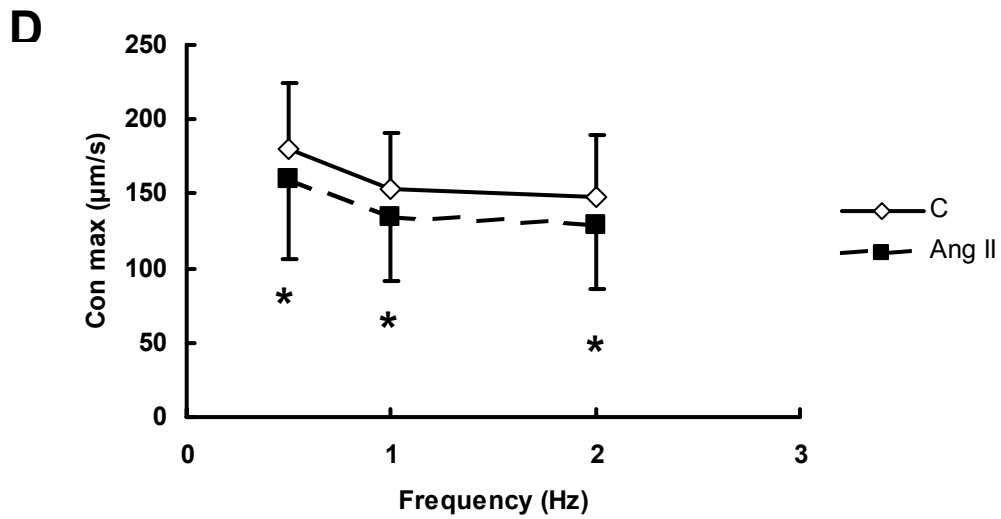
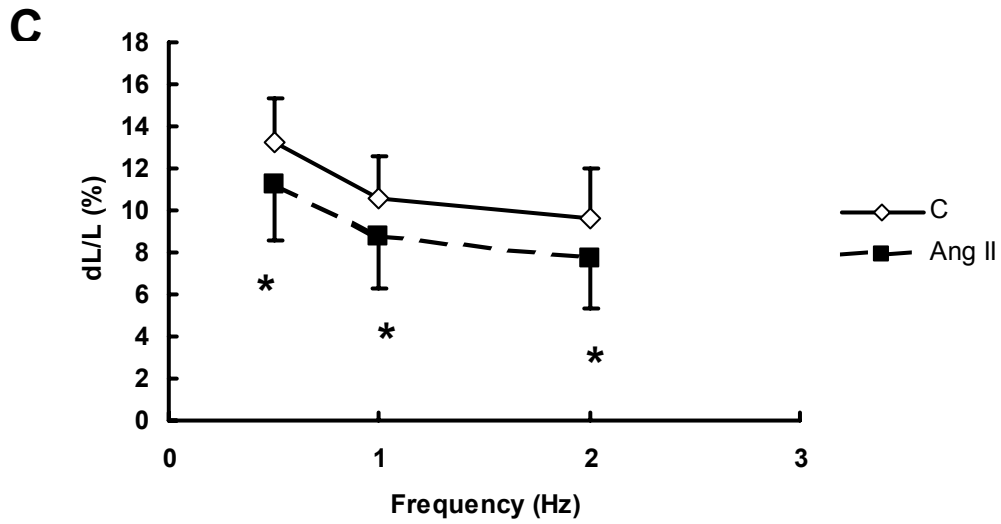
Dieser Effekt des Ang II war in hohem Maße reproduzierbar. Bei den 11 Präparationen, welche für diese Arbeit verwendet wurden, war festzustellen, dass die Zellschalen mit Ang II Exposition eine im Mittel 19,4 % verringerte Zellverkürzung hatten verglichen jeweils mit der Kontrollgruppe (11 Präparation, 396 Zellen Gesamtsumme).

**A****B**

**Abbildung 2: (A) Konzentrationsabhängige Verminderung der Zellverkürzung durch Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM) in adulten ventrikulären Kardiomyozyten. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Ang II inkubiert, \*  $p < 0,05$  vs. nicht Ang II behandelte Zellen,  $n=4$  Präparationen. (B) Reproduzierbarkeit des Effektes von Ang II vs. Kontrolle, \*  $p < 0,05$  vs. nicht mit Ang II behandelten Zellen der jeweils gleichen Zellkultur, die unter gleichen Bedingungen präpariert wurden,  $n=11$  Präparationen.**

Darüber hinaus vermindert Ang II die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3D), die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3E), die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis 50 % der maximalen Kontraktion (TTP50) (Abb. 3F) und die Zeit vom Beginn der Relaxation bis 50 % der maximalen Relaxation (R50, Abb. 3G).





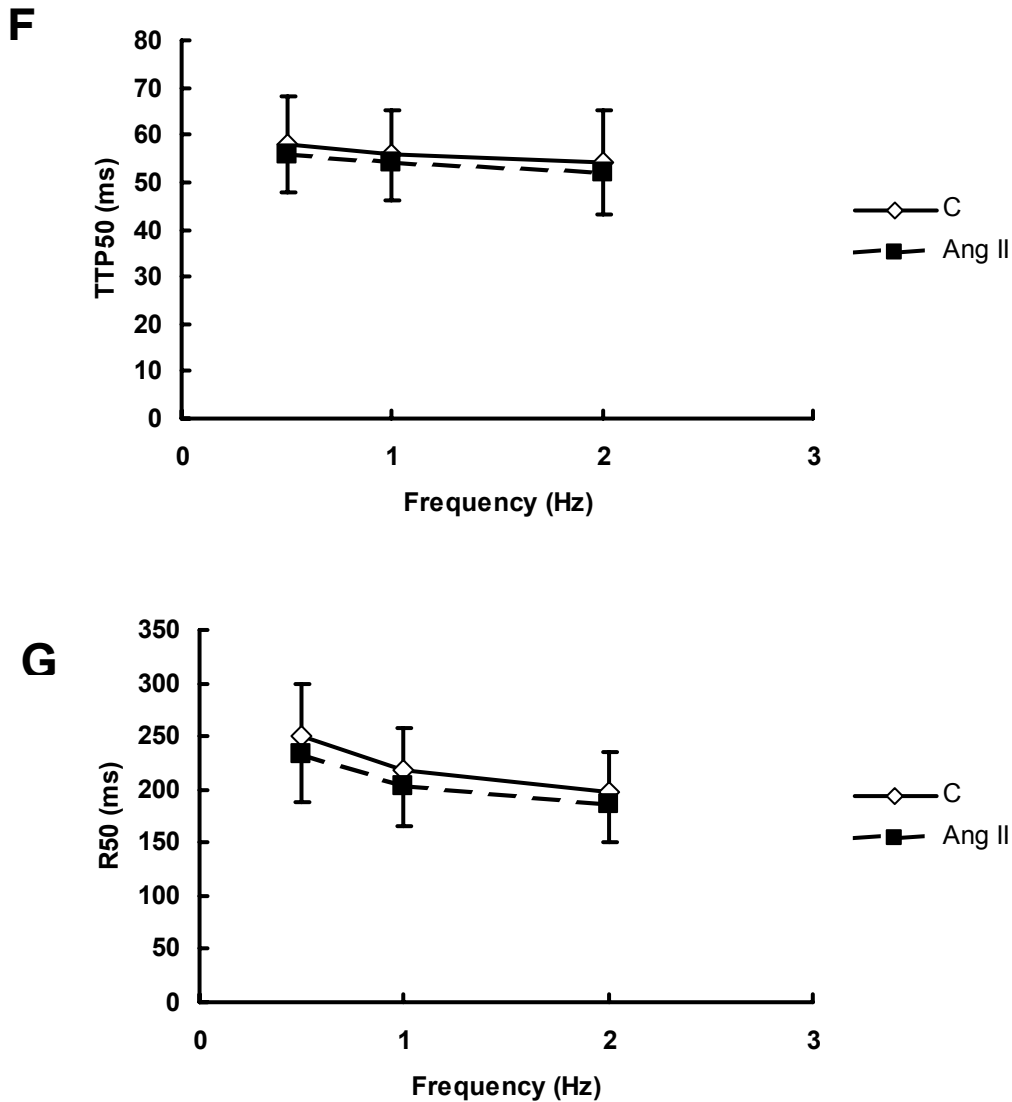
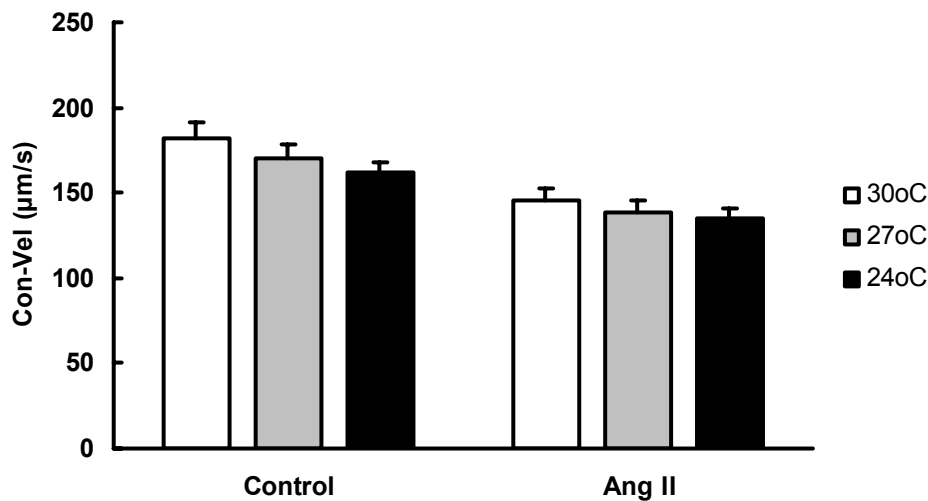
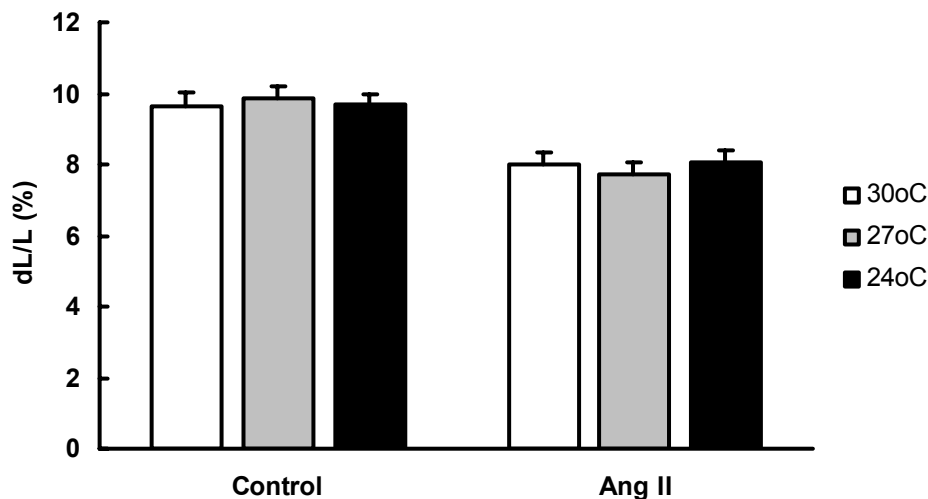


Abbildung 3: Es wurden folgende Parameter unter Ang II (100 nM) Einfluss hier untersucht und graphisch dargestellt (A) maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern (B) minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometern (C) Zellverkürzung in Prozent (D) maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (E) maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (F) Zeit von 50%-iger Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden (G) Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% in Millisekunden, n=11 Präparationen, bei \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Da die obigen Untersuchungen zunächst bei Raumtemperatur geschahen, erfolgten später die Untersuchungen ebenfalls bei verschiedenen Inkubationstemperaturen, um eine eventuelle Abhängigkeit der Temperatur beobachten protokollieren zu können. Wie erwartet fiel mit abnehmender Temperatur die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 4A). Jedoch veränderte sich die Amplitude der Zellverkürzung nicht (Abb. 4B). Ferner wurde festgestellt, dass Ang II bei allen getesteten Temperaturen die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit verminderte. Folglich ist der Ang II Effekt auf die Zellverkürzung nicht durch temperaturabhängige Maßnahmen beeinflussbar.

