

Aus der Medizinischen Klinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Beteiligung der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase an  
Wachstumsregulation und Signaltransduktion im  
Überexpressionsmodell und im Myokard transgener Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Katja Nething  
aus Kirchheim unter Teck

Würzburg, November 2002

Referent: Prof. Dr. Ludwig Neyses

Koreferent: Prof. Dr. Lutz Hein

Dekan: Prof. Dr. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2003

Die Promovendin ist Ärztin.

*Meinen Eltern*

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung	1
1.2 Die Hypertrophie des Herzens	1
1.3 Die Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	5
1.4 Überexpression der hPMCA 4CI in Zellmodell und transgenem Tier	9
1.5 Caveolae – „hot spots“ der Signaltransduktion	12
1.6 Stickoxid (NO) und NO-Synthasen am Myokard	14
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Immortalisierte Zelllinien und Primärkultur	17
3.2 Nachweis der Apoptose: TUNEL-Assay	19
3.3 Wachstum und Hypertrophie: $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation	21
3.4 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie	23
<b>4. Resultate</b>	<b>26</b>
4.1 Apoptose und hPMCA 4CI-Überexpression	26
4.2 Wachstum und hPMCA 4CI-Überexpression	29
4.3 Kolokalisation der hPMCA 4CI mit Caveolin-3 in neonatalen Kardiomyozyten	34
4.4 Mögliche Interaktion zwischen Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und NO-Synthase in neonatalen Kardiomyozyten	38
<b>5. Diskussion</b>	<b>41</b>
5.1 Apoptose und hPMCA 4CI-Überexpression	41
5.2 Wachstum und hPMCA 4CI-Überexpression	44
5.3 Kolokalisation der humanen Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Isoform 4CI mit Caveolin-3 in neonatalen Kardiomyozyten	52

5.4	Modulation der Wachstumsantwort neonataler Kardiomyozyten unter NOS-Inhibition	56
5.5	Ausblick	63
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Appendix</b>	<b>86</b>
8.1	Abkürzungen	86
8.2	Verwendete Chemikalien und Materialien	87
8.3	Geräteverzeichnis	89
8.4	Verwendete Lösungen und Puffer	89
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	

# **1 Einleitung**

## **1.1 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der molekularbiologischen Untersuchung eines Membranproteins dessen Funktion im Herzen näher zu charakterisieren.

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, im folgenden kurz PMCA genannt, ist ein ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommendes Enzym, dessen Aufgabe der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle ist.

Kalziumionen gehören zu den wichtigsten und am feinsten regulierten Botenstoffen im Myokard, sie sind unverzichtbar für die Funktion des Herzmuskels.

Einer Analyse der an der Kalziumhämöostase beteiligten Proteine und Mechanismen kommt somit besondere klinische Bedeutung zu, da Störungen dieses Gleichgewichts bei pathologischen Vorgängen beobachtet werden können, etwa im Rahmen der Herzinsuffizienz (Hasenfuss, 1998).

## **1.2 Die Hypertrophie des Herzens**

### **1.2.1 Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie**

Herzinsuffizienz bezeichnet das Unvermögen des Herzens, den Anforderungen der Peripherie an arteriellem Zufluß und venösem Abfluß gerecht zu werden. Bevor diese Symptome eines kombinierten Vorwärts- und Rückwärtsversagens manifest werden, versucht der Herzmuskel über bestimmte Mechanismen an die pathologisch veränderten Zustände zu adaptieren. Die kardiale Hypertrophie als kompensatorischer Anpassungsmechanismus kann bei nahezu allen Erkrankungen des Herzens auftreten.

Seit den Ergebnissen der Framingham-Studie muß in der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) jedoch nicht nur die Folge, sondern vielmehr ein eigenständiger Risikofaktor in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bis hin zum Herztod gesehen werden (Kannel et al., 1969; Levy et al., 1990).

Die zahlreichen klinischen Ursachen und Auswirkungen der LVH wurden ausführlich untersucht und dokumentiert. Lange Zeit galten vorwiegend hämodynamische Faktoren, insbesondere die Nachlasterrhöhung bei arterieller Hypertonie, als ursächlich für die Entstehung der Herzhypertrophie.

Zahlreiche Effekte bestimmter Herzmedikamente können jedoch mit diesem Ansatz nicht erklärt werden, beispielsweise die Wirkung der ACE- („angiotensin converting enzyme“) Inhibitoren.

Dies führte zur Entwicklung des derzeit gültigen Konzepts, in dem als wesentlicher Faktor die Aktivierung neuroendokriner Systeme gesehen wird (Packer, 1993).

Zu den neuroendokrinen Systemen zählen unter anderem das sympatho-adrenerge sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).

Im Rahmen dieses Modells bekommt die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene eine zentrale Bedeutung.

## 1.2.2 Molekulare Veränderungen bei Herzhypertrophie

### 1.2.2.1 Allgemeine Veränderungen

Unter einem hypertrophierten Herzen ist definitionsgemäß ein Herz zu verstehen, das in Größe und Gewicht bestimmte, durch Alter, Geschlecht sowie Körpergewicht vorgegebene Normwerte überschreitet.

Der Herzmuskel ist postmitotisches Gewebe, eine Proliferation im Sinne einer Hyperplasie, also einer Zunahme der Kardiomyozytenzahl, ist vermutlich nicht oder nur in geringem Umfang möglich.

Bewirkt wird die Massenzunahme des Herzens durch myozytäre Hypertrophie, d. h. Volumenvergrößerung der einzelnen Herzmuskelzelle, gleichzeitige Hyperplasie der teilungsfähigen Nicht-Myozyten (Fibroblasten etc.) sowie eine Vermehrung der extrazellulären Matrix.

Unter den bisher charakterisierten Veränderungen auf molekularer und genetischer Ebene werden einige als pathognomonisch für die myokardiale Hypertrophie gewertet.

Hierunter fallen die Mengenzunahme kontraktile Proteine (z. B. Myosin 2, leichte Kette) sowie das Wiederauftreten embryonaler Proteinmuster, beispielsweise die Re-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) im Ventrikel (Übersicht in Chien et al., 1991).

Eine veränderte kardiale Genexpression wird in der Aktivierung eines spezifischen wachstumsvermittelnden „immediate early gene“-Programms manifest; hierzu zählen auch die sogenannten Protoonkogene (Chien et al., 1991).

Die Induktion der Herzhypertrophie kann sowohl durch mechanische Faktoren, wie Dehnung (Yamazaki et al., 1995) und Kontraktion (Clark et al., 1991), als auch über humorale Stimuli erfolgen. Zu diesen zählen unterschiedlichste Substanzgruppen, beispielsweise Katecholamine wie Noradrenalin (Simpson, 1985), aber auch Angiotensin II (Kato et al., 1989) und Endothelin-1 (Shubeita et al., 1990), um nur einige zu nennen.

#### 1.2.2.2 Kalzium und Hypertrophie

Die intrazelluläre Signalverarbeitung ist Gegenstand intensiver Forschung; zahlreiche bekannte Transduktionsmechanismen werden in Zusammenhang mit der hypertrophen Antwort am Myokard diskutiert.

Kalzium als chemisch einfach strukturiertem, in Funktion und Regulation jedoch äußerst komplexem Botenstoff, und den an der Kalziumhomöostase beteiligten Molekülen kommt hierbei eine zentrale Rolle zu.

In der Herzmuskelzelle sind vier Transportsysteme zuständig für die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration: der Natrium-Kalzium-Austauscher, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), der Natrium-Kalzium-Austauscher der Mitochondrienmembran und die calmodulinabhängige Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA).

Die Kalziumhomöostase am hypertrophierten Herzen ist signifikant verändert, alle vier Transportsysteme weisen Auffälligkeiten in Expression und Aktivität auf (Übersicht in Dhalla et al., 1996).



Bei Patienten mit Herzinsuffizienz läßt sich in klinischen Studien für die SERCA eine Abnahme in Aktivität und Expression nachweisen (Arai et al., 1994; Hasenfuss et al., 1994), für den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher hingegen eine Steigerung (Studer et al., 1994; Hasenfuss et al., 1999).

In Untersuchungen am Rattenherzen bestätigte sich die Beobachtung eines entgegengesetzten Expressionsmusters dieser beiden Enzyme (Vetter et al., 1995).

Auch für die PMCA liegen bereits Hinweise auf eine Beteiligung an Differenzierungs- und Wachstumsregulation in Muskelzellen und Kardiomyozyten vor (Hammes et al., 1996; Hammes et al., 1998).

### 1.2.2.3 Apoptose und kardiales Remodeling

Die Umbauvorgänge des druckbelasteten Herzens, das sogenannte Remodeling, umfassen die Hypertrophie der Kardiomyozyten und die Proliferation der Nicht-Muskelzellen. Im Zuge der zunehmenden Fibrosierung gehen darüberhinaus vermehrt Zellen unter. Dieser Verlust myozytärer Zellmasse begleitet zahlreiche Formen kardiovaskulärer Erkrankungen, wie beispielsweise den Myokardinfarkt, aber auch nicht-ischämische Kardiomyopathien (Olivetti et al., 1997). Im normalen Altersherz wird ebenfalls eine Abnahme der Zellzahl beobachtet.

Dieser in scheinbarem Widerspruch zur Massenzunahme eines hypertrophierten bzw. dilatierten Herzens stehende Vorgang wurde lange Zeit mit Nekrose erklärt. Neuere Untersuchungen deuten jedoch auf eine entscheidende Rolle der Apoptose, der zweiten möglichen Form des Zelltods, hin (MacLellan und Schneider, 1997).

Unter Apoptose versteht man einen von nekrotischen Zelluntergängen morphologisch und funktionell abzugrenzenden Zelltod.

Im Synonym „programmierter Zelltod“ wird ein wesentlicher Unterschied zur Nekrose deutlich: der apoptotische Zelluntergang ist genetisch determiniert (Majno und Joris, 1995). Er folgt einem kontrollierten, zeitlich und strukturell genau festgelegten Ablauf.

Apoptotische Zellen zeigen charakteristische Merkmale, wie beispielsweise ein Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Zytoplasmas und die Fragmentierung des Zellkerns (Teiger et al., 1996). Ebenfalls als spezifisch für Apoptose gelten nachweisbare Strangbrüche der DNA in einer Länge von 180 bp (MacLellan und Schneider, 1997).

Teiger und Mitarbeiter beschreiben eine den Wachstumsvorgängen vorangehende Welle apoptotischer Zelluntergänge im druckbelasteten Herzen der Ratte (Teiger et al., 1996). Die Mechanismen und Signalwege, über die der Eintritt einer Zelle in ihr „Suizidprogramm“ (Olivetti et al., 1997) gesteuert wird, sind Gegenstand intensiver Forschung. In diesem Zusammenhang wird auch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums als Initiator der Apoptose diskutiert (Jayaraman und Marks, 1997). Interessanterweise scheinen hierbei proliferative und apoptotische Signalwege keineswegs strikt getrennt, sondern vielmehr in Abhängigkeit voneinander abzulaufen (Cuvillier et al., 1996).

### **1.3 Die Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase**

#### 1.3.1 Allgemeine Merkmale

##### 1.3.1.1 Primärstruktur und Membrantopologie

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde erstmals 1966 von Schatzmann in Erythrozyten beschrieben (Schatzmann, 1966). Inzwischen konnte ein ubiquitäres Vorkommen dieses Enzyms in nahezu allen eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden.

Aufgabe des Membranproteins ist der Transport von Kalziumionen aus der Zelle hinaus. In nicht-exzitablen Zellen ist die PMCA das einzig bekannte System für den Efflux von Kalzium in den Extrazellulärraum, während in erregbaren Zellen wie etwa Neuronen oder Herzmuskelzellen der Natrium-Kalzium-Austauscher der Plasmamembran mehrheitlich für diesen Auswärtstransport verantwortlich zeichnet. Im Vergleich beider Ionenpumpen zeigt die PMCA eine deutlich niedrigere Kapazität, ihre Affinität zu Kalzium ist jedoch wesentlich höher (Carafoli, 1992).

Abbildung 1 zeigt ein Modell der PMCA mit den funktionellen und regulatorischen Domänen.

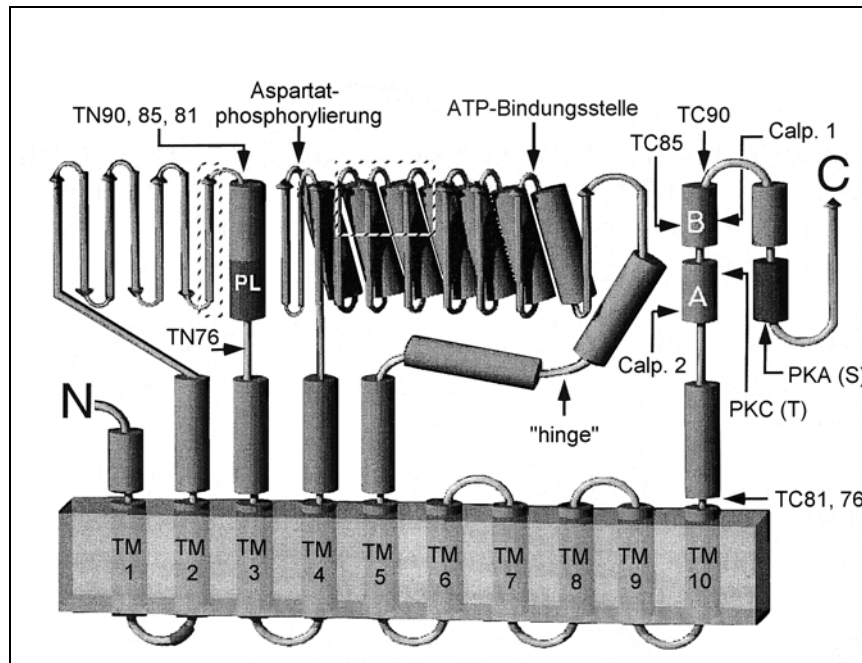


Abb. 1: Modell der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Die Bereiche **TM 1-10** bezeichnen die Transmembrandomänen des Enzyms. Zwischen TM 2 und 3, TM 4 und 5 sowie ausgehend von TM 10 ragen drei große Einheiten ins Zellinnere: 80% der molekularen Masse befinden sich im Zytosol.