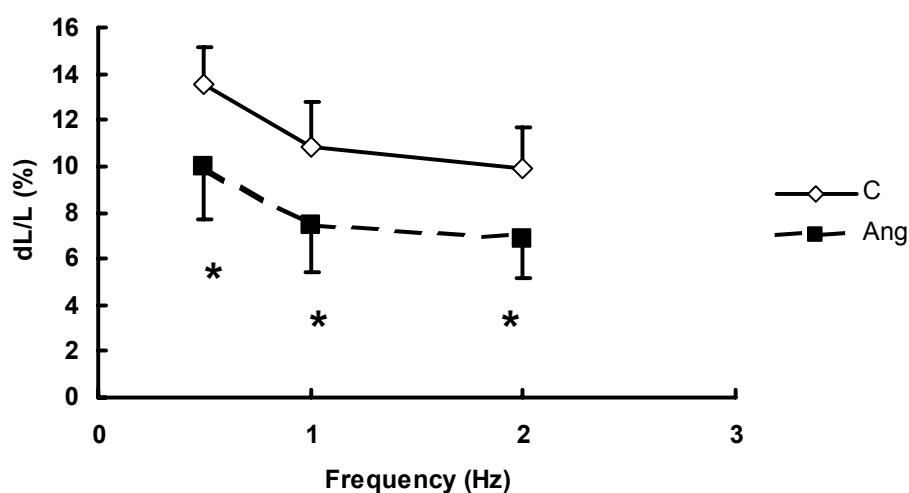
**A****B**

**Abbildung 4: Effekt der Temperatur auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (A) und Zellverkürzung (B). Kontrollzellen (n=108) wurde für 24 Stunden im basalen Medium inkubiert und die Zellverkürzung wurde anschließend bei drei verschiedenen Temperaturen festgestellt. Ang II-behandelte Zellen (n=107) wurden mit Ang II (100 nM) inkubiert und nach 24 Stunden wurde die Zellverkürzung auf identischem Wege bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M \*,  $p < 0.05$  vs. zwischen Gruppen; #,  $p < 0.05$  innerhalb Gruppen**

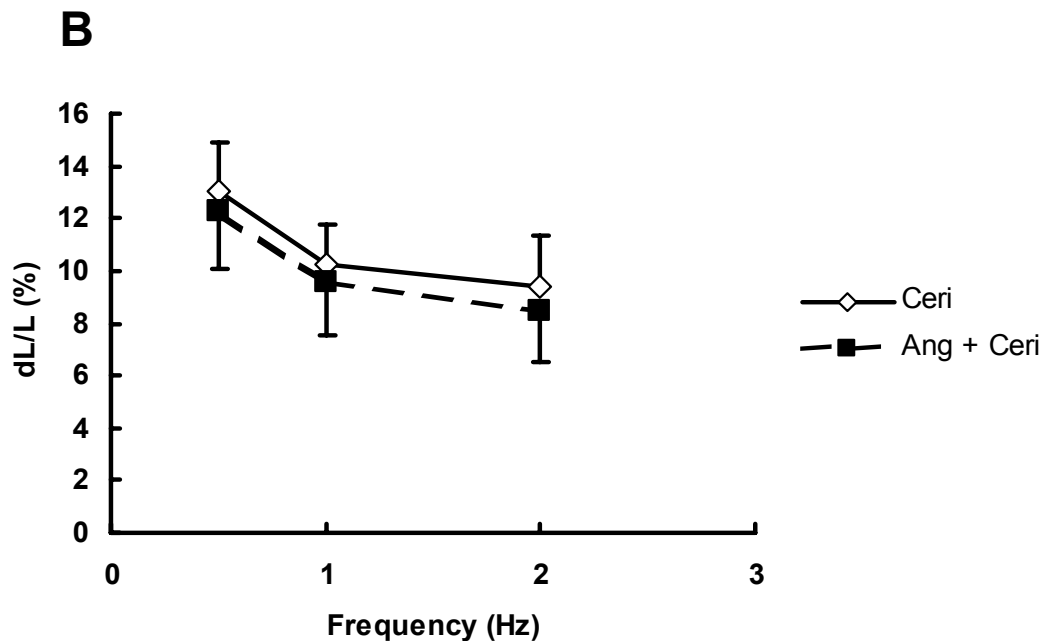
### 3.2 Ang II-abhängige Effekte auf die kardiale Funktion sind TGF- $\beta$ -abhängig

Die Frage, ob Ang II seinen Effekt über TGF- $\beta_1$  auf die Zellverkürzung ausübt, wurde als nächstes untersucht. Da Ang II die Aktivierung und Abgabe von TGF- $\beta_1$  in einem NAD(P)H-Oxidase-p38 MAP Kinase-abhängigen Weg induziert (Wenzel et al., 2001), wurde zunächst untersucht, ob Cerivastatin den Ang II Effekt auf die Zellverkürzung verringerte. Cerivastatin hebt die Ang II-anhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase auf (Delbosc et al., 2002). Cerivastatin alleine veränderte die Zellverkürzung nicht. Bei dieser Versuchsreihe verringerte Ang II die Zellverkürzung um 31,1 % (Abb. 5). Ang II verursachte in Gegenwart des Cerivastatin einen relativen kleinen Abfall hinsichtlich der Zellverkürzung (-10,3%, nicht signifikant vs. Kontrolle). Dieser Effekt der verminderten Zellverkürzung war in Gegenwart von Cerivastatin und Ang II signifikant niedriger als bei Ang II alleine.

## A

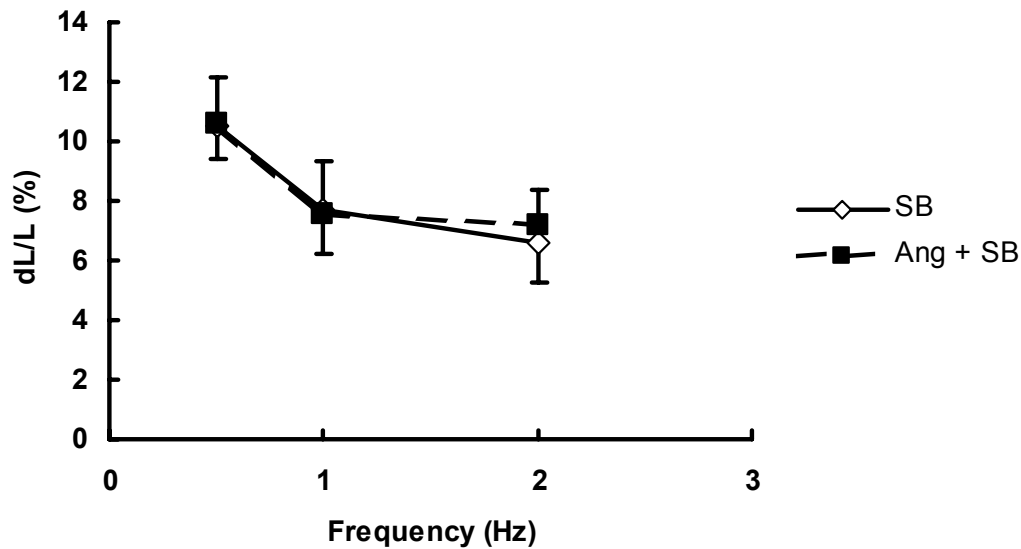






**Abbildung 5: Effekt des Cervastatin auf die Zellverkürzung. A) Isolierte Inkubation mit Ang II (100 nM) im Vergleich zur Kontrollgruppe (C). B) Cerivastatin (100 nM) isoliert, (leeres Symbol) und Cerivastatin zusammen mit Ang II (gefülltes Symbol) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung  $\pm$  S.E.M. von  $n=32$  Zellen. \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.**

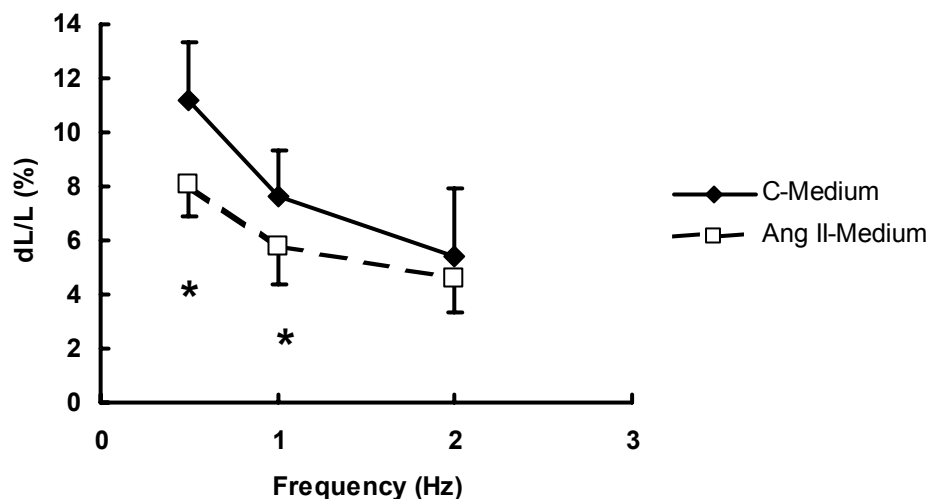
Als nächstes wurde der Effekt der p38 MAP Kinase Aktivierung bei Ang II-abhängigen Zellverkürzung untersucht. Die p38 MAP Kinase ist ein bekanntes nachgeschaltetes Signalmolekül des Ang II welches, aktiviert durch einen NAD(P)H-Oxidase abhängigen Signalweg, erforderlich ist für die erhöhte Expression und Abgabe von TGF- $\beta_1$  in Kardiomyozyten (Wenzel et al., 2001). SB202190, ein zellpermeabler Inhibitor der p38 MAP Kinase, hat alleine keinen signifikanten Effekt auf die Zellverkürzung (Abb. 6). Ang II verminderte bei dieser Versuchsreihe die Zellverkürzung um 29,5% und zusammen in Gegenwart des SB202190 13,6%.



**Abbildung 6:** SB202190 (SB) isoliert, (leeres Symbol) und SB202190 (SB) zusammen mit Ang II (gefülltes Symbol) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung  $\pm$  S.E.M. von n=32 Zellen.

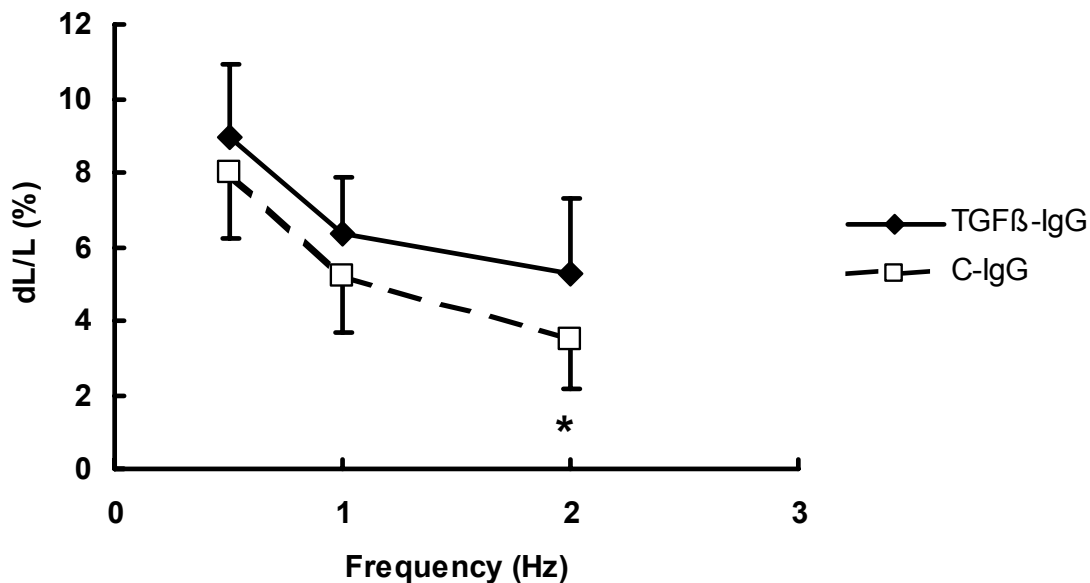
Um der Frage nachzugehen, ob der Ang II-induzierte Effekt auf die Zellverkürzung tatsächlich über das TGF- $\beta_1$  geht, wurden anschließend folgende Vorgehensweisen durchgeführt.

Kardiomyozyten wurden für 24 Stunden mit Ang II inkubiert. Danach wurde der Überstand dieser Zellen entnommen und frisch isolierte Kardiomyozyten mit jenem Überstand erneut für weitere 24 Stunden inkubiert. Die letzteren Zellen entwickelten eine Abnahme der Zellverkürzung um 23,9% verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe (Abb. 7).



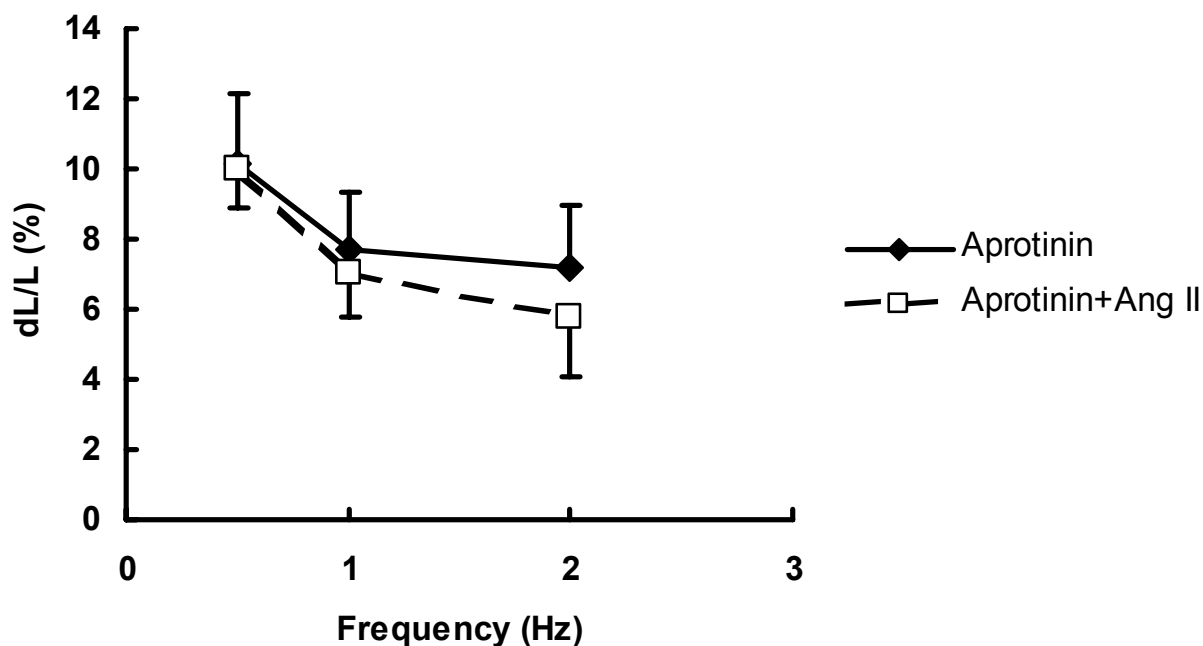
**Abbildung 7: Effekte des Überstandmediums des übernacht mit Ang II inkubierten Mediums (Ang II Medium) isoliert, (leeres Symbol) im Vergleich zur Kontrollgruppe (gefülltes Symbol) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung  $\pm$  S.E.M. von  $n=32$  Zellen. \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.**

Dies deutete darauf hin, dass Ang II seinen Effekt auf die Zellverkürzung durch Ausschüttung von autokrinen Faktoren hervorruft. Es zeigte allerdings nicht direkt die Beteiligung des TGF- $\beta_1$ . Deshalb wurden in einer weiteren Versuchsreihe Kardiomyozyten gleichzeitig Ang II und einem neutralisierenden Antikörpern, gerichtet gegen TGF- $\beta_1$ , ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde mit einem unspezifischen Antikörper für 24 Stunden behandelt. Die Zellverkürzung wurde am Folgetag analysiert. Die Zellen, die mit Ang II und dem unspezifischen Antikörper behandelt wurden, besaßen eine Verminderung der Zellverkürzung um 35,5% verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Zellschalen, die mit Ang II und dem neutralisierenden Antikörper behandelt wurden, zeigten keine signifikante Verminderung der Zellverkürzung (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Immunglobulin G Antikörper als Kontrollgruppe (C-IgG) isoliert, (leeres Symbol) und Immunglobulin G (IgG) zusammen mit TGF- $\beta$  (gefülltes Symbol) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung  $\pm$  S.E.M. von n=32 Zellen. \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Diese Experimente ließen vermuten, dass Ang II seine Effekte über das TGF- $\beta_1$  vermittelt. Diese These wurde durch zwei weitere Experimente belegt. Kardiomyozyten wurden mit Ang II und Aprotinin, einem Proteasehemmer, welcher die Aktivität des TGF- $\beta_1$  inhibiert (Schlüter et al., 1995), inkubiert. Aprotinin hatte alleine keinen signifikanten Effekt auf die Zellverkürzung (Abb. 9). Die durch Ang II hervorgerufene Verminderung der Zellverkürzung betrug bei dieser Versuchsreihe 32,4%. In Anwesenheit von Ang II und Aprotinin war die Verminderung der Zellverkürzung hingegen nur um 12,6% festzustellen. Wiederum war der Ang II-Effekt in Anwesenheit von Aprotinin geringer verglichen mit der alleinigen Inkubation mit Ang II (Abb. 9).



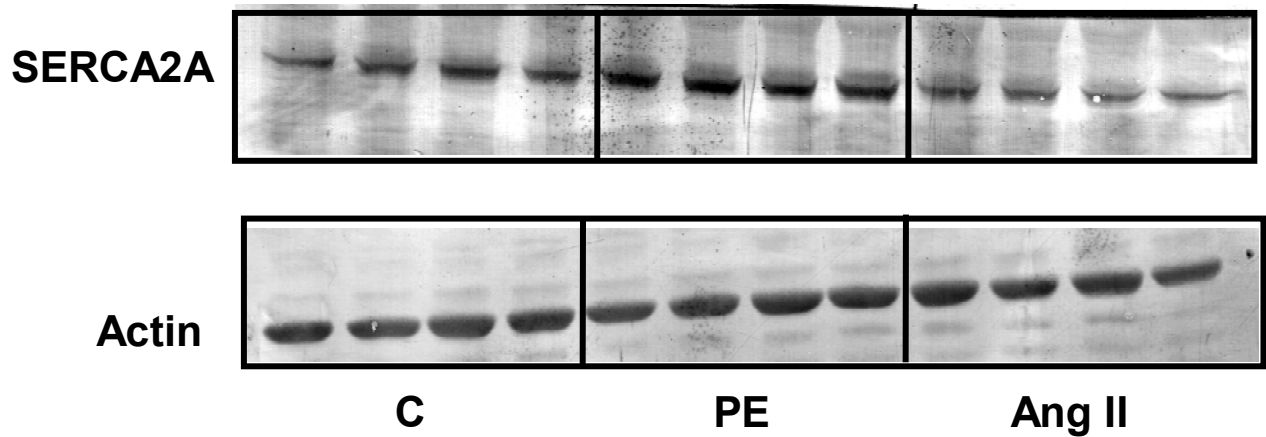
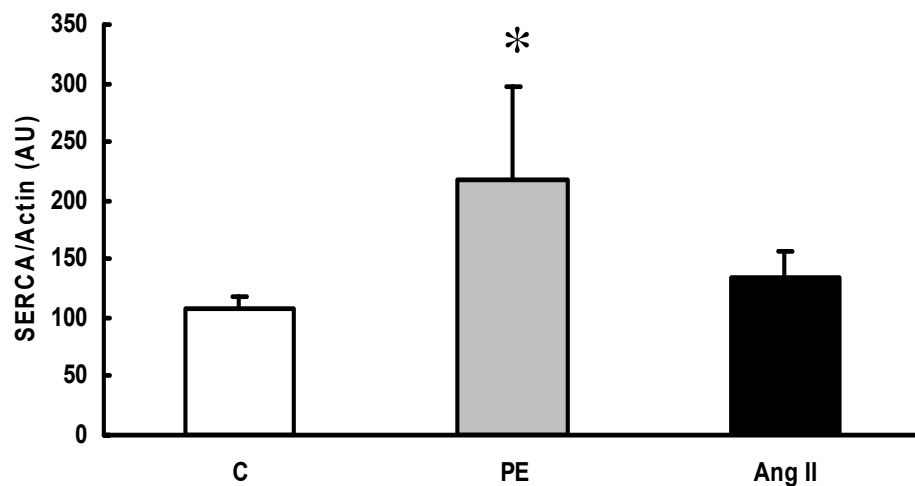
**Abbildung 9: Aprotinin isoliert, (gefülltes Symbol) und Aprotinin zusammen mit Ang II (gefülltes Symbol) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung  $\pm$  S.E.M. von n=32 Zellen.  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.**

Schließlich untersuchten wir, ob TGF- $\beta_1$  einen ähnlichen Effekt auf die Zellverkürzung erzeugt wie Ang II. Zu diesem Zwecke wurden Kardiomyozyten für 24 Stunden TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) ausgesetzt. Die Zellverkürzung verringerte bei den mit TGF- $\beta_1$  exponierten Zellen um  $24,0 \pm 7,3\%$  (n=32 Zellen,  $p < 0.05$ ). Dieser durch TGF- $\beta_1$  erzeugte Effekt ähnelte dem Ang II-Effekt. Zusammenbetrachtet deuteten diese Experimente stark an, dass Ang II seinen negativen kontraktilen Effekt durch TGF- $\beta_1$  erzeugte.

### 3.3 Effekt des Ang II auf die NFAT Aktivierung und die SERCA Expression

In einer vorherigen Untersuchung fand man heraus, dass  $\alpha$ -Adrenorezeptoren die Ausschüttung der SERCA über einen NFAT-abhängigen Signalweg steigern (Anwar et al., 2005). Ang II veränderte nicht die SERCA Ausschüttung bei adulten, ventrikulären Kardiomyozyten (Ju et. al., 1996). Deshalb vermutete man, dass Ang II nicht in der Lage ist

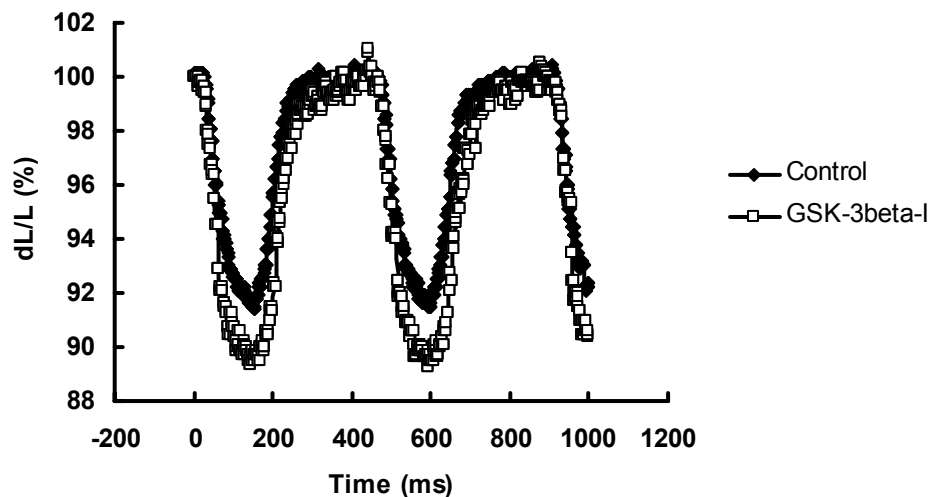
NFAT zu aktivieren und die SERCA Ausschüttung zu erhöhen. Wie zu erwarten war steigerte bei dieser Versuchsreihe Phenylephrine die SERCA Ausschüttung und Ang II nicht (Abb.10).