Im ersten zytosolischen Komplex erfolgt die Bindung an Phospholipide (**PL**). Spaltungsstellen durch Trypsin am N-Terminus sind kenntlich gemacht durch **TN**, am C-Terminus durch **TC**; es folgen die resultierenden Fragmentlängen (**76, 81, 85, 90**) in kDa.

Die katalytische Domäne der **Aspartatphosphorylierung** befindet sich in der zweiten Zytosoleinheit, ebenso wie die **Bindungsstelle für Adenosintriphosphat (ATP)**.

Die Modellvorstellung der Autoinhibition wird verdeutlicht durch ein langes, flexibles Intermediat nach Art eines Scharniers (engl. „**hinge**“).

**Calp. 1/ Calp. 2:** Calpain, eine intrazelluläre, kalziumabhängige Protease, spaltet die PMCA im dritten großen zytosolischen Abschnitt an zwei Stellen. Hier befindet sich die **calmodulinbindende Domäne**, unterteilt in zwei Subdomänen **A** und **B**, lokalisiert. **PKC (T)** bezeichnet einen Threoninrest, **PKA (S)** einen Serinrest als Bindungsstelle für die Proteinkinase C bzw. A.

= Bindungsregion der calmodulinbindenden Domäne (Autoinhibition)

Die DNA- und somit Aminosäuresequenz dieses Enzyms ist hoch konserviert. So beträgt etwa die Homologie auf Aminosäureebene zwischen Ratte und Mensch mehr als 90% (Strehler, 1990).

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gehört zu einer Multigenfamilie: mindestens vier Gene kodieren bei Mensch und Ratte für verschiedene Isoformen, deren Vielfalt noch zusätzlich durch alternatives Spleißen erhöht wird (Brandt et al., 1992; Stauffer et al., 1993).

#### 1.3.1.2 Biochemische Grundcharakterisierung

Es handelt sich um Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 134 kDa (je nach Isoform zwischen 127,3 und 138,8 kDa) (Carafoli, 1992). Die PMCA gehört zu den ATPasen des P-Typs, im Reaktionsablauf entsteht ein phosphoryliertes Intermediat unter Beteiligung eines Aspartatrestes.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ : ATP-Stöchiometrie der Pumpe beträgt höchst wahrscheinlich 1:1. Die Frage nach der Elektroneutralität muß als nicht abschließend geklärt betrachtet werden, da Versuche an isolierten Membranen ein anderes Ergebnis nahelegen als *in vivo* vermutet wird.

Es wird hier von einem teilweise elektrogenen Transport von 1  $\text{H}^+$  für 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ausgegangen (Carafoli, 1992).

#### 1.3.1.3 Die Regulationsmechanismen

Als herausragendes Charakteristikum der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gilt die hohe Diversität regulatorischer Mechanismen (Carafoli, 1994).

Die PMCA wird, wie alle ATPasen des P-Typs, durch Vanadat und Lanthan inhibiert; ein spezifischer Inhibitor nur für die PMCA konnte bislang noch nicht gefunden werden.

Als wichtigster Aktivator gilt Calmodulin, die kalzium- und pH-abhängige Bindung führt zu einer beträchtlich erhöhten Affinität für Kalzium ( $K_m$  sinkt von 10-20  $\mu\text{M}$  auf  $<0.5 \mu\text{M}$ ) sowie gesteigerter maximaler Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) des Enzyms.

Die Calmodulin-Bindungsdomäne (s. Abb. 1) besitzt eine autoregulatorische Funktion. In Abwesenheit von Calmodulin übt diese Domäne eine sterische Inhibition des Substratzugangs zum katalytisch aktiven Zentrum der PMCA aus (Vorherr et al., 1990). Bindung von Calmodulin bewirkt eine Konformationsänderung, aus der eine Aktivierung des Enzyms resultiert.

Außer Calmodulin sind Interaktionen mit sauren Phospholipiden oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Oligomerisierung und limitierte Proteolyse durch Trypsin oder Calpain an der Regulation von Aktivität und Funktion der Pumpe beteiligt (Übersicht in Carafoli und Stauffer, 1994). Phosphorylierung durch Proteinkinase A (Neyses et al., 1985) und Proteinkinase C (Wang et al., 1991) beeinflusst ebenfalls die Aktivität.

### 1.3.2 Bisherige Analysen zur Funktion

Die Steuerung jedes einzelnen Kontraktions-Relaxations-Zyklus am Herzen erfolgt durch Anstieg und Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration; eine präzise Kontrolle dieser Ionenflüsse von Schlag zu Schlag ist unerlässlich für die Funktion des Herzmuskels.

Im Ventrikel der Ratte wird die Kalziumkonzentration im Zytosol zu 92% durch Rücktransport ins sarkoplasmatische Retikulum abgesenkt, lediglich 7% pumpt der Natrium-Kalzium-Austauscher in den Extrazellulärraum (Bers et al., 1993). Der Beitrag der PMCA ist quantitativ somit vernachlässigbar. Die hohe Affinität führte zur Annahme einer Funktion des Enzyms in der Feinabstimmung des Kalziumtransports aus der Zelle hinaus (Carafoli, 1991).

Neuere Untersuchungen weisen auf eine Rolle der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Regulation langfristiger zellulärer Prozesse, wie etwa Proliferation oder Differenzierung, hin.

Hammes konnte in Muskelzellen eine differenzierungsabhängig veränderte Isoformexpression der PMCA zeigen (Hammes et al., 1994). Die myogene Differenzierung PMCA-überexprimierender Myoblasten ist signifikant beschleunigt (Hammes et al., 1996).

Eine veränderte Proliferationsrate glatter Muskelzellen mit PMCA-Überexpression wurde von Husain und Mitarbeitern beschrieben (Husain et al., 1997). Auch in Ovarialzellen chinesischer Hamster („chinese hamster ovary“; CHO) beeinflusst die Überexpression der sarkolemmalen Kalziumpumpe den Wachstumsprozeß (Guerini et al., 1995). Eine inhibierte Neuritensprossung nach Blockade der PMCA 1 durch Expression eines anti-sense Konstrukts konnte in Phäochromozytomzellen beobachtet werden (Brandt et al., 1996).

## **1.4 Überexpression der hPMCA 4CI in Zellmodell und transgenem Tier**

Die Überexpression der humanen Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Isoform 4CI (kurz hPMCA 4CI) wurde in der Arbeit von Dr. Annette Hammes (Dissertation, Bonn 1997) in zwei verschiedenen Modellen erreicht: einer Zelllinie aus Myoblasten sowie durch Generierung transgener Rattenlinien.

### 1.4.1 Die L6-Myoblastenkultur

Bei den L6-Zellen handelt es sich um ein etabliertes Modell zur Untersuchung spezifischer Parameter des Skelettmuskels, wie beispielsweise myogene Differenzierung, Kontraktilität etc..

Die Stammzellen der L6-Linie wurden 1968 aus der Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten isoliert (Yaffe, 1968; Richler und Yaffe, 1970). Als immortalisierte Zelllinie bietet sie gegenüber der Primärkultur entscheidende Vorteile, u. a. eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Experimente sowie die Unabhängigkeit vom Tierversuch.

Spezielle Kulturbedingungen (Konfluenz, Zugabe von Pferdeserum) induzieren die Fusion der Myoblasten zu multinukleären Myotuben, ein anschauliches Modell für den Differenzierungsprozeß des Muskels.

In der Arbeit von Hammes wurde die humane Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Isoform 4CI in L6-Zellen stabil zur Überexpression gebracht und mittels G 418-Selektion resistente Klone isoliert (Hammes et al., 1996). Zusätzlich wurden Kontrollklone etabliert, die einen pCMV-neo-Vektor ohne cDNA der hPMCA 4CI trugen.

Am Klon L6-4N, der die stärkste Expression der hPMCA 4CI aufwies, beziehungsweise am korrespondierenden Kontrollklon neo5 wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Die weitere Arbeit von Hammes erbrachte den Nachweis der funktionellen Aktivität der überexprimierten Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in den L6-Zellen; mittels FURA-2 Technik wurde eine Senkung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um 20-30% gegenüber Kontrollen beobachtet (A. Hammes, Dissertation 1997).

Die L6-Klone mit hPMCA 4CI-Überexpression zeigten eine signifikant beschleunigte myogene Differenzierung im Vergleich zu den parentalen L6-Myoblasten und den neomycinresistenten Kontrollklonen (Hammes et al., 1996).

Somit führten die Analysen am stabil transfizierten Zellmodell zu einer ersten Bestätigung der Hypothese, daß die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eine Rolle in der Regulation langfristiger zellulärer Parameter übernimmt.

Inwieweit die PMCA-Überexpression außer der muskelspezifischen Differenzierung auch andere Parameter in den L6-Klonen beeinflußt, sollte am Beispiel der Apoptose in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden.

#### 1.4.2 Die transgene Rattenlinie 1142

Versuche, eine stabile Zelllinie für Kardiomyozyten zu etablieren, sind bislang weltweit gescheitert.

Um die an L6-Zellen gewonnenen Resultate zur Funktion der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurde ein transgenes Tier als Überexpressionsmodell generiert. Es konnten mehrere Rattenlinien mit stabiler PMCA-Überexpression etabliert werden (A. Hammes, Dissertation 1997; Hammes et al., 1998).

Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden an transgenen Ratten der Linie 1142 durchgeführt.

Tiere dieser auf dem Sprague-Dawley Rattenstamm basierenden Linie tragen die cDNA der humanen PMCA Isoform 4CI unter der Kontrolle des ventrikelspezifischen Promotors MLC-2v in ihrem Genom.

Zur Grundcharakterisierung der Linie 1142 wurde die mRNA-Expression im Northern Blot bestätigt, die gewebsspezifische Analyse lokalisierte die intensivste Expression im Ventrikel, schwächere Signale zeigten Hirn und Lunge.

Auf Proteinebene konnte in neonatalen eine ca. 2,5-fach und in adulten Tieren eine 1,7-fach höhere PMCA-Expression im Myokard gegenüber SD-Kontrolltieren nachgewiesen werden.

In Korrelation hierzu ergaben Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität eine 77%ige Steigerung in hPMCA 4CI-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu SD-Wildtypkontrollen.

Konsekutive Veränderungen anderer endogener  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsysteme durch die gesteigerte PMCA-Expression, wie sie etwa Guerini und Mitarbeiter für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des endoplasmatischen Retikulums in CHO-Zellen mit stabiler hPMCA 4CI-Überexpression beschrieben haben (Guerini et al., 1995), konnten in den Tieren der Linie 1142 ausgeschlossen werden.

Die transgenen Ratten der Linie 1142 zeigen keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Sie weichen weder hinsichtlich Körpergewicht und -größe, Fertilität, Verhalten, noch im Bewegungsmuster von den genetisch unveränderten SD-Tieren ab.

Auch histologische und hämodynamische Untersuchungen an 12 Wochen alten Tieren ergaben keinen Anhaltspunkt für strukturelle und/oder funktionelle Anomalien des Herzens. Analysen der kardialen Funktion im höheren Lebensalter der Tiere stehen jedoch noch aus.

Eine möglicherweise veränderte Antwort auf vermehrte Volumen- oder Druckbelastung durch Techniken wie beispielsweise aortic banding wird gegenwärtig geprüft.



In der vorliegenden Arbeit sollte durch Experimente an isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten die Funktion der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Myokard weiter analysiert werden. Die Resultate aus Versuchen in der L6-Myoblastenkultur sowie erste Ansätze in Primärkulturen aus Kardiomyozyten setzten den Schwerpunkt auf die Untersuchung zellulärer Parameter wie Apoptose und Wachstum.

Fujimoto lokalisierte in mikroskopischen und histochemischen Untersuchungen die PMCA erstmals in Caveolae, speziellen Subkompartimenten der Plasmamembran (Fujimoto, 1993).

Dies bildet den Ausgangspunkt der Hypothese einer möglichen Rolle der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Regulation und Koordination zellulärer Prozesse, da in den Caveolae zentrale Schaltstellen der Signaltransduktion gesehen werden (Lisanti et al., 1994).

### **1.5 Caveolae – „hot spots“ der Signaltransduktion**

Caveolae (oder Mikrodomänen) sind 70-100 nm große Invaginationen der Plasmamembran, die erstmals in den 50er Jahren dieses Jahrhunderts beschrieben wurden (Palade, 1953; Yamada, 1955).