**A****B**

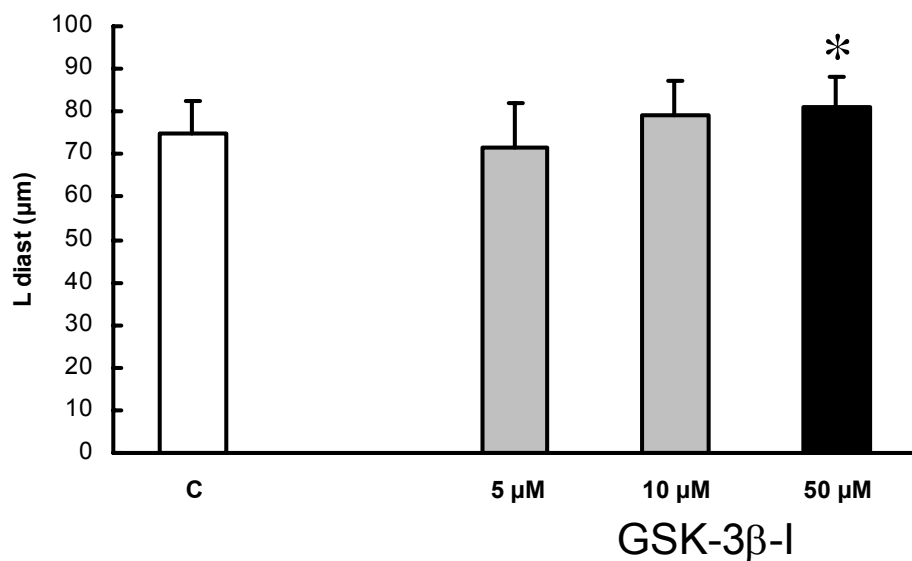
**Abbildung 10 : Effekt es Phenylephrin (PE, 10 $\mu$ M) und Ang II (100nM) auf SERCA Expression. A) Repräsentative Immunblots für SERCA2 und Aktin als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von n=4 verschiedene Präparationen. \*,  $p < 0.05$  vs. Kontrolle**

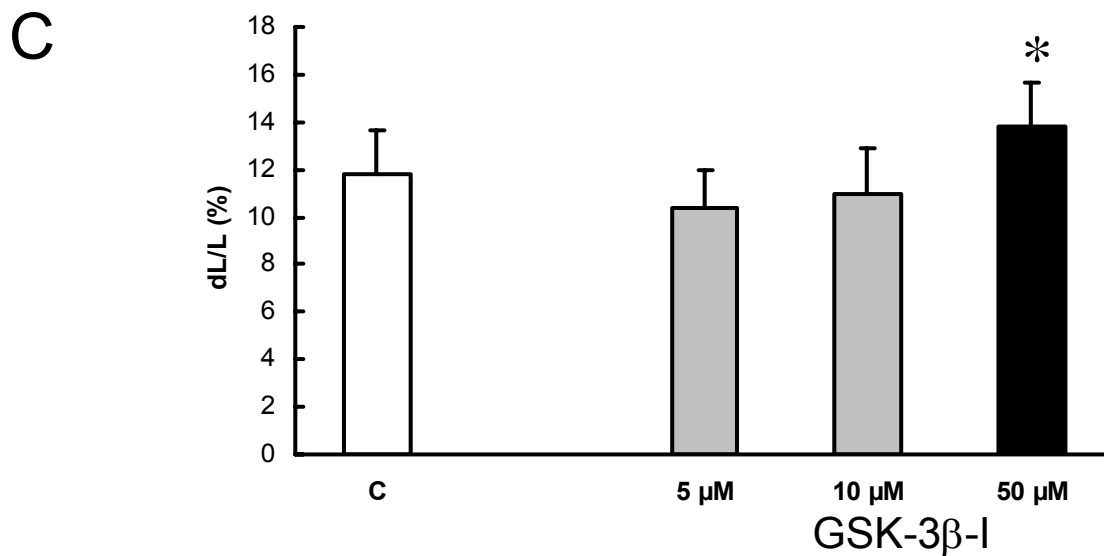
Um der Frage nach zu gehen, ob die NFAT-Aktivierung es zulässt, dass Kardiomyozyten durch Steigerung der SERCA Expression ihre kardiale Funktion aufrechterhalten, wurde ein zellpermeabler GSK-3 $\beta$  Inhibitor eingesetzt. GSK-3 $\beta$  ist ein konstitutives aktives Molekül, das die NFAT durch Hemmung ihrer Translokationsmöglichkeit in den Nukleus inaktiviert. Um auch hier einen möglichst repräsentativen Effekt zu bekommen, wurde zunächst eine Konzentrationskurve erstellt (Abb.11). In Abbildung 11A wird ein repräsentatives Experiment gezeigt. Abbildung 11B und 11C fassen die Befunde zusammen.

A



B





**Abbildung 11 : Effekt des GSK-3 $\beta$  Inhibitor auf die Zellverkürzung. A) Repräsentative Zellverkürzung einer mit GSK-3 $\beta$ -Inhibitor inkubierten Kardiomyozytenzelle im Vergleich zur Kontrollgruppe. B) Konzentrationsabhängiger Effekt des Inhibitors bei der diastolischen Zellverkürzung. C) Zellverkürzung normalisiert zur diastolischen Zellverkürzung. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von n=32 Zellen. \*, p< 0.05 vs. Kontrolle.**

Dabei wurde festgestellt, dass der stärkste Effekt für GSK-3 $\beta$  Inhibitor bei der Versuchsanordnung bei einer Konzentration von etwa 50  $\mu$ M lag.

Nachdem eine für die Versuchsreihe relevante Konzentration für den GSK-3 $\beta$ -Inhibitor festgestellt wurde, erfolgten weitere Versuche mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M. Es wurde das Kontraktionsverhalten der Zellkulturen unter Einfluss von GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (GSK-I) untersucht. Der Inhibitor alleine steigerte die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 12 A) aber nicht die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 12B). Wie erwartet ging dieser Effekt mit einer Zunahme der SERCA-Expression einher (Abb. 15A).



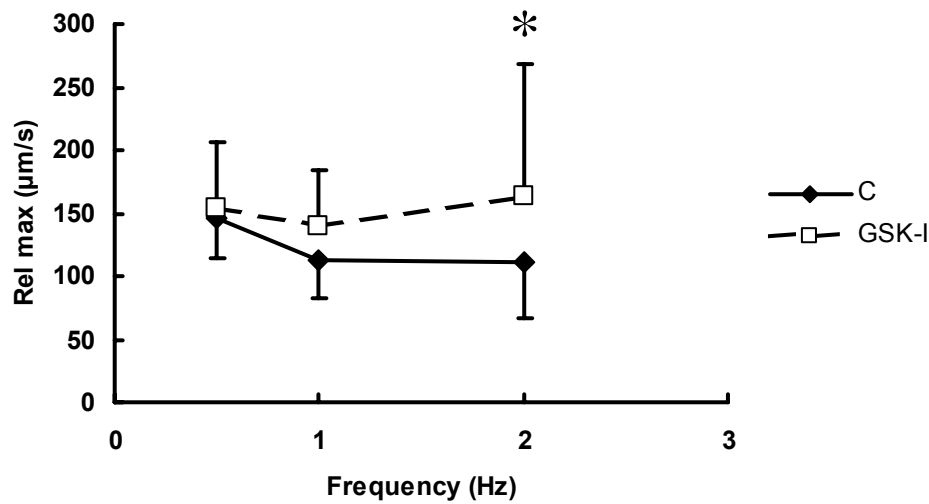
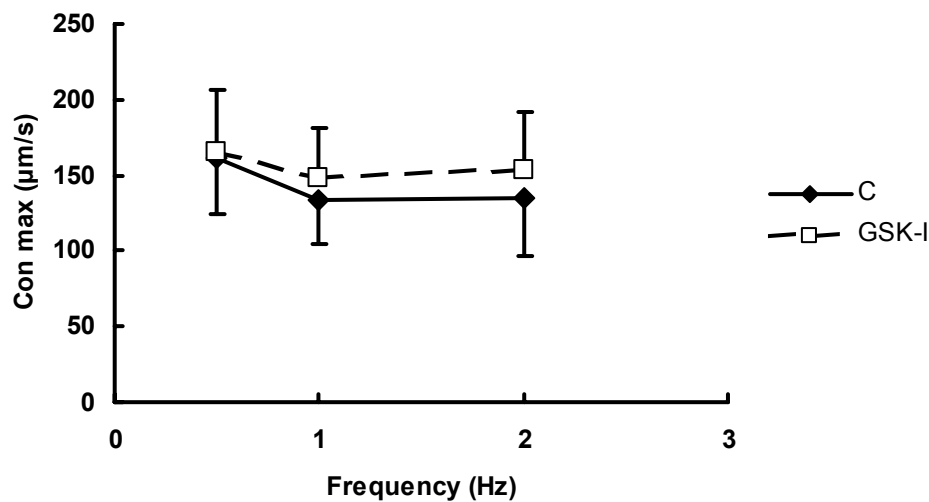
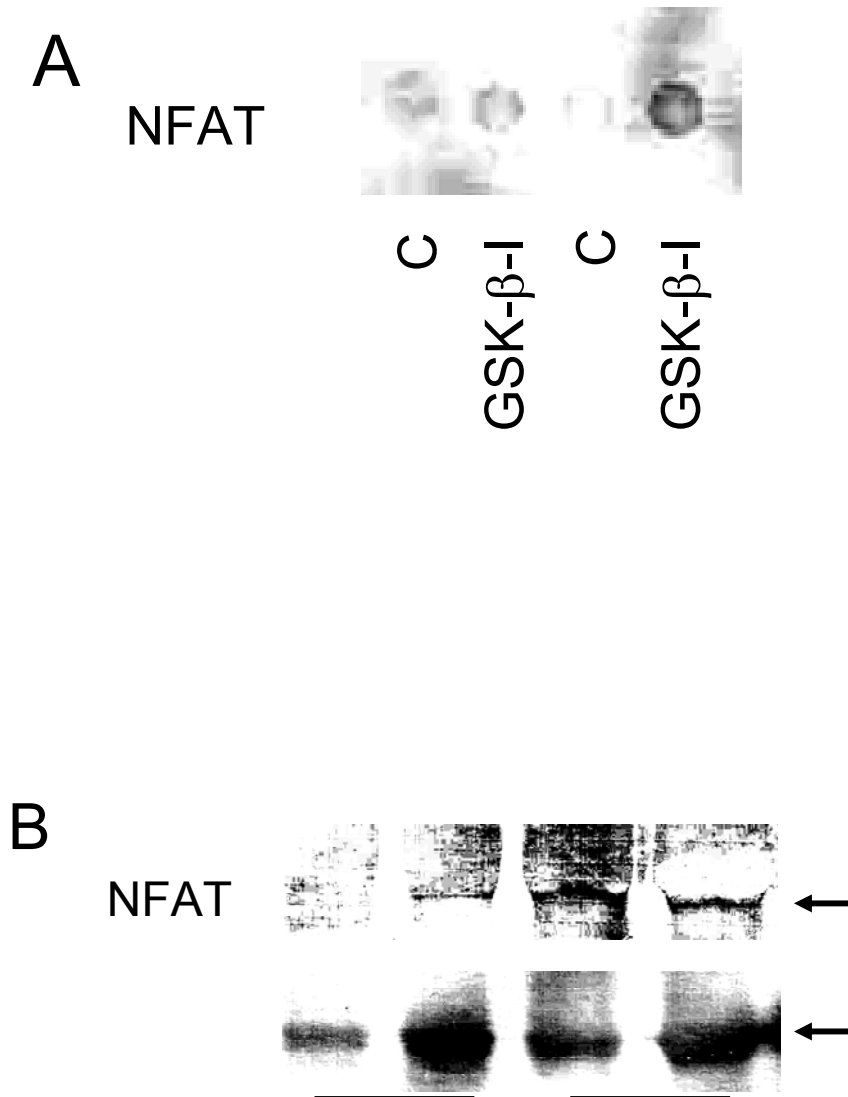
**A****B**