Studien zur Morphologie dieser Subkompartimente zeigen wechselnde Strukturen und Erscheinungsarten: flach ausgezogene oder ganz eingesenkte, mehrere gebündelte oder einzeln auftretende Caveolae und in Abhängigkeit von der Zellart stark variierende Anzahlen wurden beobachtet (Goto et al., 1990).

Ihre exakte Funktion ist bis heute nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde die Theorie einer spezifischen Transportfunktion für kleine (Potozytose) und große Moleküle (Transzytose) erwogen. Somlyo sah in den Caveolae Orte des Austauschs und Transports von Kalziumionen (Somlyo, 1985).

Eine Funktion der Caveolae in der Signaltransduktion wurde erstmals 1991 von Strosberg vermutet (Strosberg, 1991). Inzwischen konnten zahlreiche Resultate neuerer Arbeiten Strosbergs Hypothese stützen, so daß die Einschätzung von Caveolae als Regionen der Prozessierung zellulärer Signale mittlerweile favorisiert wird.

Zentrale Komponenten der transmembranären Signalvermittlung wurden bereits in Caveolae lokalisiert. Hierzu zählen Moleküle verschiedenster Zugehörigkeit: Enzyme, die aus extrazellulären Substraten Botenstoffe generieren, beispielsweise die endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Feron et al., 1996), hochaffine Bindungsstellen, wie z. B. der muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor (Raposo et al., 1987) und die heterotrimeren G-Proteine, zentrale Schaltstellen der transmembranären Signalkaskaden (Sargiacomo et al., 1993).

Caveolin, ein 22 kDa Strukturprotein, scheint die Hauptkomponente der caveolären Membran zu sein (Rothberg et al., 1992). Mehrere Isoformen, die gewebe- und differenzierungsabhängig exprimiert werden, bilden eine Multigenfamilie (Scherer et al., 1996).

Caveolin kann die Rolle eines membrangebundenen Chaperons übernehmen, indem es mit Signalmolekülen interagiert und sie dadurch im inaktiven Zustand in den Caveolae bindet (Anderson, 1993; Couet et al., 1997a).

Aus dieser Beobachtung entwickelten Lisanti und Mitarbeiter eine Hypothese zur caveolären Signalübertragung: die Kompartimentierung zentraler Moleküle der Signaltransduktion in Caveolae erlaubt rasches und effizientes Koppeln aktivierter Rezeptoren an mehrere Effektorsysteme (Lisanti et al., 1994).

Couet identifizierte als Bindungsstellen gemeinsame Motive in der Aminosäuresequenz der mit Caveolin interagierenden Proteine (Couet et al., 1997b).

Ausgehend von der Signaltransduktionshypothese nach Lisanti, stellt sich die Frage nach den Interaktionspartnern der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in den Caveolae. Hierbei sind besonders Proteine von Interesse, die ebenfalls an der Umwandlung eines extrazellulären Signals zur intrazellulären Botschaft beteiligt sind.

## 1.6 Stickoxid (NO) und NO-Synthasen am Myokard

### 1.6.1 Überblick: NO – Entstehung und Wirkung

Stickoxid (NO) ist einer der kleinsten (rel. Molekulargewicht 30), bezüglich Regulation und Wirkung jedoch komplexesten Botenstoffe der Zelle.

Stickoxid ist in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse des Herz-Kreislaufsystems involviert (Nathan und Xie, 1994; Moncada und Higgs, 1993).

So beeinflusst es entscheidend den Tonus der Gefäße, die Thrombozytenaggregation wird inhibiert und als autokriner Mediator ist NO an der Modulation zellulärer Signale für Wachstum und Apoptose beteiligt (Moncada und Higgs, 1993; Peunova et al., 1996).

Aus der Aminosäure Arginin entstehen in einer Reaktion, die von einer Isoform des Enzyms NO-Synthase (NOS) katalysiert wird, NO und Citrullin.

Bislang sind drei Isoenzyme bekannt, die aus verschiedenen Geweben isoliert wurden und daher als neuronale (nNOS, NOS-I), endotheliale (eNOS, NOS-III) und induzierbare (iNOS, NOS-II) NO-Synthasen bezeichnet werden (Michel und Feron; 1997). Endotheliale und neuronale NOS sind konstitutiv exprimierte, kalzium- und calmodulinabhängige Isoenzyme. Die Expression der iNOS ist dagegen induzierbar, ihre Aktivität wird nicht durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin reguliert (Marletta, 1994).

Die neuronale NOS wird, neben ihres abundanten Vorkommens in neuralem Gewebe (Schmidt et al., 1992), auch im Reizleitungssystem des Herzens exprimiert (Kelly et al., 1996). In kardialen Myozyten konnte die Expression der eNOS (Balligand et al., 1995) nachgewiesen werden, ebenso die durch Zytokinstimulation induzierbare iNOS (Balligand et al., 1994).

### 1.6.2 Die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die endotheliale Isoform der NOS konnte in Caveolae nachgewiesen werden (Feron et al., 1996). Sie ist verantwortlich für die NO-Synthese in Endothelzellen der Gefäße, was aufgrund der vasodilatierenden Wirkung zur Erstbeschreibung des NO als „endothelium derived relaxing factor“ durch Furchgott und Zawadzki führte (Furchgott u. Zawadzki, 1980).

Wie die PMCA, ist auch die eNOS ein kalzium- und calmodulinabhängiges Enzym (Marletta, 1994). Außer in Endothelzellen konnte die eNOS auch in Kardiomyozyten, in Zellen des kardialen Reizleitungssystems sowie in bestimmten Blutzellen nachgewiesen werden (Kelly et al., 1996).

Dieses Enzym unterliegt einer komplexen Regulation durch posttranslationale Modifikationen, die Aktivität, Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen. Hierzu zählt die Phosphorylierung eines Tyrosinrests (Garcia-Cardena et al., 1996), die Bindung an Caveolin (Ju et al., 1997) und die Alkylierung durch die Fettsäuren Myristat und Palmitat (Feron et al., 1998). Es wird vermutet, daß die eNOS einen Regulationszyklus durchläuft, in dem Kalzium-Calmodulin die Aktivierung, Caveolin dagegen die Inhibition des Enzyms bewirkt, wobei die reversible Bindung an die Fettsäure Palmitat ein Steuerungselement darstellt (Michel und Feron, 1997).

Aufgrund der Analogie in Lokalisation und Regulation bietet die eNOS und damit der NO-Signalweg einen interessanten Ansatz zur Untersuchung möglicher Interaktionen mit der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die trotz eingehender biochemischer Charakterisierung dieses Enzyms unklar bleibt, weiter aufgeklärt werden.

Zugrundegelegt wurde die Hypothese einer Rolle der PMCA in Regulation und Modulation langfristiger Parameter der Zellphysiologie, wobei speziell ein Einfluß auf Apoptose und Wachstum untersucht wurde.

Für diese auf den ersten Blick konträr erscheinenden Programme der Zelle wird zwischenzeitlich eine enge Verknüpfung der Signalwege vermutet (Teiger et al., 1996; Cuvillier et al., 1996). Beide Vorgänge unterliegen der Regulation durch kalziumvermittelte Signaltransduktion, was den Ansatz zur Untersuchung eines an der Kalziumhomöostase beteiligten Membranproteins wie der PMCA bietet.

Die kürzlich erfolgte Lokalisation der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Caveolae (Fujimoto, 1993) mit zahlreichen anderen an der Signaltransduktion beteiligten Molekülen, wie etwa der eNOS, G-Proteinen, spezifischen Kinasen, Rezeptoren etc. (Übersicht in Couet et al., 1997b), sollte weiter analysiert werden.

In den Kardiomyozyten wurde der Einfluß catecholaminerger Stimuli zur Hypertrophieinduktion, Isoproterenol und Phenylephrin, auf Unterschiede zwischen hPMCA 4CI-überexprimierenden gegenüber wildtypischen Zellen geprüft.

Weiterhin sollte durch die Anwendung eines NO-Synthaseinhibitors, L-NAME, die Frage nach der Rolle des Stickoxid (NO) in der Modulation myokardialen Wachstums bearbeitet werden. Von besonderem Interesse war hierbei der Gedanke einer möglichen Interaktion zwischen eNOS und der PMCA, und somit einer Verknüpfung der Signalwege von Kalzium und NO.

## **3 Material und Methoden**

Die im Methodenteil verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien, sowie die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer befinden sich im Appendix.

### **3.1 Immortalisierte Zelllinien und Primärkultur**

#### **3.1.1 Die L6-Myoblastenkultur**

Die L6-Zelllinie stammt ursprünglich von Zellen einer Primärkultur ab, die aus dem Oberschenkelmuskel neonataler Ratten gewonnen wurde (Yaffe, 1968; Richler und Yaffe, 1970).

Die L6-Zellen wurden in einem Steri-Cult 200 Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS, „fetal calf serum“) kultiviert. Zur Gewährleistung der Sterilität wurde das Medium mit Gentamicin in einer Konzentration von 2,5 µl/ml versetzt.

Bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Inkubation mit 1x Trypsin/EDTA für 5 Minuten bewirkte ein Lösen der Zellkontakte, die Zellen konnten in DMEM resuspendiert und auf neue Kulturschalen aliquotiert werden.

#### **3.1.2 Isolierung und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten**

##### **3.1.2.1 Präparation**

Die Präparation der Kardiomyozyten aus 1-2 Tage alten transgenen und wildtypischen Sprague-Dawley (SD) Ratten erfolgte mit kleineren Modifikationen nach der Methode von Simpson und Savion (Simpson und Savion, 1982).

Nach Dekapitation und Thorakotomie wurden die Herzen steril entnommen, mechanisch zerkleinert und zum Verdau in CBFHH („calcium and bicarbonate-free Hanks with HEPES“) mit Trypsin und DNase überführt.

Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden zusätzlich die Zell- und Faserverbände gelöst, so daß nach Verwerfen der ersten Überstände Kardiomyozyten abgenommen werden konnten. Diese wurden in FCS überführt, um die Aktivität des Trypsins zu beenden. Nach Zentrifugation mit 700 g (1600 rpm, 27°C, 10 min.) wurde das resultierende Pellet in MEM mit 5% FCS resuspendiert.

### 3.1.2.2 „Pre-Plating“

Ein anschließendes Pre-Plating im Inkubator (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) für eine Stunde diente der Reduzierung des Anteils unerwünschter Zellpopulationen (Nicht-Kardiomyozyten), wie beispielsweise Fibroblasten und Leukozyten. Aufgrund ihrer höheren Dichte und anderer Eigenschaften sinken diese Zellen schneller ab; sie heften sich früher als Herzmuskelzellen am Boden der Kulturschale an.

Zusätzlich erfolgte die Aussaat auf Kulturschalen durch ein Zellsieb. Bei Abnahme des Überstandes der Kulturschale nach einer Stunde ergab sich somit eine Zellsuspension mit einem Kardiomyozytenanteil von mehr als 90%.

Die Auswertung der Zellzahlen mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer ergab durchschnittliche Effizienzen von etwa 3,6 Mio. präparierter Myozyten pro Herz.

### 3.1.2.3 „Plating“

Das Plating, d. h. die Aussaat der gewonnenen Zellen auf die Kulturschalen, erfolgte in MEM mit 5% FCS in einer Dichte von 25000-30000 Zellen pro cm<sup>2</sup> („low density culture“). Das Medium enthielt 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) in einer Endkonzentration von 0,1 mM. Dies bedeutete eine zusätzliche Sicherung der Kulturreinheit, da BrdU als Antimetabolit (Basenanalogen) zytotoxisch auf proliferierende Zellen wie etwa Fibroblasten wirkt.

Nach 24 Stunden in MEM mit 5% FCS wurde das Medium gewechselt; es folgte die 48-stündige Kultivierung in serumfreiem MEM unter Zugabe von Transferrin und Insulin („MEM-T/I“). Durch dieses „Hungerintervall“ sollten die durch Präparation und FCS gesteigerten Syntheseaktivitäten der Zellen zur Ruhe kommen, um unspezifische Effekte zu minimieren.

### 3.2 Nachweis der Apoptose: TUNEL-Assay

Der Nachweis apoptotischer Zellen wurde mittels eines antikörpergekoppelten enzymatischen Tests durchgeführt (In situ Cell Death Detection-Kit, POD; Fa. Boehringer-Mannheim).

Prinzip dieses Assays ist der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der spezifischen Strangbrüche der DNA im Nukleus apoptotischer Zellen (Gavrieli et al., 1992).

„TUNEL“ steht hierbei für „terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated nick end labeling“. Die Transferase bindet fluoresceinmarkierte Nukleotide an die freien 3'OH-Enden („nicks“) der DNA-Fragmente. Das Fluorescein wird durch den Anti-Fluorescein Antikörper detektiert, der mit Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugiert ist. Zugabe des Substrats nach Angaben des Herstellers führt nach Ablauf der enzymatischen Reaktion zur spezifischen Färbung der apoptotischen Zellen.

Der TUNEL-Assay wurde sowohl an L6-Kulturen als auch an neonatalen Kardiomyozyten zum Nachweis apoptotischer Zellen eingesetzt.

Für beide Zellkulturen gelten die unter 3.1 beschriebenen Kultivierungsmethoden.

Die L6-Myoblasten wurden bei Erreichen von ca. 60%iger Konfluenz für die Versuche verwendet, um die Beeinflussung der Apoptoserate durch ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte und dadurch induzierte Differenzierung zu minimieren.

Die neonatalen Kardiomyozyten wurden in niedriger Dichte kultiviert (ca. 25000 Zellen/cm<sup>2</sup>).

Die Fixierung der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS-Pufferlösung („phosphate buffered saline“, PBS) mit 2% Paraformaldehyd für 30 min. bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurde mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (30 min., RT) vorinkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidasen zu blockieren. Nach weiteren Waschschrritten mit PBS wurde die Permeabilisationslösung auf Eis für 10 min. aufgetragen.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Waschschrritte im folgenden mit einer PBS-BSA-TWEEN Lösung durchgeführt, sowie zusätzlich vor dem Auftragen der Reaktionslösungen 20 min. mit Schafserum vorinkubiert.



Die Reaktionslösungen wurden nach den Anweisungen im Protokoll des Herstellers angesetzt und für 60 min. bei 37°C in humider Atmosphäre auf den Zellen belassen. Ausgedehnte Wasch- und Blockierschritte nach Herstellerprotokoll schlossen sich an.

Im zweiten Schritt des Assays inkubierte der POD-gekoppelte Anti-Fluorescein Antikörper bei 37°C für 30 min., im Anschluß daran wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen.

Die enzymatische Reaktion wurde nun durch Zugabe des Substrats der Meerrettich-Peroxidase gestartet.

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde der Färbeumschlag verfolgt und nach ca. 4 min. die Reaktion durch Waschen mit PBS-BSA-Lösung beendet. Eine Gegenfärbung mit Methylgrün erleichterte durch Kontrasterhöhung die lichtmikroskopische Auswertung.

Abschließend wurden die Objekte unter Deckgläschen fixiert, als Eindeckmedium diente Mowiol.

Jeder Versuchsansatz wurde durch Negativkontrollen auf zwei Arten verifiziert: zum einen durch Auftragen eines inkompletten Reaktionsgemischs, zum anderen durch Felder mit POD-Antikörper ohne Substrat.

Die Auswertung erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung ohne Kenntnis des jeweiligen Parameters in vier zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern. Ermittelt wurde der Anteil Zellen mit fluoreszierendem, d. h. apoptotisch fragmentiertem, Nukleus an der Gesamtzahl Zellen dieses Gesichtsfeldes.

### 3.3 Wachstum und Hypertrophie: $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation

#### 3.3.1 Herstellung des Zell-Lysats

Die neonatalen Kardiomyozytenkulturen wurden nach der 48-stündigen Ruhephase (Tag 3 nach Präparation) für diese Versuche verwendet.

Für die Katecholaminwirkung wurden der  $\beta$ -Agonist Isoproterenol in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  sowie der  $\alpha$ -Agonist Phenylephrin in der Konzentration 20  $\mu\text{M}$  untersucht.

Die Zugabe dieser Stimuli erfolgte in MEM-T/I.

Um die Hypothese einer gegenseitigen Interaktion im Rahmen der Signaltransduktion zu verifizieren, schlossen sich Versuche mit einem Inhibitor der NO-Synthase, L-NAME (L<sup>o</sup>-Nitro-Arginin-Methylester) in der Konzentration 100  $\mu\text{M}$  an.

Stimulierte Zellen wurden gegenüber Kontrollen ohne Stimulus, d. h. Zellen in reinem Hungermedium („MEM-T/I“) ausgewertet.

Für den Einbau der mit Tritium ( $^3\text{H}$ ) radioaktiv markierten Aminosäure Leucin wurde ein Zeitraum von vier Stunden vorgegeben.  $^3\text{H}$ -Leucin wurde in einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{l/ml}$  MEM zugesetzt, dies bedeutete eine Endaktivität von 2,5  $\mu\text{Ci}$  pro ml Medium.

Nach Ende der Inkubationszeit und zweimaligem Waschen mit PBS wurden zufällig ausgewählte Gesichtsfelder der korrespondierenden Parameter (z. B. Isoproterenol 24h, jeweils wildtypische vs. transgene Kardiomyozyten) auf ihre Zellzahl hin bestimmt. Unterschiede aufgrund extrem divergierender Zellzahlen wurden somit bereits hier ausgeschlossen.

Sämtliche Versuchsansätze wurden in Doppelwerten angesetzt, um die statistische Streuung zu minimieren. Die möglichst exakte Einhaltung aller angegebenen Zeitpunkte und -abstände war ein Erfordernis der Reproduzierbarkeit dieser Versuche.

Anschließend wurde durch Zugabe von 1% Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) für 10 min. bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen bewirkt. Das Zell-Lysat diente im folgenden zur DNA-Bestimmung im Spektralphotometer sowie zur Messung der  $^3\text{H}$ -Inkorporation im Szintillationszähler.

### 3.3.2 DNA-Bestimmung

20 µl des Zell-Lysats wurden abgenommen und in 500 µl 1x SSC (sodium saline citrate) überführt. Das Anfärben der DNA geschah durch Zugabe des HOECHST-Farbstoffs 33258 in einer Verdünnung von 1:600 für 15 min. unter Lichtabschluß.

Die Absorption wurde im Spektralphotometer gegen einen Leerwert ohne Lysat, d. h. 20 µl SDS, ermittelt. Alle Messungen wurden in Doppelwerten durchgeführt.

### 3.3.3 Messung der <sup>3</sup>H-Inkorporation im Szintillationszähler

Das Protein im Zell-Lysat wurde mit kalter (ca. 4°C) 10%iger Essigsäure (TCA) zum Ausfällen gebracht, durch Zentrifugation mit 14000 g pelletiert und in 750 µl SDS 1% resuspendiert. Diese Protein-SDS-Suspension wurde mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit in Zählröhrchen überführt.

Anschließend erfolgte die Auszählung im Szintillationszähler.

### 3.3.4 Auswertung

Die ermittelten Werte für DNA und Proteingehalt wurden für jeden Parameter zueinander in das Verhältnis gesetzt. Diese cpm:DNA-Ratio diente als Maß für die relative Proteinsyntheserate.

Hypertrophie bedeutet definitionsgemäß Massenzunahme der Einzelzelle, gesteigerte Proteinsynthese erlaubt somit Rückschluß auf das Ausmaß zellulärer Hypertrophie.

Verglichen wurde hierbei zunächst innerhalb der jeweiligen Zellart stimulierter und unstimulierter Wert, z. B. Linie 1142 plus Isoproterenol vs. Linie 1142 in reinem Medium. Diese Werte, ausgedrückt in „% des Ausgangswertes“, ermöglichen einen direkten Vergleich mit der Kontrollpopulation, d. h. hPMCA 4CI-überexprimierende Linie 1142 gegenüber SD-Wildtyp.

## 3.4 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

### 3.4.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

In der indirekten Immunfluoreszenz finden Primär- und Sekundärantikörper Verwendung. Der Primärantikörper bindet an das zu detektierende Protein. Im zweiten Schritt wird nun dieser erste Antikörper von einem zweiten (Sekundär-) Antikörper nachgewiesen. Der Sekundärantikörper ist gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet. Er trägt einen Fluoreszenzfarbstoff.

Dieses Versuchsprinzip wurde bei den Kollokalisationsstudien in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 als Doppelfärbung durchgeführt. Zwei primäre Antikörper unterschiedlicher Spezieszugehörigkeit wurden parallel aufgetragen.

Mit Hilfe der entsprechend gerichteten Sekundärantikörper kann somit in einem Versuch, vor allem jedoch in einer Zelle, das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Proteine gezeigt werden.

Die Negativkontrollen wurden in diesen Experimenten auf zwei Arten durchgeführt.

Auf Zellen ohne Primärantikörper, ansonsten in analoger Weise behandelt, darf der Sekundärantikörper nichts erkennen. Anderen Zellen wurde ein Sekundärantikörper falscher Wirtsspezifität zugesetzt: Anti-mouse IgG darf einen vom Kaninchen stammenden ersten Antikörper nicht nachweisen.

### 3.4.2 Versuchsablauf

#### *1. Tag:*

Die neonatalen Kardiomyozyten wurden für diese Versuche auf zuvor autoklavierte und zur besseren Zellhaftung gelatinierte Deckgläschen ausplattiert. Die Zellen wurden auch hier nach 48stündiger Ruhephase, d. h. am dritten Tag nach Präparation, für die Versuche verwendet.

Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen in 2% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur. Eine Lösung aus PBS mit 0,1% TWEEN 20 und 1% BSA permeabilisierte und blockierte die Zellen.

Im Anschluß an das Auswaschen der Blockierlösung wurden die Primärantikörper in 1% PBS-BSA in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur Detektion der Isoform 4CI der humanen Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde der monoklonale Antikörper JA3 verwendet, der freundlicherweise von Dr. A. Filoteo und Dr. J. T. Penniston (Mayo Clinic and Foundation, Rochester, Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Isoformspezifität dieses Antikörpers wurde bereits ausführlich untersucht und dokumentiert (Borke et al., 1987; Caride et al., 1996; Filoteo et al., 1997).

Weiterhin fand der monoklonale Antikörper 5F10 (Affinity BioReagents, Hamburg) der Maus (IgG 2B Subtyp) Verwendung, der eine zytosolische Domäne der PMCA (Aminosäuren 724-783 der hPMCA 4) erkennt. Er ist weder spezies- noch isoformspezifisch.

Der Nachweis des Caveolin-3 wurde mit dem polyklonalen Anti-Caveolin-3 Antikörper (Dianova) geführt.

Wechselseitige Interferenzen der beiden Primärantikörper bei den Doppelfärbungen sollten verhindert werden, indem zunächst nur ein Antikörper über Nacht vorinkubiert. Der zweite wurde erst am nächsten Tag aufgetragen.

## *2. Tag:*

Nach zweimaligem Waschen mit PBS bei den Doppelfärbungen wurde der zweite primäre Antikörper aufgetragen und für 2 h bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe der Sekundärantikörper sollten ausgedehnte Waschschrte mit 1% BSA-PBS unspezifische Bindungen minimieren.

Verwendete Sekundärantikörper waren TexasRed konjugiertes Anti-Kaninchen IgG und Cy2™-konjugiertes Anti-Maus IgG in einer PBS-Verdünnung von 1:500 bzw. 1:250.

Der Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe wurde durch Benutzung getönter Reaktionsgefäße und Umhüllen der Kulturschalen mit Aluminiumfolie während des Arbeitens Rechnung getragen.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4°C. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden danach aus den Kulturschalen entnommen und mit der zellbehafteten Seite nach unten auf Objektträger fixiert.

Als Eindeckmedium diente Vectashield® (Fa. VECTOR).

### 3.4.3 Auswertung

Die Analyse der Färbungen erfolgte mit dem BioRad MRC 1024 Konfokalmikroskop und dessen „LaserSharp“ Software.

Diese computergestützte Bildauswertung ermöglicht die Zuordnung der Farbpixel zur jeweiligen Zellebene. Somit können Aussagen über das Verteilungsmuster des detektierten Proteins getroffen werden.

Das Vorkommen zweier Proteine in derselben Ebene stellt sich in der konfokalen Laser-mikroskopie infolge Bildüberlagerung (Superposition) in gelber Farbe dar.

## 4 Resultate

### 4.1 Apoptose und hPMCA 4CI-Überexpression

#### 4.1.1 Unveränderte Apoptoserate in L6-Myoblasten mit hPMCA 4CI-Überexpression

Der Klon L6-4N, der in Northern und Western Blot eine stabile Überexpression der humanen Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4CI zeigt (Hammes, Dissertation 1997), wurde gegenüber dem Kontrollklon L6-neo5 im TUNEL-Assay analysiert.

Erfasst werden sollte in beiden Klonen die spontane Apoptoserate ohne Stimulus, sowie die Rate apoptotischer Zellen nach Induktion durch den pro-apoptotischen Stimulus TNF- $\alpha$ .

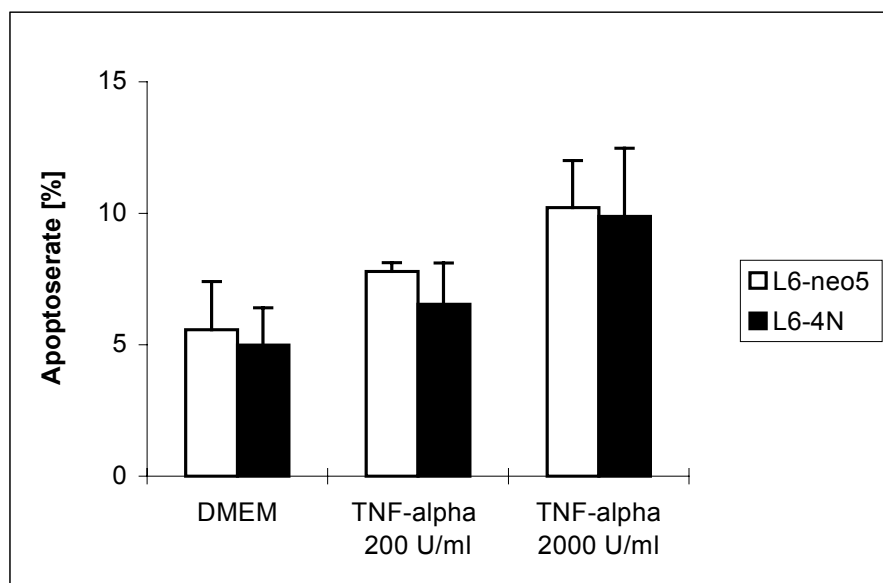


Abb. 2: TUNEL-Assay in hPMCA 4CI-überexprimierenden L6-4N Klonen und neo5-Kontrollklonen zum Zeitpunkt 12 Stunden.