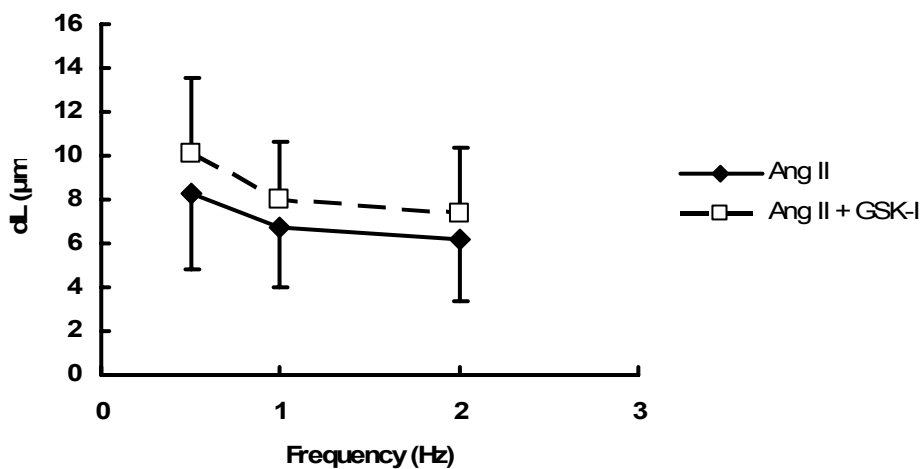
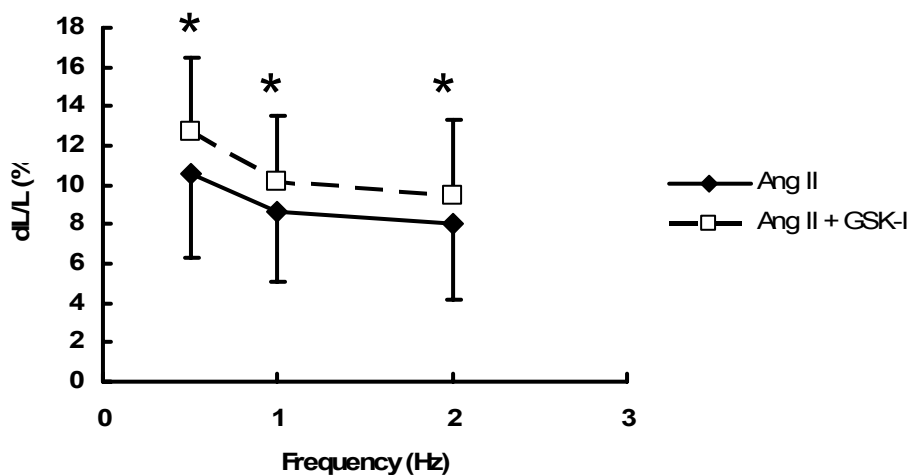
Abbildung 12: Einfluss von GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (GSK-I) auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=32) oder in Kulturmedium mit GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (GSK-I, 50  $\mu$ mol/l, n=32) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (A), maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (B) \*, p<0,05 vs. Kontrolle

Dies ging mit einem signifikanten Anstieg der NFAT Immunreaktivität in Nucleuskompartment einher (Abb. 14). Schließlich untersuchte man, ob NFAT Aktivierung durch GSK-3 $\beta$  Inhibitor ausreichte, um die kardiale Zellfunktion der Zellen, welche Ang II ausgesetzt waren, zu verbessern.



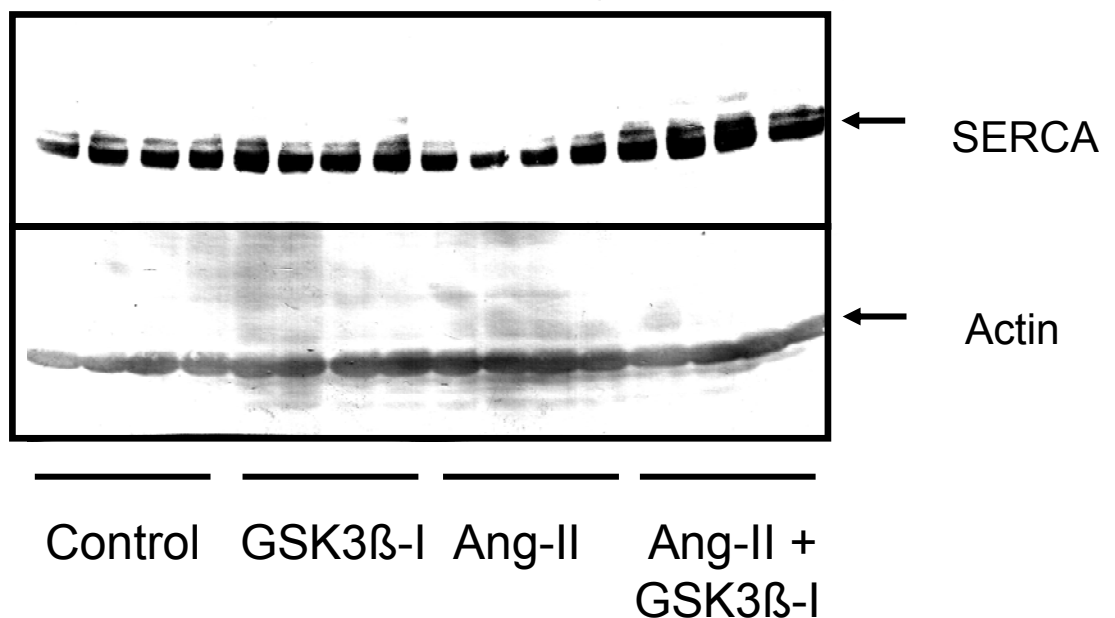
**Abbildung 13: NFAT Expression in den Nucleolen wie beim Immunblot der Nucleolenauszügen angezeigt. A) Dot Blot mit Nukläranszügen von Zellen, welche dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (GSK-3 $\beta$ -I, 50  $\mu$ M) ausgesetzt waren. B) Western Blot von diesen Proben mit Normalisierung zu einer unspezifischen, durch Antikörper hervorgerufener, Bande. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von n=4 Experimenten. \*, p < 0.05 vs. Kontrolle.**

Es stellt sich abschließend die Frage, ob eine Hemmung der GSK-3 $\beta$  ausreicht, den Ang II-vermittelten Funktionsverlust zu antagonisieren. Der GSK-3 $\beta$  Inhibitor (50  $\mu$ M) steigerte die Zellverkürzung um 20,0%. Ang II verminderte in dieser Versuchreihe die Zellverkürzung um - 16,6%. Die Zellverkürzung derjenigen Zellen, die mit Ang II behandelt wurden, verbesserte sich der Wert bei Zugabe von GSK-3 $\beta$  Inhibitor auf + 18,3 %. In Abbildung 14 ist der Einfluss des GSK-3 $\beta$  Inhibitors auf die Zellverkürzung Ang II-inhibierter Zellen im gesamten Frequenzbereich darstellt.

**A****B**

**Abbildung 14: (A) minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometern unter dem Einfluss von Ang II (100 nM) isoliert (gefülltes Symbol) und Ang II mit GSK-Inhibitor (GSK-I, 50  $\mu$ M) (B) Untersuchung der relativen Zellverkürzung durch Ang II (100 nM) isoliert (gefülltes Symbol) und Ang II mit GSK-Inhibitor (GSK-I, 50  $\mu$ M) auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium (Kontrolle, n=32) oder in Kulturmedium mit GSK-3 $\beta$ -Inhibitor (GSK-I, 50  $\mu$ mol/l, n=32) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung \*, p<0,05 vs. Kontrolle**

Aus biochemischer Sicht gingen diese funktionellen Veränderungen mit einer Steigerung der SERCA Expression einher. Die gesteigerte SERCA Expression war in den Zellkulturen mit alleiniger Inkubation des GSK-3 $\beta$  Inhibitor genauso hoch wie in den Zellkulturen mit Ang II und den Inhibitor (Abb.15B).

**A**

B

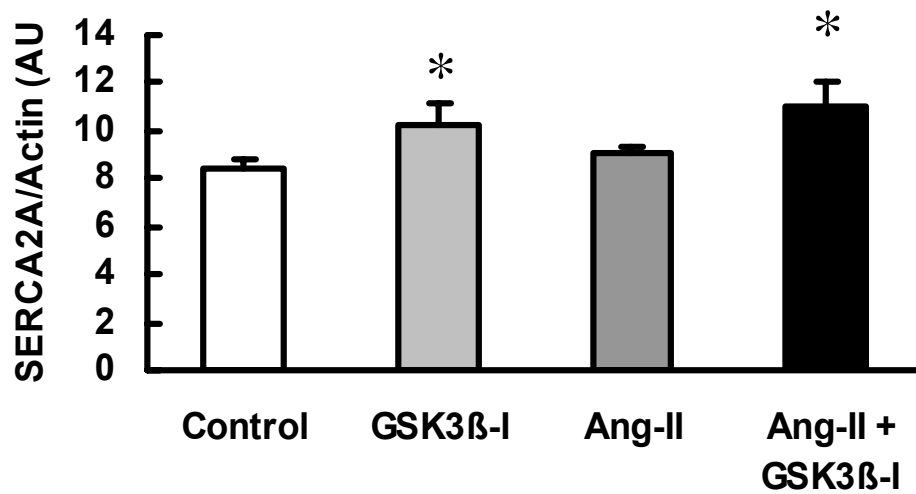


Abbildung 15: SERCA Ausschüttung in GSK-3 $\beta$  Inhibitor (GSK-3 $\beta$ -I, 50  $\mu$ M) exponierten Kardiomyozyten, Ang II (100 nM), oder als Kombination von diesen. A) Repräsentativer Western blot. B) Quantitative von diesen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von n=4 Präparationen. \*, p<0.05 vs. Kontrollen.

## 4.Diskussion

### **4.1 Ziel der Arbeit**

Die gegenwärtige Untersuchung zielte auf die Frage ab, ob eine chronische Exposition von Kardiomyozyten mit Ang II zu einem Verlust der Zellfunktion (Zellverkürzung) führt, ob ein solcher Effekt TGF- $\beta_1$ -abhängig ist, und ob GSK-3 $\beta$ -Inhibition diese Minderung der Zellfunktion durch gesteigerte Expression der SERCA kompensieren kann.

### **4.2 Die Rolle des Ang II bei den intrazellulären Mechanismen der Kardiomyozytenkontraktion**

Ang II verursachte eine starke und höchst reproduzierbare Minderung der Zellfunktion. Dieser Ang II Effekt war TGF- $\beta_1$  abhängig. Ang II löste keine NFAT Aktivierung aus. Jedoch führte die Hemmung der GSK-3 $\beta$  zur Aktivierung der NFAT wodurch die Zellfunktion wieder hergestellt wurde und zwar in ähnlicher Weise wie durch eine gesteigerte Expression der SERCA bei Phenylephrin exponierten Kardiomyozyten, also unter  $\alpha$ -adrenerger Stimulation. Bereits in der Vergangenheit wurden intensive Effekte des Ang II auf die Zellverkürzung bei Kardiomyozyten untersucht. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, offenbarten jene Experimente jedoch kein einheitliches Bild hinsichtlich Ursache und Wirkung und zielten zumeist auf akute Effekte des Ang II ab.

### **4.3 Möglichkeiten des angewendeten Versuchsmodells**

Die Versuche in dieser Arbeit, welche an adulten ventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt wurden, unterscheiden sich von jenen vorher gegangenen Experimenten. Wir analysierten die Zellverkürzung 24 Stunden nach Ang II Applikation. Dies ahmte besser die Situation bei chronischer Druckbelastung im Herzen mit erhöhter Ang II Konzentration nach. Die Halbwertszeit von Ang II in Zellkulturen liegt in etwa bei 8 Minuten (Henriksen, 1991). Jegliche Ang II abhängige Antwort, die 24 Stunden später beobachtet wurde, muss das Ergebnis einer Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionen sein, welche eine kurzfristige Rezeptoraktivierung in einen anhaltenden Effekt überträgt, oder die Konsequenz

einer Ang II-abhängigen Freisetzung oder Aktivierung von anderen Faktoren sein, so dass, Endothelin und TGF- $\beta_1$  verstärkt in Frage kommen (Ito et al., 1993, Wenzel et al., 2001).

#### ***4.4 Die Wirkung des Zytokins TGF- $\beta_1$ auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene***

Obwohl eine eventuelle Rolle für Endothelin in diesem Kontext nicht ausgeschlossen werden konnte, konnte nachweislich festgestellt werden, dass TGF- $\beta_1$  eine Schlüsselrolle bezüglich dem durch Ang II-abhängigen vermittelten kardiodepressiven Effekt hat. Diese Schlussfolgerung basiert auf Ergebnissen, bei denen die Hemmung der Signalwege, welche für die Ang II-abhängige TGF- $\beta_1$  Expression verantwortlich sind, zu einer Minderung des Ang II-abhängigen Effekt führen. In diesem Zusammenhang wurden die NAD(P)H-Oxidase Aktivierung und p38 MAP Kinase Aktivierung als wichtige Faktoren identifiziert. Darüber hinaus induzierten die Zellüberstände, der mit Ang II behandelten Zellen, einen vergleichbaren Effekt, allerdings bewirkten die neutralisierende Antikörper, welche gegen TGF- $\beta_1$  gerichtet waren, einen Minderung dieses Effektes. Letztendlich ahmte TGF- $\beta_1$  den Effekt des Ang II. In dem selbem System wurde verdeutlicht, dass der pro-apoptische Effekt des Ang II ebenfalls TGF- $\beta_1$  abhängig ist (Schröder et al., 2006).