Die Apoptoserate (in %) ist auf der Ordinate dargestellt, die Abszisse gibt die erfaßten Parameter an: DMEM (Medium ohne Stimulus), sowie TNF- $\alpha$  in den Konzentrationen 200 bzw. 2000 U/ml. Ausgewertet wurde nach 12 Stunden Inkubation.

n=3; Fehlerangabe als SEM (Standardfehler des Mittelwerts)

Die hPMCA 4CI-überexprimierenden L6-Klone zeigten in drei unabhängigen Experimenten keine signifikant veränderte Apoptoserate gegenüber den Kontrollklonen L6-neo5; bei reiner Mediumkultivierung (DMEM) lag die Anzahl apoptotischer Zellen in beiden Klonen bei etwa 5% (Abb.2).

Zugabe von TNF- $\alpha$  in zwei verschiedenen Konzentrationen erhöhte die Apoptoserate in den Klonen L6-neo5 und L6-4N.

Im Anstieg gegenüber dem Ausgangswert (DMEM) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen. Konzentrationserhöhung des TNF- $\alpha$  von 200 auf 2000 U/ml steigerte die Rate apoptotischer Zellen nochmals, entsprechend einer Verdoppelung des unstimulierten (DMEM) Wertes.

In diesen Versuchen beeinflusste die hPMCA 4CI-Überexpression in L6-Myoblasten weder die spontane noch die induzierte Apoptoseantwort.

#### 4.1.2 Unveränderte Apoptoserate in neonatalen Kardiomyozyten der Rattenlinie 1142

Kardiomyozyten neonataler, d. h. 1-2 Tage alter Ratten der transgenen Linie 1142 wurden mittels TUNEL-Assay analysiert. Als Vergleichsgruppe dienten Herzmuskelzellen von wildtypischen SD-Tieren gleichen Alters.

In der Auswertung der spontanen, nicht durch Zugabe eines pro-apoptischen Stimulus induzierten Apoptoserate zeigten sich über die erfaßten Zeiträume 12, 24 und 36 Stunden keine Unterschiede zwischen hPMCA 4CI-überexprimierenden und wildtypischen Kardiomyozyten (Abb. 3).



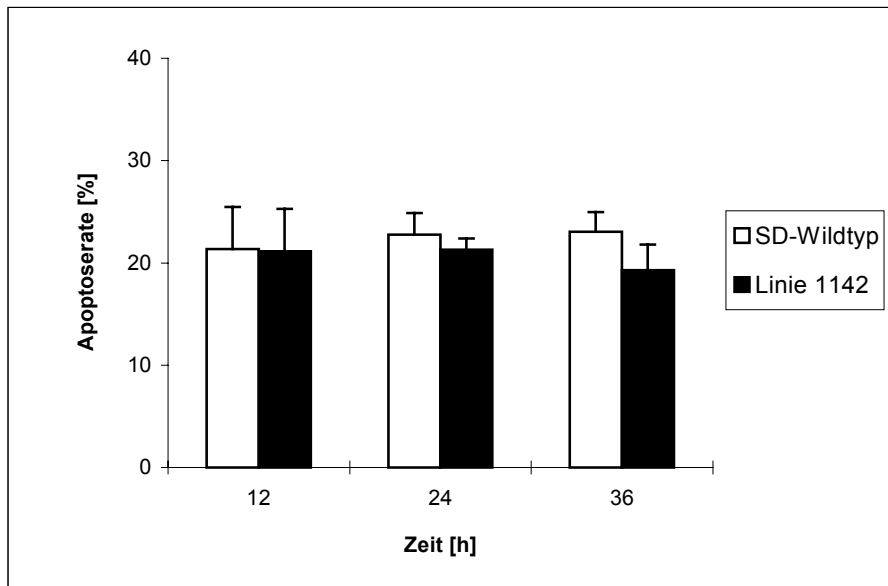


Abb. 3: TUNEL-Assay mit neonatalen Kardiomyozyten der transgenen Rattenlinie 1142 und SD-Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 12, 24 und 36 Stunden.

Dargestellt sind die Apoptoseraten in % (Ordinate) zu den auf der Abszisse angegebenen Zeitpunkten; die Zellen wurden in Medium (MEM-T/I) ohne weitere Zusätze kultiviert. Weiße Balken stellen die SD-Kontrolltiere, schwarze Balken die Linie 1142 dar. n=4; SEM=Standardfehler des Mittelwerts

Die gemittelte Rate spontan apoptotischer Zellen lag in diesen Versuchen bei ca. 20%.

Im Vergleich zu den L6-Myoblasten zeigten die Kardiomyozyten somit in der spontanen Apoptose einen vierfach höheren Ausgangswert.

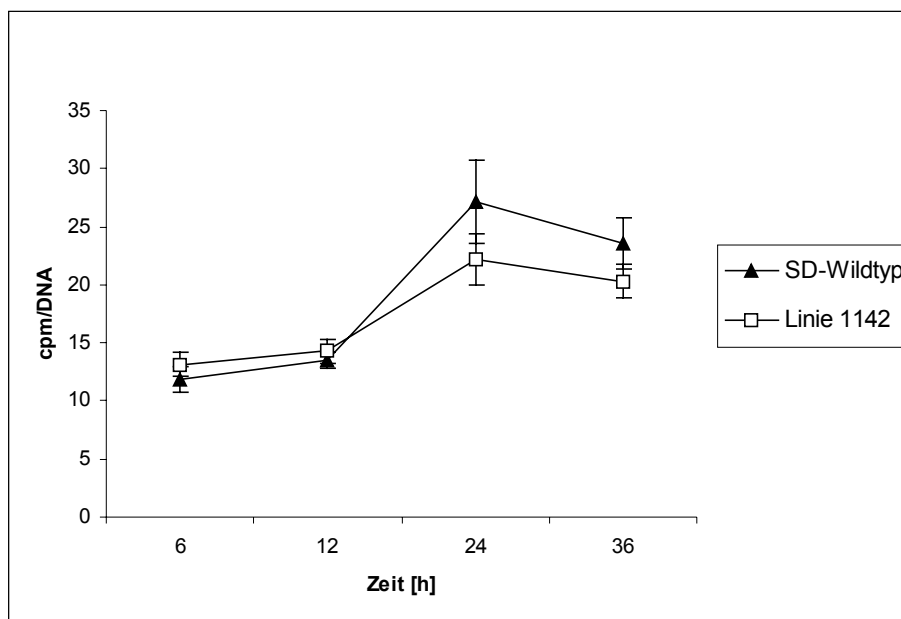
Im Beobachtungszeitraum von 12 bis 36 Stunden veränderten sich die Apoptoseraten nicht wesentlich, die Werte der erfaßten Zeitpunkte sind nahezu identisch.

## 4.2 Wachstum und hPMCA 4CI-Überexpression

### 4.2.1 Vergleich des unstimulierten Wachstumsverhaltens neonataler Kardiomyozyten der Linie 1142 mit wildtypischen SD-Tieren

Es war zunächst von Interesse, ob bereits in reiner Mediumkultivierung ohne Stimuluszugabe zwischen den beiden Vergleichsgruppen Unterschiede in der Proteinsyntheserate der Zellen zu ermitteln sind.

Die ermittelte Proteinsyntheserate, ausgedrückt über die Relation „Protein zu DNA“, kann als Maß für die Hypertrophie der Zellen herangezogen werden.



**Abb. 4:**  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation in isolierten neonataler Kardiomyozyten der hPMCA 4CI-überexprimierenden Linie 1142 und SD-Wildtypkontrollen.

Die Proteinsyntheserate wurde ermittelt als cpm/DNA (Ordinate). Kardiomyozyten der Linie 1142 (schwarze Dreiecke) wurden gegenüber Zellen wildtypischer SD-Tiere (weiße Quadrate) zu den auf der Abszisse angegebenen Zeitpunkten analysiert.

Die Kultivierung erfolgte in serumfreiem Kulturmedium (MEM-T/I).

n=7; SEM=Standardfehler des Mittelwertes

Die Proteinsyntheserate beider Vergleichsgruppen stieg bis zum Zeitpunkt 24 Stunden annähernd parallel auf Maximalwerte; bei 36 Stunden wurde ein Absinken der Werte deutlich.

Im Vergleich der Ausgangswerte bei reiner MEM-T/I Kultivierung ohne proliferative bzw. hypertrophieinduzierende Stimuli ergab sich somit kein Unterschied zwischen neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 und den SD-Wildtypkontrollen (Abb. 4).

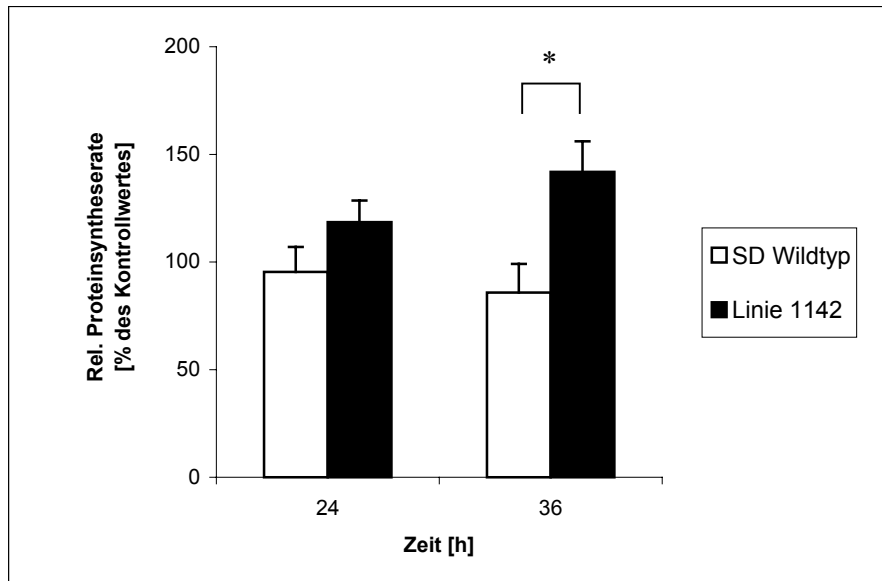
#### 4.2.2 Signifikant gesteigerte Proteinsyntheserate unter katecholaminerger Stimulierung in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142

In weiteren Versuchen wurde der Einfluß der hPMCA 4CI-Überexpression auf die hypertrophe Antwort der Kardiomyozyten bei Zugabe wachstumsstimulierender Substanzen untersucht.

##### 4.2.2.1 Phenylephrin erhöht die Proteinsynthese in Zellen der transgenen Rattenlinie 1142 auf das 1,7fache der Wildtypkontrollen

In neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 erzielte 24- bzw. 36-stündige Inkubation mit Phenylephrin in einer Konzentration von 20  $\mu$ M eine gegenüber SD-Kontrolltieren signifikant gesteigerte Proteinsyntheserate.

Für den Zeitpunkt 24 Stunden ergab sich eine 1,2-fach gesteigerte Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten mit hPMCA 4CI-Überexpression, für 36 Stunden Inkubationszeit stieg der Wert auf den 1,7-fachen der SD-Wildtypkontrollen an (Abb. 5).



**Abb. 5:**  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation unter Stimulation mit  $20\ \mu\text{M}$  Phenylephrin in neonatalen Kardiomyozyten der hPMCA 4CI-überexprimierenden Linie 1142 und SD-Wildtypkontrollen.

Die Proteinsyntheserate wurde als cpm/DNA ermittelt und als „% des Kontrollwertes“ aufgetragen (Ordinate). Zellen in MEM-T/I ohne zugesetzten Stimulus bildeten die Kontrollwerte. Die Kardiomyozyten der Linie 1142 (schwarze Balken) und der SD-Wildtypiere (weiße Balken) inkubierten mit Phenylephrin in der Konzentration  $20\ \mu\text{M}$ ; erfaßt wurden die Zeitpunkte 24 und 36 Stunden (Abszisse).

n=6; SEM= Standardfehler des Mittelwertes; \* $p < 0.05$  (student's t-test)

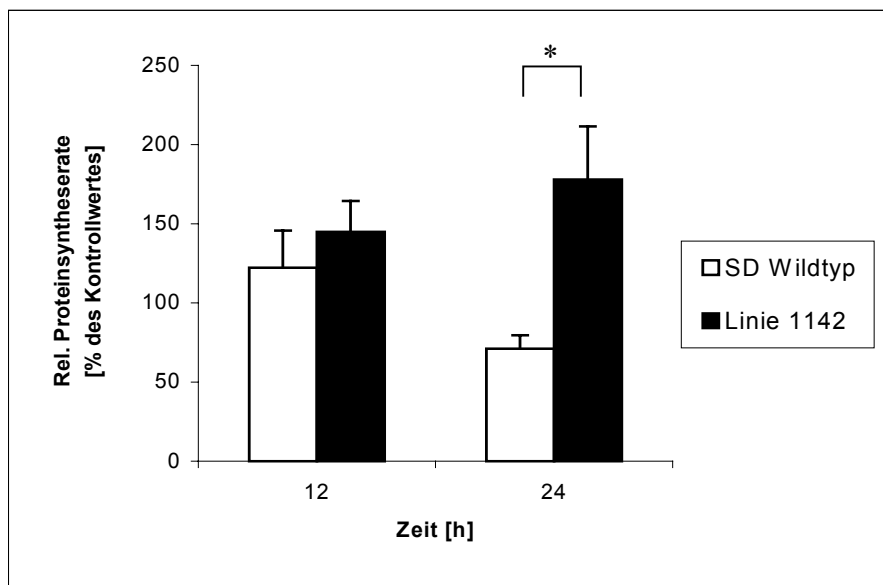
Die unter Phenylephrinstimulation gemessenen cpm/DNA Werte wurden innerhalb jedes Versuchs auf den zugehörigen Ausgangswert (Linie 1142 bzw. SD-Wildtyp in reinem MEM-T/I) abgeglichen und als „Prozent [%] des Kontrollwertes“ ausgedrückt.