#### ***4.5 Einfluss der NAD(P)H-Oxidase Aktivierungsantagonisten***

Es ist wichtig anzumerken, dass weder Cerivastatin, welches die Ang II-abhängige NAD(P)H-Oxidase Aktivierung inhibiert, noch SB202190, welches die p38 MAP Kinase Aktivierung inhibiert, den Effekt des Ang II vollständig antagonisieren. Eine mögliche Erklärung ist die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Ang II (Schreckenberget al., 2004). Die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Troponin I und C-Protein ist verbunden mit der Hemmung von myofibrillären Aktinomyosin-MgATPasen (Venema und Kuo, 1993). Folglich kann angenommen werden, dass, abgesehen von dem akuten Effekt des Ang II auf die Zellverkürzung, längerfristige Effekte auf die Zellverkürzung TGF- $\beta_1$  benötigen.

#### **4.6 Diskussion des angewendeten Versuchsmodells**

Obwohl diese Experimente ex vivo durchgeführt wurden, bestätigten sie die Arbeiten, die *in vivo* während kardiale Überdruckbelastung vollzogen wurden, bei welcher die Ang II-abhängige TGF- $\beta_1$  Induktion eine Veränderung der Hypertrophie vom adaptativen Typ in eine Hypertrophie vom maladaptativen Typ verursachte (Boluyt et al., 1994). Dies ist ebenfalls übereinstimmend mit früheren Ergebnissen, dass die Ang II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase eine kardiale, kontraktile Dysfunktion nach sich zieht. Als Antwort auf einer Überdruckbelastung ist die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase erforderlich für die Ang II-abhängige kontraktile Dysfunktion und TGF- $\beta_1$  Induktion (Grieve et al., 2006; Wenzel et al., 2001).

#### **4.7 Diskussion der experimentell induzierten Verminderung der Zellfunktion durch Ang II/ TGF- $\beta_1$**

Der Mechanismus, mit welchem Ang II/ TGF- $\beta_1$  ihren Effekt auf die Zellverkürzung von Kardiomyozyten induzieren, wurde in dieser Arbeit mituntersucht. P38 MAP Kinase ist in der Lage  $\alpha$ -Tropomyosin zu dephosphorylieren. Man könnte annehmen, dass so lange diese Kinase aktiviert ist, TGF- $\beta_1$  über diesen Signalweg agiert (Vahebi et al., 2007). Jedoch induziert die p38 MAP Kinase in einem hyperglykämischen Medium nicht einen ähnlich (Wenzel et al., 2005). Deshalb scheint die p38 MAP Kinase nicht direkt bei dem Effekt der Zellverkürzung involviert zu sein. Wie bereits erwähnt, ist ein akuter Effekt des Ang II auf die Zellverkürzung bereits vorher untersucht worden, aber die Ergebnisse ergaben kein einheitliches Bild. Dort wo Ang II einen negativen, kontraktilen Effekt bei adulten Kardiomyozyten von Ratten verursachte, schien dies von einer Aktivierung des p38 MAP Kinase abzuhängen, obwohl bei den Experimenten Ang II nicht die ROS Entwicklung induzierte (Palomeque et al., 2006). In dieser Arbeit waren die Ang II-abhängigen Effekte auf die Zellverkürzung ebenfalls p38 MAP-Kinase abhängig. Dennoch muss trotz des festgestellten Effektes der Ang II –abhängigen TGF- $\beta_1$  Aktivierung angenommen werden, dass eine ROS Entstehung erforderlich ist. Die Bestimmung der exakten Rolle der p38 MAP Kinase verlangt die Berücksichtigung voran gegangener Untersuchungen (wie Sabri und Lucchesi, 2006).



#### **4.8 Einfluss der Temperatur auf den Ang II-abhängigen Effekt**

Ferner fanden die Autoren (Sabri und Lucchesi, 2006) der oben genannten Arbeit einen akuten Ang II –abhängigen Effekt auf die Zellverkürzung bei ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Ratten bei Raumtemperatur heraus. Dementsprechend wurde auch in dieser Arbeit bei Raumtemperatur gemessen. Man fand nicht einen solch akuten Effekt des Ang II in unserem System die, die früheren Ergebnisse von Diggrell (1989) bestätigten. Jedoch veranlasste uns der Unterschied zwischen diesen beiden Arbeiten den Effekt der Temperatur auf die Zellverkürzung mehr im Detail zu untersuchen. Es gibt mindestens zwei wichtige Effekte der Temperatur auf die Zellverkürzung. Erstens moduliert die Temperatur die Geschwindigkeit der sequentiellen Sarkomer Aktivierung infolge einer Diffusionsbegrenzung und die kontinuierliche Abgabe von Calcium von einem Sarkomer zum anderen (Lundblad et al., 1986). Der errechnete  $Q_{10}$  für diesen Effekt liegt bei 1.5. Wir führten die Untersuchungen bei 24-30 °C durch und ermittelten einen  $Q_{10}$  von 1.2 für die Kontraktionsgeschwindigkeit, dies war also auch im ähnlichen Ausmaße. Zweitens verursacht in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratten der „reverse mode“ des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers erst ab Temperaturen über 30 C° eine Kontraktionssteigerung (Wasserstrom et al., 1996).

Da die hier dargestellten Untersuchungen bei Raumtemperaturen durchgeführt wurden, spielt diese Veränderungen keine entscheidende Rolle für die Experimente. Es ist wichtiger anzumerken, dass eine Unabhängigkeit der Temperatur auf die totale Zellverkürzung erkannt wurde, so dass der Ang II-abhängige depressive Effekt, sowohl die Kontraktionsgeschwindigkeit, als auch die Zellverkürzung, unabhängig von der Temperatur waren.

#### **4.9 Kompensation der Zellfunktionsminderung durch gesteigerte Ausschüttung der SERCA und die Rolle des NFAT bei diesem Mechanismus**

Dem Ang II-abhängige Effekt auf die Zellverkürzung wurde durch Steigerung der SERCA2 Expression entgegengearbeitet. Die Stimulation der  $\alpha$ -Adrenorezeptoren führen zum Anstieg der SERCA2 Expression via Calcineurin/NFAT Aktivierung (Anwar et al., 2005). Die SERCA2 Expression ist auch bei mechanisch belasteten Papillarmuskeln aus Kaninchen durch NFAT Aktivierung gesteigert (Kögler et al., 2006). Bei niedrigen Herzfrequenzen und in Anwesenheit von Phenylephrin wurde festgestellt, dass die gesteigerte SERCA Expression den Verlust der Zellverkürzung normalisierte (Anwar et al., 2005). Es wurde angenommen,

dass SERCA die Calciumauffüllung des Sarkoplasmatischen Retikulums verbessert. In Übereinstimmung mit dieser Annahme war in allen beschriebenen Experimenten dieser Arbeit, die Relaxationsgeschwindigkeit auch gesteigert, wenn die SERCA Ausschüttung erhöht war. Vorangegangene Beschreibungen haben bereits angedeutet, dass eine Re-Expression von SERCA2a in Kardiomyozyten von geschädigten humanen Herzen die Zellfunktion normalisieren, die Relaxationsgeschwindigkeit verbessern und ein negatives Treppen-Phänomen in eine mehr physiologische positive Belastungs-Frequenz Beziehung umgeformt wird (del Monte et al., 1999).

Die NFAT Aktivität ist grundlegend durch GSK-3 $\beta$  vermindert. Diese Kinase kann via des PI3-Kinase/Akt Signalweg inaktiviert werden. Akt ist ebenso direkt mit steigender Proteinsynthese verbunden, wobei Ang II-Rezeptor Stimulation nicht einen so starken Effekt auf die Proteinsynthese induziert wie Phenylephrin (Ruf et al., 2002). Deshalb könnte man vermuten, dass Ang II weder NFAT aktiviert noch die SERCA2a Expression steigert. Unsere Ergebnisse bestätigten frühere Ergebnisse (Ju et al, 1996), dass Ang II nicht in der Lage ist die SERCA2a Expression zu modulieren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beobachteten wir auch keinen Effekt des Ang II auf die NFAT Aktivierung. Diese gehen ebenfalls einher mit der Vermutung, dass transgenen Mäuse, die wild type GSK-3 $\beta$  überexprimieren, im Herzen eine abnorme kardiale Kontraktilität entwickeln, welche mit einer herunter regulierten SERCA2a Expression verbunden ist (Michael et al., 2004). All diese Fakten lassen vermuten, dass a) eine Hemmung der GSK-3 $\beta$  Aktivität die SERCA Expressen via NFAT Aktivierung steigert und zu einer verbesserten Funktion führt und b) dass Ang II *per se* keine Hemmung der GSK-3 $\beta$  hervorruft. Daher profitieren Ang II exponierte Zellen von einer GSK-3 $\beta$  Hemmung. Diese Hypothese wurde durch unsere Experimente bestätigt. Wir fanden eine Steigerung der SERCA Expression bedingt durch GSK-3 $\beta$  Inhibition und eine korrespondierende Steigerung der Zellverkürzung unter basalen Verhältnissen um 20%. Da Ang II scheinbar nicht bei der Aktivierung der NFAT interferiert, waren wir in der Lage den Ang II-abhängigen Verlust der Funktion, der bei 18% lag, zu kompensieren. In beiden Fällen waren die basale SERCA Expression gesteigert und in beiden Fällen verbesserte dies die Zellverkürzung in einem ähnlichem Ausmaße. Trotzdem ist diese Arbeit scheinbar konträr zu den Ergebnissen an neonatalen Kardiomyozyten von Ratten. In den Versuchen aktivierte Ang II die NFAT und steigerte die Ausschüttung von SERCA2a (Onohara et al., 2006; Ju et al., 1996). Jedoch können neonatale Kardiomyozyten kaum mit adulten Kardiomyozyten verglichen werden, da beispielsweise die Ersteren spontan schlagen und die anderen dies nicht tun.

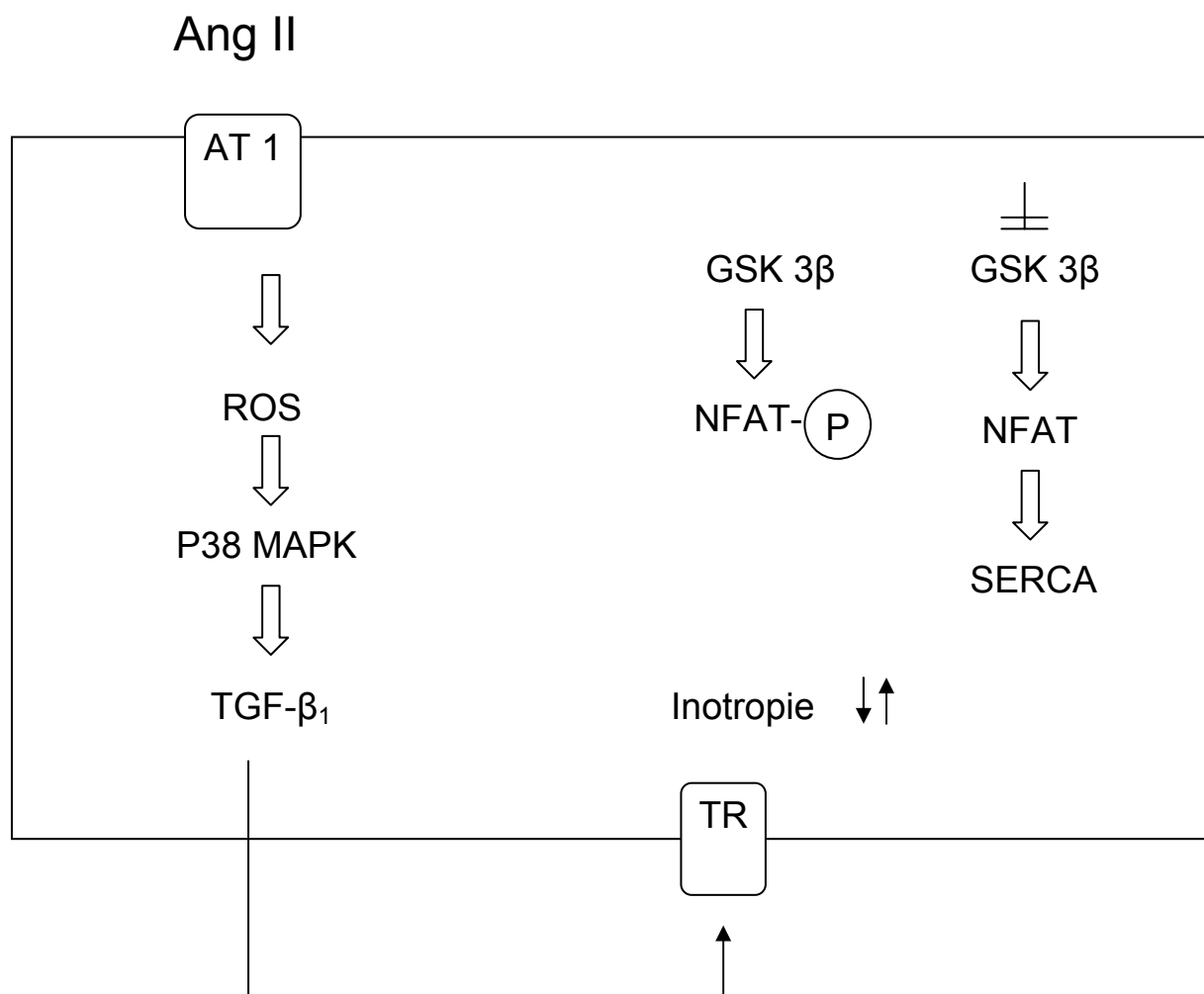
Dies ist von besonderer Bedeutung für Arbeiten, welche Calcium-abhängige regulierte Signaltransduktionswege untersuchen. Es wurde bereits *in vivo* gezeigt, dass eine höhere