Dieser Basalabgleich ermöglicht den direkten Vergleich der Werte beider Gruppen über die durchgeführten Experimente hinweg.

#### 4.2.2.2 Isoproterenol erhöht die Proteinsynthese in Zellen der transgenen Rattenlinie 1142 auf das 2,5fache der Wildtypkontrollen

Nachdem sich mit Phenylephrin als Agonist  $\alpha$ -adrenerger Rezeptoren eine signifikante Differenz zwischen neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 und wildtypischen Zellen ergeben hatte, wurde in den folgenden Versuchen Isoproterenol als  $\beta$ -Adrenozeptoragonist analysiert.

Die verwendete Konzentration  $1\mu\text{M}$  war durch Daten aus eigenen Vorversuchen sowie der Literatur (Simpson, 1985) ermittelt worden.



**Abb. 6:**  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation unter Stimulation mit  $1\mu\text{M}$  Isoproterenol in neonatalen Kardiomyozyten der hPMCA 4CI-überexprimierenden Linie 1142 und SD-Wildtypkontrollen.

Die Proteinsyntheserate wurde als cpm/DNA ermittelt und als „% des Kontrollwertes“ aufgetragen (Ordinate). Zellen in MEM-T/I ohne Stimulus bildeten die Kontrollwerte. Die Kardiomyozyten der Linie 1142 (schwarze Balken) und der SD-Wildtypiere (weiße Balken) inkubierten mit  $1\mu\text{M}$  Isoproterenol über 12 und 24 Stunden (Abszisse).

n=7; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; \*p<0.05 (student's t-test)

Die neonatalen Kardiomyozyten der hPMCA 4CI-überexprimierenden Linie 1142 zeigten unter Stimulation mit 1  $\mu$ M Isoproterenol zum Zeitpunkt 24 Stunden eine gegenüber SD-Wildtypkontrollen 2,5-fach gesteigerte Proteinsyntheserate (Abb. 6).

Dies entspricht einer Zunahme in den transgenen Zellen gegenüber dem unstimulierten Kontrollwert (MEM-T/I) um 75%. Dagegen bewirkt Isoproterenol in den Kardiomyozyten wildtypischer SD-Ratten eine Abnahme der Proteinsyntheserate um rund 30% gegenüber des Ausgangswertes in reinem Medium.

Die signifikante Differenz ergibt sich somit interessanterweise aus der gesteigerten Proteinsyntheserate in Zellen der Linie 1142 bei gleichzeitig verminderter Proteinsyntheserate in den SD-Kontrollen.

Für den ebenfalls untersuchten Zeitpunkt 12 Stunden erzielten beide Vergleichsgruppen Steigerungen der Proteinsyntheserate um 45% (Linie 1142) bzw. 25% (SD-Wildtyp) gegenüber den Ausgangswerten.

Somit induzierten in den durchgeführten Experimenten sowohl Phenylephrin als Agonist an  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren als auch Isoproterenol als  $\beta$ -Agonist in den neonatalen Kardiomyozyten eine hypertrophe Antwort in Form einer meßbar gesteigerten Proteinsyntheserate (Abb. 5 und 6).

Die hPMCA 4CI-überexprimierenden Kardiomyozyten der Linie 1142 zeigten hierbei unter Stimulation durchweg gesteigerte Raten der Proteinsynthese im Vergleich zu SD-Wildtypkontrollen, nachdem zuvor in den Ausgangswerten, d. h. bei serumfreier MEM-T/I Kultivierung, keine Unterschiede im Wachstum ermittelt werden konnten (Abb. 4).

### **4.3 Kolokalisation der hPMCA 4CI mit Caveolin-3 in neonatalen Kardiomyozyten**

Die Frage nach der genauen Lokalisation der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in den Myokardzellen wurde mittels Immunfluoreszenztechnik und anschließender computer-gestützter Auswertung der konfokalen Lasermikroskopie untersucht.

Neonatale Kardiomyozyten beider Vergleichsgruppen wurden einander gegenübergestellt.

Von Interesse in diesem Zusammenhang war die Verteilung der transgen exprimierten Isoform hPMCA 4CI im Vergleich zur endogen vorhandenen Ratten-PMCA.

Die Verwendung eines hPMCA 4CI-isoformspezifischen sowie eines unspezifischen Antikörpers gegen die PMCA ermöglichte die Analyse dieser Fragestellung.

#### **4.3.1 Vergleich der transgenen Rattenlinie 1142 vs. Wildtypkontrollen**

In den Abbildungen 7 a-c sind Herzmuskelzellen der Linie 1142 dargestellt, Abb. 7 d-f zeigt die SD-Wildtypkontrollen.

Die grün fluoreszierenden Bildpunkte (sog. Pixel) zeigen in den Abbildungen 7 die Färbung der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase an.

Der für die humane Isoform PMCA 4 spezifische Antikörper JA3 wurde als monoklonaler Antikörper mittels Cy2<sup>TM</sup>-fluoreszenzmarkiertem Anti-Maus IgG erfaßt.

Rote Pixel repräsentieren Caveolin-3, der verwendete polyklonale Antikörper wurde durch TexasRed-gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG nachgewiesen.

Bereiche, in denen beide Färbungen in derselben Bildebene liegen (Superposition), werden in der Konfokalmikroskopie gelb dargestellt.

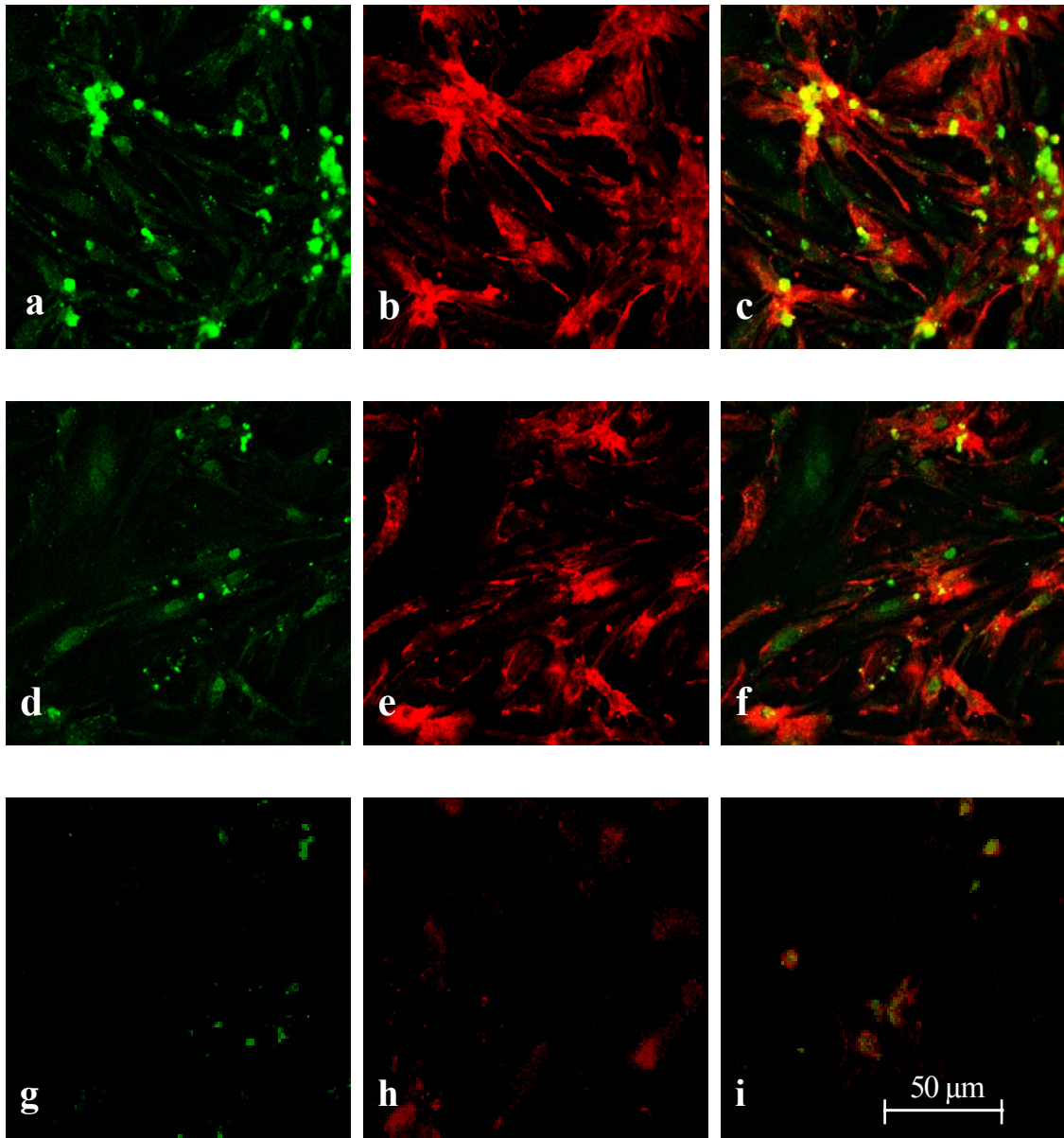


Abb. 7: Konfokale Lasermikroskopie in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 (a-c) und SD-Wildtypkontrollen (d-f). In den Immunfluoreszenzen zeigen grüne Bildpunkte die hPMCA 4CI (Antikörper JA3) (a, d). Rote Pixel geben die Verteilung des Caveolin-3 an (b, e). Die Kolo-kalisation beider Proteine (Superposition) wird gelb dargestellt (c, f). Die Negativkontrollen (g-i) vermitteln die Spezifität der Antikörper.



Die Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen die PMCA und Caveolin-3 zeigte eine Kollokalisierung beider Proteine. Computergestützte Bildanalyse ergab, daß der überwiegende Teil der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (~60%) mit Caveolin-3 kollokalisiert war (Abb. 7).

Die Technik der Immunfluoreszenz in Doppelfärbung bestätigte somit die Anreicherung der PMCA in den Caveolae oder, nach neuerer Nomenklatur, Mikrodomänen.

In den Zellen der wildtypischen SD-Ratten zeigte sich mit dem Antikörper JA3 jedoch ebenfalls ein Signal für die PMCA, wenngleich deutlich schwächer (Abb. 7d).

Die dargestellten Negativkontrollen vermitteln die Spezifität des Antikörpers in den Immunfluoreszenzfärbungen.

#### 4.3.2 Vergleich der Lokalisation des transgenen Enzyms und endogen exprimierter Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

In Abb. 8 sind Immunfluoreszenzen neonataler Kardiomyozyten der Linie 1142 zu sehen. Abb. 8a zeigt den Nachweis der in den transgenen Tieren exprimierten humanen Isoform 4 der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mittels Antikörper JA3 (grüne Pixel).

In Abb. 8d wurde der Antikörper 5F10 verwendet; er detektiert spezies- und isoformunspezifisch die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Dies bedeutet, daß sowohl die transgene hPMCA 4CI als auch endogen exprimierte Formen erkannt werden (grün).

In der zweiten Reihe (Abb. 8b bzw. e) stellt sich Caveolin-3 in roter Farbe dar.

Die letzte Bildreihe (Abb. 8c bzw. f) zeigt in gelber Farbe die Überlagerung (Superposition) beider Proteine.

Der Vergleich beider PMCA-Färbungen mit spezifischem und unspezifischem Antikörper läßt den Schluß zu, daß das transgen exprimierte Enzym inmitten endogen vorhandener PMCA lokalisiert ist. Erwartungsgemäß ist die Anzahl grüner Bildpunkte in Abb. 8a deutlich geringer als in Abb. 8d.

Außerhalb der caveolären Areale ist ebenfalls Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nachzuweisen; die Verteilung des Enzyms ist somit nicht beschränkt auf die Subkompartimente. Neben kleinen, klar abgrenzbaren Komplexen in gelber Farbe fallen größere, eher diffus strukturierte auf.

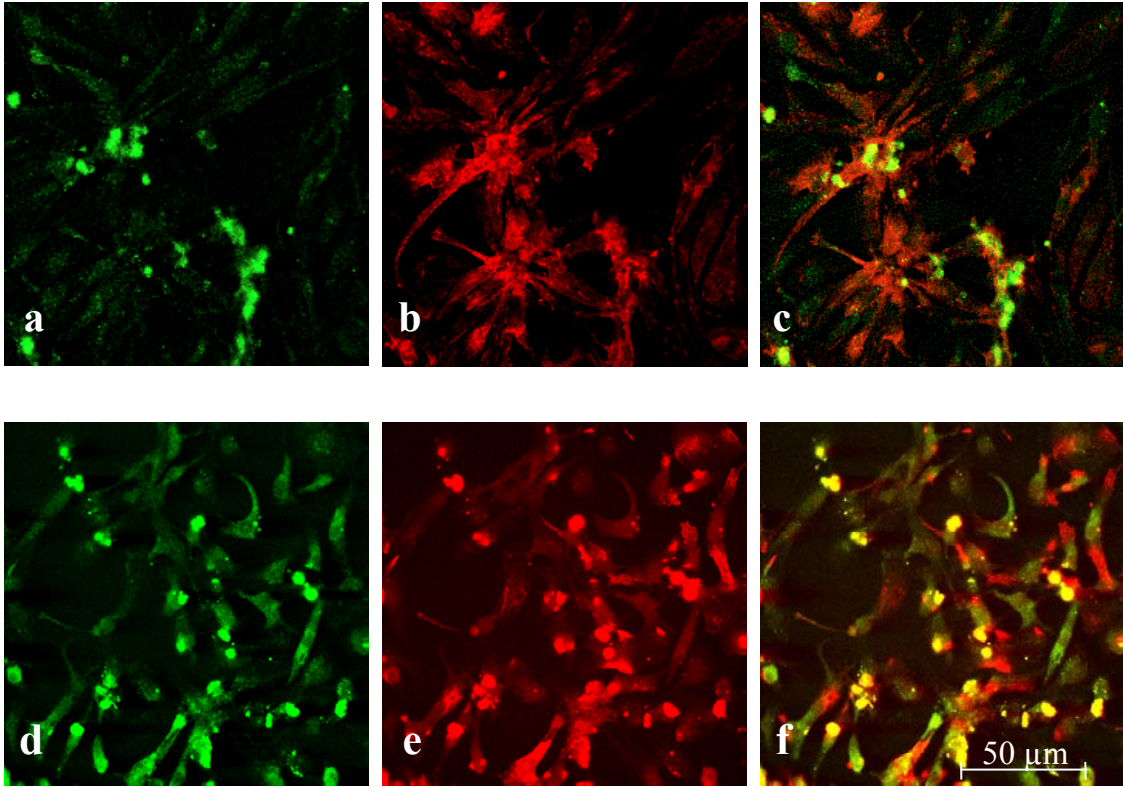


Abb. 8: Konfokale Lasermikroskopie in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142. Vergleich der Expression von transgener Isoform hPMCA 4CI mit endogener Ratten-Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Grüne Bildpunkte in (a) erfassen die hPMCA 4CI (Antikörper JA3), in (d) wird mittels Antikörper 5F10 isoformunspezifisch die PMCA detektiert. Rote Pixel geben die Verteilung des Caveolin-3 an (b, e).

#### **4.4 Mögliche Interaktion zwischen Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und NO-Synthase in neonatalen Kardiomyozyten**

Die Auswirkung einer Inhibition der NOS auf das Wachstumsverhalten sollte in isolierten Kardiomyozyten transgener und wildtypischer SD-Ratten untersucht werden.

Als Inhibitor der NOS diene L<sup>o</sup>-Nitro-Arginin-Methylester (L-NAME), die Versuche wurden in Analogie zu den vorangegangenen <sup>3</sup>H-Leucin Experimenten durchgeführt.

Versuche mit Isoproterenol und L-NAME parallel schlossen sich unter der Fragestellung einer veränderten Ansprechbarkeit der  $\beta$ -Rezeptoren durch die NOS-Inhibition an.

Die Hypothese einer gegenseitigen Interaktion von PMCA und NOS sollte durch beide Ansätze weiter aufgeklärt werden.

##### **4.4.1 NOS-Inhibition durch L<sup>o</sup>-Nitro-Arginin-Methylester (L-NAME) wirkt in neonatalen Kardiomyozyten als Hypertrophiestimulus**

L-NAME erzielte in den neonatalen Kardiomyozyten gegenüber den Ausgangswerten in reinem Medium Proteinsynthesesteigerungen von 200% in den SD-Wildtypieren respektive 150% in den Zellen der Linie 1142 zum Zeitpunkt 6 Stunden (Abb. 9a, 1. Balkenreihe).

Die Inhibition der NOS durch L-NAME induzierte in den neonatalen Kardiomyozyten eine Steigerung der Proteinsynthese, welche in ihrer Höhe jener durch Isoproterenol nahezu entspricht (Abb. 9a, 2. Balkenreihe).

Bei der Auswertung der Proteinsyntheseraten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte keine Steigerung durch Zugabe von L-NAME nachgewiesen werden.

In beiden Vergleichsgruppen wurden etwa die Ausgangswerte (Linie 1142 sogar minus 20%) erreicht (Abb. 9b, 1. Balkenreihe). Der hypertrophe Effekt von L-NAME ließ also eine Abhängigkeit von der Zeit erkennen.

Im Vergleich der hPMCA 4CI-überexprimierenden und wildtypischen neonatalen Kardiomyozyten wurde kein verändertes Wachstumsverhalten unter NOS-Inhibition festgestellt.

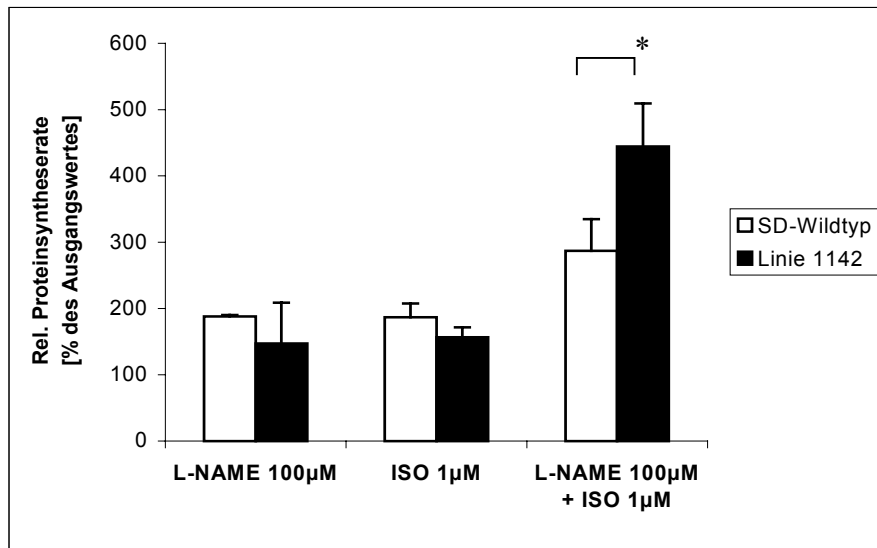


Abb. 9a: Zeitpunkt 6h

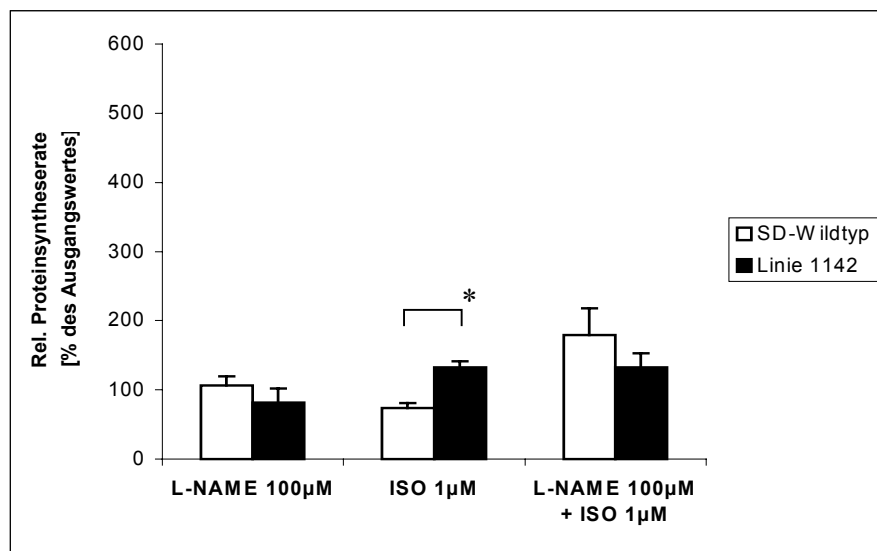


Abb. 9b: Zeitpunkt 24h

Abb. 9a u. 9b:  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation unter Stimulation mit 100 µM L-NAME, 1 µM Isoproterenol sowie Kombination beider Stimuli in neonatalen Kardiomyozyten der hPMCA 4CI-überexprimierenden Linie 1142 und SD-Wildtypkontrollen.

Die Proteinsyntheserate wurde als cpm/DNA ermittelt und als „% des Ausgangswertes“ aufgetragen (Ordinate). Die Abszisse nennt den verwendeten Parameter. Weiße Balken geben die Werte für die SD-Kontrollen, schwarze Balken diejenigen der Linie 1142 an.

Abb. 9a zeigt den Zeitpunkt 6h, Abb. 9b den 24h-Wert.

n=4; SEM= Standardfehler des Mittelwertes

\*p<0.05 (student's t-test)

#### 4.4.2 Die Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase moduliert die Wachstumsantwort auf NOS-Inhibition durch L-NAME

Unterschiede zwischen den neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 und SD-Wildtyptieren manifestierten sich erst in der Kombination beider Stimuli (Abb. 9a, 3. Balkenreihe): zum Zeitpunkt 6 Stunden reagierten die transgenen Herzmuskelzellen mit einer gegenüber Kontrollen 1,6-fach ( $p < 0,05$ ) verstärkten Proteinsyntheserate.

Dies entspricht einer Steigerung des Effekts beider Stimuli alleine auf doppelte Werte in SD-Wildtypzellen, für die Myozyten der Linie 1142 sogar auf dreifache Werte.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden konnte dagegen in den überexprimierenden Herzmuskelzellen kein Effekt einer NOS-Inhibition auf die unter Isoproterenolzugabe erreichte Proteinsyntheserate beobachtet werden (Abb. 9b, 3. Balkenreihe), es wurden exakt die Werte für Isoproterenol als alleinigem Stimulus reproduziert.

Im Unterschied hierzu erreichten die wildtypischen Zellen bei 24 Stunden unter Isoproterenol alleine lediglich 70% des Ausgangswerts, ein Ergebnis, das die Resultate der vorangegangenen Versuche bestätigt. Unter L-NAME und Isoproterenol in Kombination zeigte sich dagegen eine Steigerung der Proteinsyntheserate auf annähernd 200%, so daß hier die Myozyten der SD-Kontrolltiere deutlich über den Werten der Linie 1142 lagen (Abb. 9b, 3. Balkenreihe).

Es ist also ersichtlich, daß die Blockade der NOS durch L-NAME in neonatalen Kardiomyozyten eine vermehrte Ansprechbarkeit des  $\beta$ -Adrenozeptors zur Folge hatte.

Die gleichzeitige Applikation von L-NAME verhinderte in den Herzmuskelzellen der SD-Wildtypkontrollen das zuvor beobachtete Absinken der Proteinsyntheserate unter Isoproterenol als alleinigem Stimulus.

## 5 Diskussion

Die enge Verknüpfung des Kalziums am Herzen mit der Regulation von Kontraktion und Relaxation ist bereits seit langem bekannt. In der kalziumabhängigen Modulation langfristiger zellulärer Prozesse, wie beispielsweise Wachstum und Differenzierung, wird die Bedeutung der an der Kalziumhomöostase beteiligten Parameter über die Abläufe von Schlag zu Schlag hinaus deutlich.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Funktionsanalyse der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, deren diskutierte Rolle in Wachstumsregulation und Signaltransduktion näher charakterisiert werden sollte.

Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit nach thematischen, konzeptionellen und inhaltlichen Gesichtspunkten diskutiert; hierzu gelangen eigene Daten zur Gegenüberstellung mit Resultaten und Thesen aus der Literatur.

Ein Ausblick auf die sich aus der Arbeit ergebenden möglichen Perspektiven für Forschung und Therapie im Rahmen des Forschungsgebietes Herzinsuffizienz/Herzhypertrophie schließt dieses Kapitel ab.

### 5.1 Apoptose und hPMCA 4CI-Überexpression

Die Apoptose, der genetisch determinierte Zelltod, spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase eines Gewebes. Zahlreiche physiologische und pathologische Wachstumsvorgänge in unterschiedlichsten Zellarten und -verbänden sind eng verknüpft mit apoptotischen Zelluntergängen.

Auch am Herzen spielt nach jüngsten Erkenntnissen die Balance zwischen proliferativen und apoptotischen Prozessen eine entscheidende Rolle, sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im adulten, ausdifferenzierten Organ (MacLellan und Schneider, 1997). Bei zahlreichen Herzerkrankungen lassen sich vermehrt apoptotische Zelluntergänge nachweisen, beispielsweise beim Infarktgeschehen (Saraste et al., 1996; Kajstura et al., 1996).

Kardiale Hypertrophie und Apoptose erscheinen hierbei zunächst als entgegengesetzte Prozesse. Neuere Untersuchungen weisen jedoch auf eine enge Korrelation hin; tatsächlich scheint die Hypertrophie des Herzens eingeleitet bzw. begleitet zu werden von einer Woge myozytärer Apoptose (Hamet et al., 1995; Teiger et al., 1996).

Die Signalwege, über die der Eintritt einer Zelle in den programmierten Zelltod gesteuert wird, sind paradoxerweise eng gekoppelt mit denen der Mitose (Fadeel et al., 1999).