GSK-3 $\beta$  Aktivität mit einer geringeren SERCA Expression einhergehen (Michael et al., 2004). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass in einem diabetischen Maus Modell (Streptozotocin Injektion) die initiale Reaktion eine Ang II-abhängige Aktivierung der GSK-3 $\beta$  ist. Man könnte nun eine geringere SERCA Expression in solchen Mäusen dann erwarten. Dies war allerdings nicht Untersuchungsschwerpunkt bei dieser Arbeit, allerdings wurde eine geringere SERCA Expression in transgenen Mäusen festgestellt, die Ang II-vermittelt war und zu einer kardialen Hypertrophie in Abwesenheit von erhöhten Blutdruck führte (Domenighetti et al., 2005). All diese Fakten behaupten im Prinzip ebenfalls die Schlussfolgerungen unserer Experimente, nämlich dass in adulten Kardiomyozyten der Ratte eine GSK-3 $\beta$  Aktivität negativ mit einer SERCA Expression korreliert. Allerdings fanden wir keine NFAT Aktivierung in Kardiomyozyten in Anwesenheit von Ang II, welche mit einer GSK-3 $\beta$  Hemmung gekoppelt war. Im Gegensatz zu den *in vivo* Untersuchungen war Ang II jedoch nicht in der Lage eine GSK-3 $\beta$ -abhängige NFAT Hemmung und eine anschließende Reduktion der SERCA Expression *in vitro* während der Zeitspanne der Untersuchung hervorzurufen. Bezüglich der NFAT-abhängigen Regulierung der SERCA Expression und der Bedeutung dieses Proteins für die kardiale Funktion, ist es offensichtlich und in unserer Arbeit auch gezeigt worden, dass die Zellen von einer Hemmung der GSK-3 $\beta$  funktionell profitieren.

#### **4.10 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass Ang II unmittelbar die mechanische Funktion von Kardiomyozyten reduziert. Folglich bestätigten diese Messwerte die Schlussfolgerungen, welche bereits vorher im transgenen Mausmodell beschrieben wurden (Domenighetti et al., 2005). Jene Autoren beobachteten eine verminderte kardiale Funktion in einem Ang II Modell *in vivo*, welcher unabhängig von der myokardialen Hypertrophie war. Wir und vorher auch andere fanden heraus, dass Ang II keinen hypertrophen Effekt hervorruft und zeigten in dieser Arbeit, dass Ang II die kardiale Funktion herabsetzt (Fuller et al., 1990; Wada et al., 1996; Ruf et al., 2002). Dies deutet zum einen an, dass der Ang II Effekt sich nicht nur auf Ratten beschränkt und zum anderen, dass in *in vitro* Versuchen potentielle mechanische Erkenntnisse unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden kann. Ferner zeigte diese Arbeit, dass der Ang II-abhängige Effekt auf die Zellverkürzung wesentlich TGF- $\beta_1$  abhängig ist. Dies skizziert die zentrale Rolle für dieses Zytokin bei der Umwandlung von einer adaptativen Hypertrophie in eine maladaptativen Hypertrophie. Es beinhaltet sowohl den

kardio-depressiven Effekt, welcher hier dargelegt wurde, als auch den bereits beschriebenen pro-apoptotischen Effekt (Schröder et al. ,2006). Schließlich betont diese Arbeit die Bedeutung der aufrechterhaltenden SERCA Expression und NFAT als Upstream Aktivator der SERCA für die kardiale Funktion. Langzeitstudien deuteten eine mögliche widersprüchliche Rolle der NFAT Aktivierung im Herzen an (Wilkins et al., 2004). Es ist einer der Herausforderungen für die Zukunft diese Mechanismen zu identifizieren, durch welche die neu entdeckten Erkenntnisse zu anwendbaren Funktionen führen können. Diese Arbeit und die vorherigen Arbeit lassen einen potentiellen Nutzen von der NFAT Aktivierung vermuten, zumindest in der initialen Phase (Anwar et al., 2005; Kögler et al., 2006). Dies kann sich von Langzeituntersuchungen bzw. Langzeiteffekten unterscheiden. Die verschiedenen Zielproteine, die für diese Unterschiede verantwortlich sind, sollte in der Zukunft näher bestimmt werden.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Ang II Signaltransduktion. Als wichtiger Zwischenschritt ist die Phosphorylierung der NFAT durch GSK 3β und die nachfolgende SERCA Aktivierungsmöglichkeit zu nennen.**

## 5. Zusammenfassung

Die pharmakologische Hemmung der Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems ist einer der Hauptoption der therapeutischen Möglichkeiten bei der Behandlung von Patienten mit Herzfunktionsfehler. Diese experimentelle Arbeit stellte die Hypothese auf, dass Angiotensin II (Ang II) selbst die kontraktile Funktion der Zelle (Zellverkürzung) herabsetzt in dem es Transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) aktiviert.

Des Weiteren vermutet man, dass eine Hemmung der Glykogen-Synthase Kinase 3- $\beta$  (GSK) zur einer Kompensation dieses Effektes führen würde, und zwar durch Anhebung der SERCA2 Expression.

Es wurden isolierte Myozyten der Ventrikel von adulten Ratten in Anwesenheit von Ang II (100 nM) als Übernachtskulturen verwendet. Zellverkürzung und andere dynamische Zellparameter wurden bei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz) registriert. Immunblot-Verfahren kombiniert mit Elektrogelphorese wurden verwendet, um die NFAT Aktivierung, bedingt durch die Hemmung der GSK, und die Steigerung der SERCA Expression zu demonstrieren. Ang II führt zu einer Abnahme der Zellverkürzung um nahezu 20%. Dieser Ang II- abhängige Effekt wurde durch Inkubation mit TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) nachgeahmt. Geschwächt wurde dieser Effekt durch die Zugabe von Aprotinin, welches die proteolytische Aktivierung des TGF- $\beta_1$  blockierte, oder durch Zugabe neutralisierender Antikörper, die direkt gegen TGF- $\beta_1$  wirkten. Die Hemmung der GSK aktiviert NFAT, erhöht die SERCA2 Expression und verbessert die Zellfunktion.

Diese Arbeit machte einen parakrinen Mechanismus durch Ang II-abhängige Herzfunktionsminderung deutlich, welche zunächst unabhängig von hämodynamischen Änderungen sind. Außerdem beschreibt sie den Unterschied zwischen Ang II und  $\alpha$ -Adrenorezeptoren Stimulation bezüglich der Aufrechterhaltung der Zellfunktion, zellulären Reaktionen und den Unterschied zwischen adaptiven (physiologischen) und mal-adaptiven (patho-physiologischen) Hypertrophie.

## Summary

Pharmacological inhibition of components of the renin-angiotensin-system is one of the major therapeutically options to treat patients with heart failure. This study hypothesized that angiotensin II (Ang II) directly depresses contractile function (cell shortening) by activation of transforming growth factor-beta<sub>1</sub> (TGF-beta<sub>1</sub>). Moreover, we hypothesized that an inhibition of glycogen synthase kinase 3-beta (GSK<sub>3</sub>) will compensate for this depressive effect by increasing SERCA2 expression. Isolated adult ventricular rat cardiomyocytes were used and cultured in the presence of Ang II (100 nM) for 24 h. Cell shortening and contractile dynamics were recorded at 2 Hz. Immunoblot techniques and gel mobility shift assays were used to demonstrate NFAT activation caused by inhibition of GSK and to demonstrate increases in the expression of SERCA2. Ang-II caused a nearly 20% decrease in cell shortening. This Ang II-dependent effect was mimicked by TGF-beta<sub>1</sub> (10 ng/ml), attenuated by addition of aprotinin, that was used to block the proteolytic activation of TGF-beta<sub>1</sub>, or by application of a neutralizing antibody directed against TGF-beta<sub>1</sub>. Inhibition of GSK activated NFAT, increased SERCA2 expression and improved cell function. In conclusion, the study identified a paracrine mechanism for the Ang II-dependent loss of cardiac function that occurs independently of hemodynamic changes. Furthermore, it characterized the differences between Ang II and alpha-adrenoceptor stimulation with respect to the maintenance of cellular function explaining cellular events contributing to the difference between adaptive (physiological) and mal-adaptive (patho-physiological) hypertrophy.

**Literaturverzeichnis**

1. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al., for the Val-HeFT Investigators: Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* (2003); 107: 1278–83.
2. Anwar A, Taimor G, Korkususz H, Schreckenber R, Berndt T, Abdallah Y, Piper HM, Schlüter K-D. (2005). PKC-independent signal transduction pathways increase SERCA2 expression in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39:911-919.
3. Ardaillou R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biologic effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (1997); 6: 28–34.
4. Baker DW, Einstadter D, Thomas C, Cebul RD: Mortality trends for 23,505 Medicare patients hospitalized with heart failure in Northeast Ohio, 1991 to 1997. *Am Heart J* (2003); 146: 258–64.
5. Benedict CR, Johnstone DE, Weiner DH, et al.: Relation of neurohumoral activation to clinical variables and degree of ventricular dysfunction: a report from the Registry of Studies of Left Ventricular Dysfunction. SOLVD Investigators. *J Am Coll Cardiol* (1994); 23: 1410–20.
6. Bernstein KE, Berk BC. The biology of angiotensin II receptors. *Am J Kidney Dis* (1993); 22: 745–54.
7. Boluyt, M. O., O'Neill, L., Meredith, A. L., Bing, O. H., Brooks, W. W., Conrad, C. H., Crow, M. T. & Lakatta, E. G., (1994) Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 75, 23-32.
8. Braam B, Koomans H. Renal responses to antagonism of the renninangiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (1996); 5: 89–96.
9. Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garcarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camilion de Hurtado MC, Aiello EA. (2006). The positive inotropic effect of angiotensin II. *Hypertension* 47:727-734.

10. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, et al.: A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* (1991); 325: 303–10.
11. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al.: Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* (1984); 311: 819–23.
12. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS: Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the  $\alpha$ -adrenergic pathway. *Circulation* (1998); 98: 1329–34.
13. Del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. (1999). Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100:2308-2311
14. Delbosc S, Morena M, Djouad F, Ledoucen C, Descomps B, Cristol JP. (2002) Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:611-617.
15. Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LMD. (2005). Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 46:462-432.
16. Dorr M, Wolff B, Robinson DM, John U, Ludemann J, Meng W, Felix SB, Volzke H. (2005) The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90:673-7
17. Dulin N, Madhun Z, Chang C, Berti-Matera L, Dickens D, Douglas J. Angiotensin IV receptors and signaling in opossum kidney cells. *Am J Physiol* (1995); 269: F644–F652.
18. Dzau VJ, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: a paradigm shift? *Circulation* (1994); 89: 493–8.



19. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens* (1993); 11: 13–18.
20. Dzau VJ: Renal and circulatory mechanisms in congestive heart failure. *Kidney Int* (1987); 31: 1402–15.
21. Edigo J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* (1996); 49: 578–97.
22. Force T, Michael A, Kilter H, Haq S. (2002). Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. *J. Card Fail.* 8:351-358
23. Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, et al.: The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med* (1984); 101: 370–77.
24. Frey N, Olson EN. (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol* 65:45-79
25. Fuller SJ, Gaitanaki CJ, Sudgen PH. (1990) Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. *Biochem J* 266:727-736.
26. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* (1994); 90: 2126–46.
27. Garrington TP, Johnson GL. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:211-8
28. Gavras I, Gavras H. Angiotensin II-possible adverse effects on arteries, heart, brain, and kidney: experimental, clinical, and epidemiologic evidence. In: Robertson J, Nicholls M (eds.). *The renin angiotensin system*. Gower Medical Publishing, London (1993); 401–11.
29. Gibbons G, Pratt R, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. *J Clin Invest* (1992); 90: 456–61.

30. Goldman L, Hashimoto B, Cook EF, Loscalzo A: Comparative reproducibility and validity of systems of assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* (1981); 64: 1227–34.
31. Gottdiener JS, McClelland RL, Marshall R et al.: Outcome of congestive heart failure in elderly persons: influence of left ventricular systolic function. The Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med* (2002); 137: 631–39.
32. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* (1993); 87: 1816–28.
33. Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, Shah AJ. (2006). Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 47:817-826.
34. Hamawaki M, Coffmann TM, Lashus A, Koide M, Tile MR, Oliveira MI, de Freyte G, Cooper 4<sup>th</sup> G, Carabello BA. (1998). Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am J Physiol* 274:H868-H873.
35. Harade K, Komuro I, Zou Y, Kudoh S., Kijima K, Matsubara H., Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. (1998) Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice. *Circ Res* 82:779-785.
36. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. (1997) Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29:2873-92
37. Helin K, Stoll M, Meffert S, Stroht U, Unger T. The role of Angiotensin receptors in cardiovascular disease. *Ann Med* (1997); 29: 23–9.
38. Henriksen JH. (1991). Degradation of circulating renin and angiotensin. In: Degradation of bioactive substances: physiology and pathophysiology (ed. Henriksen JH). CRC press p 113-119
39. Ho KKL, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D: Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham heart study subjects. *Circulation* (1993); 88: 107–15.

40. Hoppe UC, Erdmann E, für die Kommission Klinische Kardiologie: Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* (2001); 90: 218–37.
41. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al.: ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines Committee to revise the 1995 guidelines for the evaluation and management of heart failure developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation endorsed by the Heart Failure Society of America. *J Am Coll Cardiol* (2001); 38: 2101–13.
42. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino A, Kioke A, Nogami F, Marumo F, Hiroe M. (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92:398-403
43. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F. (1993) Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87:1715-21
44. Itoh H, Mukoyama M, Pratt R, Gibbons G, Dzau VJ. Multiple autocrine factors modulate vascular smooth muscle cell growth in response to angiotensin II. *J Clin Invest* (1993); 91: 2268–74.
45. Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR. (1990) Alpha- and betaadrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J. Biol. Chem.* 265:13809-17
46. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. Renal injury from angiotensin II mediated hypertension. *Hypertension* (1992); 19: 464– 74.
47. Ju H, Scammell-La Fleur T, Dixon IM. (1996) Altered mRNA abundance of calcium transport genes in cardiac myocytes induced by angiotensin II. *J Mol Cell Cardiol* 28:1119-1128.

48. Kogler H, Schott P, Toischer K, Milting H, Van PN, Kohlhaas M, Grebe C, Kassner A, Domeier E, Teucher N, Seidler T, Knoll R, Maier LS, El Banayosy A, Korfer R, Hasenfuss G. (2006) Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase expression. *Circulation* 113:2724-2732.
49. Koibuchi Y, Lee W, Gibbons G, Pratt R. Role of transforming growth factor-beta-1 in the cellular response to angiotensin II. *Hypertension* (1993); 21: 1046–50.
50. Langer M, Lüttecke D, Schlüter K-D. (2003) Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 447:289-297.
51. Lassegue B, Griendling K, Alexander R. Molecular biology of angiotensin II receptors. In: Saavedra J, Timmermanns P (eds.). *Angiotensin II receptors*. Plenum Press, New York (1994); 17–48.
52. Levy D, Kenchaiah S, Larson M, et al.: Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* (2002); 347: 1397–02.
53. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP et al.: Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* (2002); 106: 3068–72.
54. Lo M, Liu KL, Lantelme P, Sassard I. Subtype 2 of angiotensin II receptors controls pressure-natriuresis in rats. *J Clin Invest* (1995); 95: 1394–7.
55. Lundblad A, Gonzalez-Serratos H, Inesi G, Swanson J, Paolini P. (1986) Patterns of sarcomere activation, temperature dependence, and effect of ryanodine in chemically skinned cardiac fibres. *J Gen Physiol* 87:885-905.
56. Lüscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens* (1993); 6: 283S–293S.
57. Lüscher TF. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Myocard Ischemia* (1995); 7: 15–20.

58. MacLellan WR, Schneider MD. (2000). Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu. Rev. Physiol* 62:289-319
59. Meissner A, Min J-Y, Simon R. (1998). Effects of angiotensin II on inotropy and intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and hypertrophied rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 30:2507-2518.
60. Michael A, Haq S, Chen X, Hsich E, Cui L, Walters B, Shao Z, Bhattacharya K, Kilter H, Huggins G, Andreucci M, Perissamy M, Solomon RS, Liao R, Patten R, Molkentin JD, Force T. (2004) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem* 279:21383-21393.
61. Morishita R, Hagaki J, Miyazaki M et al. Possible role of the vascular renin angiotensin system in hypertension. *Hypertension* (1996); 27: 760–5.
62. Nilsson Im, Ljungner H, Tengborn L. Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br Med J* (1985); 290: 1453–5.
63. Nozawa Y, Haruno A, Oda N et al. Angiotensin II receptor subtypes in bovine and human ventricular myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* (1994); 270: 566–71.
64. Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sunimoto H, Sato Y, Mory Y, Nagao T, Kurose H. (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25:5305-5316.
65. Parmley W. Pathophysiology and current therapy of congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* (1989); 13: 771–85.
66. Periasamy M, Huke S. (2001) SERCA pump level is a critical determinant of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 33:1053-1063.
67. Pfeffer JM, Pfeffer MA. (1988) Angiotensin converting enzyme inhibition and ventricular remodeling in heart failure. *Am J Med* 83:37-44.

68. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennett WM, Couser WG, Johnson RJ. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: Roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* (1995); 6: 1186–96.
69. Pinto YM, Pinto-Sietsma S-J, Philipp T, Engler S, Koßmehl P, Hocher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker H-J, Paul M. (2000) Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta (1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 rat. *Hypertension* 36:747-754.
70. Plotkin B, Kaidanovich O, Talior I, Eldar-Finkelman H. (2003) Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *J Pharmacol Exp Ther* 305:974-980.
71. Polanczyk CA, Rohde LE, Dec GW, SiSalvo T: Ten-year trends in hospital care for congestive heart failure: improved outcomes and increased use of resources. *Arch Intern Med* (2000); 160: 325–32
72. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR et al. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II –evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* (1993); 87: 1969–73.
73. Ritter O, Neyses L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol. Med.* 9:313-21
74. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al.: Trends in heart failure incidence and survival in a communitybased population. *JAMA* (2004); 292: 344–50.
75. Ruf S, Piper HM, Schlüter K-D. (2002) Specific role for the extracellular signal - regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 443:483-490.
76. Ruiz-Opazo N, Akimoto K, Herrera V. Identification of a novel dual angiotensin II/ vasopressin receptor on the basis of molecular recognition theory. *Nature Med* (1995); 1: 1074–81

77. Sabri A., Lucchesi P. Ang II and cardiac myocyte contractility: p38 is not stressed out!, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:72-73, (2006).
78. Sadoshima J, Izumo S. (1993) Molecular characterization of angiotensin II—induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* 73:413-23
79. Sakurai K, Norota I, Tanaka H, Kubota I, Tomoike H, Endoh M. (2002) Negative inotropic effect of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. *Life Science* 70:1173-1184.
80. Schlüter K-D, Schreiber D. (2005) Adult ventricular cardiomyocytes: Isolation and culture. *Meth Mol Biol* 290:305-314.
81. Schlüter K-D, Zhou XJ, Piper HM. (1995) Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF- $\beta$  in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 269: C1311-C1316.
82. Schorb W, Booz G, Dostal D, Conrad K, Chang K, Baker K. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* (1993); 72: 1245–54.
83. Schreckenberg R, Taimor G, Piper HM, Schlüter K-D. (2004) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC isoforms unmasks ERK-dependent hypertrophic growth evoked by phenylephrine in adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 63:553-560.
84. Schröder D, Heger J, Piper HM, Euler G. (2006) Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF- $\beta$ 1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. *J Mol Med* 84:975-983.
85. Sigurdsson A, Arntorp O, Gundersen T, et al.: Neurohumoral activation in patients with mild or moderately severe congestive heart failure and effects of ramipril. The Ramipril Trial Study Group. *Br Heart J* (1994); 72: 422–27.
86. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari S, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* (1995); 95: 651–7.

87. Sugden PH. (1999). Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ. Res.* 84:633-46
88. Taimor G, Schlüter K-D, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM. (1999) .Autocrine regulation of TGF- $\beta$  expression in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31:2127-2136.
89. Taimor G, Schlüter K-D, Piper HM. (2001). Hypertrophy-associated gene induction after beta-adrenergic stimulation in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33, 503-511.
90. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT: Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185–95.
91. Tastan H, Abdallah Y, Euler G, Piper HM, Schlüter K-D. (2007). Contractile performance of adult ventricular rat cardiomyocytes is not directly jeopardized by NO/cGMP dependent induction of pro-apoptotic pathways. *J Mol Cell Cardiol* 42:411-421.
92. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* (1987); 316: 1429–35
93. The SOLVD investigators. (1991) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Eng J Med* 325:293-302.
94. Timmermanns PBWM, Wong PC, Chiu AT et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* (1993); 45: 205–51.
95. Urata H, Boehm K, Philip A et al. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* (1993); 91: 1269–81.
96. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angio-tensin II formation in humans. *Eur Heart J* (1995); 16: 79–85.



97. Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y, Solaro RS. (2007) P38 MAPK induced dephosphorylation of  $\alpha$ -tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res* 100:408-415.
98. Van Leeuwen RTJ, Kol A, Andreotti F, Kluff C, Maseri A, Sperti G. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor type I and tissue-type plasminogen activator messenger RNA in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation* (1994); 90: 362–8.
99. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ et al.: Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: Prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* (1999); 33: 1948–55
100. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* (1995); 95: 995–1001
101. Venema RC, Kuo JF. (1993). Protein kinase C-mediated phosphorylation of troponin I and C-protein in isolated myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase. *J Biol Chem* 268: 2705-2711
102. Wada H, Zile MR, Ivester CZ, Cooper G 4<sup>th</sup>, McDermott PJ. (1996). Comperative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiocytes in primary culture. *Am J Physiol* 271:H29-H37.
103. Wasserstrom JA, Vites AM. (1996) The role of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493:529-542.
104. Wenzel S, Müller C, Piper HM, Schlüter K-D. (2005) p38 MAP kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling. *Eur J Heart Failure* 7:453-460.
105. Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schlüter K-D.(2001) Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 15,2291-2293.

106. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD. (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94:110-118.
107. Wolf G, Neilson E. From converting enzyme inhibition to angiotensin II receptor blockade: New insight on angiotensin II receptor subtypes in the kidney. *Exp Nephrol* (1996); 4: 8–19
108. Wolf G, Stahl R. Angiotensin-II-Wirkungen an der Niere: mehr als ein Vasokonstriktor. *Deutsches Ärzteblatt* (1996); 93: 47–57.
109. Yamada T, Horiuchi M, Dzau V. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci* (1996); 93: 156–60.
110. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J.Clin. Invest* 96:438-46
111. Yusuf S, Pitt B: A lifetime of prevention. The case of heart failure. *Circulation* (2002); 106: 2997–98.
112. Zierhut W, Zimmer HG. (1989) Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 65:1417-25

## ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Solaiman Mufti)

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Meine außerordentliche Wertschätzung und Dankbarkeit gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Schlüter, dessen Kompetenz und Förderung von unschätzbarem Ausmaß für das Gelingen dieser Arbeit waren. Durch seine Unterstützung und Motivation hat er mich im wissenschaftlichen Arbeiten bestärkt.

Desweiteren danke ich den Medizinisch-Technischen-Assistenten insbesondere Daniela Schreiber, Nadine Woitasky, Sergej Kechter und Peter Volk für die fachliche Unterstützung und viel Spaß.

Natürlich muss ich an dieser Stelle auch bei meiner Familie bedanken, die mich immer mit allen Mitteln unterstützt hat und mir immer hilfsbereit zur Seite stand.