#### 5.1.1 Untersuchungen am Modell der L6-Myoblasten

Die Überexpression der hPMCA 4CI in L6-Klonen beeinflusste die Apoptoseraten im Vergleich zu neo5-Kontrollklonen nicht. Weder die spontane noch die durch Zugabe von TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose war bei den L6-4N Klonen signifikant verändert (vgl. Resultate: Abb. 2).

TNF- $\alpha$  vermochte in beiden Klonen die Zahl apoptotischer Zellen zu steigern, Konzentrationserhöhung des Tumornekrosefaktors führte zu einer nochmaligen Steigerung.

Interessanterweise scheint der Differenzierungsgrad eine wesentliche Rolle bei der Apoptose von Muskelzellen zu spielen. Untersuchungen der Mäuse-Myoblastenlinie C2C12 zeigen eine im Laufe der myogenen Differenzierung auftretende Apoptose-resistenz: ausdifferenzierte Myotuben gehen nicht mehr in den programmierten Zelltod ein (Wang und Walsh, 1996).

Die L6-Zellen der vorliegenden Arbeit befanden sich zum Zeitpunkt der Versuche mittels dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Technik im Stadium der Vordifferenzierung, d. h. es wurden Myoblasten verwendet. Sie zeigten spontane Apoptoseraten von ca. 5%, Zugabe von TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 2000 U/ml verdoppelte diese Ausgangswerte.

Die Myoblasten waren somit erwartungsgemäß sensibel für pro-apoptotische Stimuli.

Zuvor durchgeführte Experimente konnten eine signifikant beschleunigte myogene Differenzierung bei den hPMCA 4CI-überexprimierenden L6-Myoblasten nachweisen (Hammes et al., 1996).

Die Apoptoseraten zeigen sich hiervon unberührt, ein Einfluß der hPMCA 4CI-Überexpression auf diesen Zellparameter scheint in den L6-Klonen nicht zu bestehen.

### 5.1.2 TUNEL-Assay an isolierten neonatalen Kardiomyozyten

Die Experimente an neonatalen Kardiomyozyten wurden in Analogie zu den Myoblasten mittels TUNEL-Verfahren durchgeführt.

Im Vergleich der spontanen Apoptoseraten konnte kein Unterschied zwischen Herzmuskelzellen der hPMCA 4CI-überexprimierenden Rattenlinie 1142 gegenüber denjenigen wildtypischer SD-Tiere festgestellt werden.

Über die erfaßten Zeiträume 12, 24 und 36 Stunden bewegen sich die Apoptoseraten konstant bei ca. 20%. Dieser auf den ersten Blick hohe Wert ist in Relation zu präparationsbedingt entstehendem oxidativem und mechanischem Streß („shear stress“) zu setzen.

Die Rolle des Kalziums und folglich auch der kalziumabhängigen Moleküle in der Signalkaskade der Apoptose wird kontrovers diskutiert.

Während die Erhöhung des intrazellulären Kalziums in einigen Arbeiten als Auslöser der apoptotischen Antwort gesehen wird, belegen andere Untersuchungen eine Inhibition der Apoptose durch hohe zytosolische Kalziumspiegel (Nicotera und Orrenius, 1998; Jayaraman und Marks, 1997). Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 etwa reduziert die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, d. h. es senkt die  $[Ca^{2+}]_i$  (Lam et al., 1994).

Jüngste Untersuchungen von Garcia et al. wiesen für Phäochromozytom-PC12-Zellen mit Überexpression der PMCA 4b eine verringerte Apoptoseempfindlichkeit auf unphysiologisch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen nach (Garcia et al., 2001).



In den Untersuchungen mittels TUNEL-Assay fand der Gedanke einer möglicherweise veränderten spontanen Apoptoseantwort durch die Überexpression der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase keine Bestätigung.

Im Hinblick auf die nachfolgenden Wachstumsexperimente war somit zunächst von einer unveränderten Viabilität der Zellen auszugehen.

## **5.2 Wachstum und hPMCA 4CI-Überexpression**

Ein Einfluß der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf Wachstum und Proliferation ist bereits in verschiedenen Zelltypen beschrieben, so etwa in glatten Muskelzellen (Husain et al., 1997) oder Endothelzellen aus der Aorta der Ratte (Liu et al., 1996).

Hammes wies in ersten Experimenten gesteigertes Wachstum, gemessen an der Zunahme des Gesamtproteins nach Stimulation mit fetalem Kälberserum, in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 gegenüber SD-Wildtypkontrollen nach (A. Hammes, Dissertation 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Induktoren der kardialen Hypertrophie, die Katecholamine, in ihrer Wirkung auf die Primärkulturen analysiert.

Das Wachstumsverhalten der Linie 1142 wurde zuvor bei serumfreier Mediumkultivierung den SD-Wildtypkontrollen gegenübergestellt, um unstimulierte Vergleichswerte zu erzielen.

### **5.2.1 Transgene Rattenlinie 1142 vs. SD-Wildtyp: Vergleich der unstimulierten Wachstumsverläufe**

In den Versuchen zeigt sich über die erfaßten Zeitpunkte ein annähernd paralleler Verlauf der Wachstumskurven von neonatalen Kardiomyozyten mit hPMCA 4CI-Überexpression und den Zellen wildtypischer Tiere (vgl. Resultate: Abb. 4).

Deutlich wird ein Anstieg der Werte bis zum Zeitpunkt 24 Stunden, bei 36 Stunden sinken die erzielten Proteinsyntheseraten ab.

Bisher liegen keinerlei Hinweise für kardiale Auffälligkeiten der transgenen Tiere vor, insbesondere kommt es nicht zum Auftreten einer spontanen Hypertrophie.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Überexpression der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in unstimulierten, ruhenden Primärkulturen neonataler Kardiomyozyten die Proteinsyntheseaktivität nicht in signifikanter Weise beeinflusst.

Dies könnte auf zellulärer Ebene die Beobachtung eines unauffälligen kardialen Phänotyps bei Tieren der Linie 1142 bestätigen.

Die nahezu gleichen Ausgangswerte beider Zellpopulationen ermöglichten für die nachfolgenden Versuche eine eindeutige Wertung auftretender Differenzen als Effekt des jeweils eingesetzten Stimulus.

#### 5.2.2 Katecholaminerge Stimuli führen in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 zu signifikant gesteigerten Proteinsyntheseraten

Nachdem in den Experimenten mit serum- und zusatzfreiem Kulturmedium kein Unterschied zwischen den Kardiomyozyten beider Vergleichsgruppen ermittelt werden konnte, wurde im folgenden die Proteinsyntheseaktivität der Herzmuskelzellen unter katecholaminerger Stimulation untersucht.

Die Rolle adrenerger Stimuli und ihrer Prozessierung über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren der Zelle im Rahmen der Vermittlung proliferativer Reize wird in der Literatur nicht einheitlich diskutiert.

Simpson beschrieb die Vermittlung des Wachstumsstimulus über die  $\alpha_1$ -Rezeptoren, wohingegen er den  $\beta$ -Adrenozeptoren die Steuerung der Kontraktilität zuordnete (Simpson, 1985).

Autelitano und Woodcock zufolge ist lediglich ein Subtyp der  $\alpha_1$ -Rezeptoren,  $\alpha_{1A}$ , zuständig für die Übermittlung proliferativer und hypertrophieinduzierender Stimuli (Autelitano und Woodcock, 1998).

In einigen Zellarten, beispielsweise glatten Muskelzellen des Bronchialepithels, führt die Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs zu einer Inhibierung proliferativer Prozesse (Schramm et al., 1996).

Für Myokardzellen konnte dagegen die Induktion der Hypertrophie über diesen Weg gezeigt werden (Zou et al., 1999).

Wong und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen des  $\beta_2$ -selektiven Agonisten Clenbuterols im humanen Herzen. Während Isoproterenol zur Myokardfibrose infolge Zunahme des interstitiellen Kollagens führt, bewirkt der selektive Agonist Clenbuterol lediglich eine Proteinzunahme der Einzelzelle ohne begleitende Fibrosierung (Wong et al., 1997). Hieraus resultiert eine trotz Hypertrophie unveränderte linksventrikuläre Funktion.

Daß adrenerge Stimuli über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren in adulten Herzmuskelzellen zur Hypertrophie führen, wird von Pinson und Mitarbeitern beschrieben (Pinson et al., 1993). Die Aktivierung der hypertrophieinduzierenden Phosphorylierungskaskade raf 1/MAP-Kinase in synergistischer Weise über PKC und PKA, d. h. über die Signalkaskade beider Rezeptortypen, wurde von Yamazaki in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gezeigt (Yamazaki et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch ein  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Agonist untersucht.

#### 5.2.2.1 Der $\alpha$ -adrenerge Stimulus Phenylephrin

In neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 erzielte Phenylephrin eine gegenüber den SD-Kontrolltieren signifikant gesteigerte Proteinsyntheserate (vgl. Resultate: Abb. 5).

Phenylephrin gilt in Kardiomyozyten und anderen Zellarten als Induktor zellulärer Hypertrophie (Yamazaki et al., 1997).

Als Agonist an  $\alpha$ -Adrenozeptoren bewirkt Phenylephrin in Myokardzellen einen Anstieg des Gehalts kontraktiler, z. B. myosin light chain-2 (MLC-2) und nicht-kontraktiler Proteine, etwa des atrialen natriuretischen Faktors (Knowlton et al., 1991). Darüberhinaus können die Induktion bestimmter Isoformen der kontraktilen Proteine sowie die Re-Expression fetaler Marker beobachtet werden (Chien et al., 1991).

Diese sowohl quantitativ als auch qualitativ veränderte Syntheseaktivität gilt als charakteristisch für die hypertrophe Zellantwort.

Die Signalwege von der Stimulierung eines Rezeptors bis zur qualitativ und/oder quantitativ veränderten Proteinsyntheseaktivität der Zelle sind seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch sind die genauen Mechanismen dieser komplexen Anpassungsreaktion noch nicht endgültig verstanden.

In letzter Zeit richtete sich das Augenmerk auf die permissive Rolle regulatorischer Proteinkinasen, beispielsweise die MAP- („mitogen-activated protein“) Kinasen (ERK, JNK und p38), gp130 und die Proteinphosphatase Calcineurin, um nur einige zu nennen (Übersicht in Molkentin und Dorn, 2001).

Die Vielzahl der beteiligten Signalwege und -moleküle macht deutlich, daß es sich nicht um einen einzelnen, allein relevanten Signalweg handelt. Offenkundig interagieren mehrere Signalwege im Sinne einer „Transduktionskooperation“.

#### *Die Phosphorylierungskaskade über die Proteinkinase C – möglicher Interaktionspartner der PMCA?*

Phenylephrin aktiviert die Proteinkinase C, ebenso wie Endothelin 1, Angiotensin II aber auch mechanische Reize, etwa Dehnung. Alle genannten Stimuli führen in Herzmuskelzellen zur Hypertrophie (Molkentin und Dorn, 2001). Die Aktivierung der Proteinkinase C ist hierbei als initialer Schritt zu werten, in deren Folge weitere Kaskaden, beispielsweise der raf 1/ERK-Signalweg, aktiviert werden (Yamazaki et al., 1997). Bowman und Mitarbeiter wiesen in Untersuchungen an Mäusen die Induktion der Hypertrophie durch Überexpression der PKC in adulten Tieren nach, während in Neonaten das Auftreten plötzlicher Herztode zu beobachten war (Bowman et al., 1997).

Über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten aktiviert dieses 77kD-Enzym zahlreiche Proteine, so auch die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Als Ort der Phosphorylierung durch die PKC konnte die calmodulinbindende Domäne der PMCA identifiziert werden (Wang et al., 1991). Kuo und Mitarbeiter zeigten eine PKC-abhängige Regulation der Genexpression für die Isoform 1 der PMCA (Kuo et al., 1991).

In der inaktiven Form ist die Proteinkinase im Zytosol lokalisiert, durch Aktivierung transloziert sie zur Zellmembran. Für die Isoform  $\alpha$  der Proteinkinase C konnte wie auch für die PMCA die Lokalisation in Caveolae, spezialisierten Mikrodomänen der Plasmamembran, nachgewiesen werden (Mineo et al., 1998).

Denkbar wäre ein Interagieren beider Moleküle im Rahmen der hypertrophieinduzierenden Signalkaskade in den Caveolae. Der  $\alpha$ -adrenerge Stimulus wird in den überexprimierenden Kardiomyozyten effizienter umgesetzt, möglicherweise initiiert die PMCA die Translokation der PKC zur Zellmembran. Somit stünde mehr aktivierte Proteinkinase C zur Verfügung, was die beobachtete Verstärkung der phenylephrin-induzierten Signalkaskade erklären könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf Veränderungen der genetischen Marker der Hypertrophie nicht eingegangen.

Eine jüngst publizierte Arbeit ergab jedoch in Ventrikeln der transgenen Rattenlinie 1142 eine verringerte BNP- („brain natriuretic peptide“) Genexpression unter Endothelin 1-Stimulation (Piuholo et al., 2001), so daß ein Einfluß der PMCA-Überexpression auch auf genetischer Ebene vorzuliegen scheint.

#### 5.2.2.2 Der $\beta$ -adrenerge Stimulus Isoproterenol

Analog zu den Experimenten mit Phenylephrin durchgeführte Versuche mit dem  $\beta$ -adrenergen Stimulus Isoproterenol ergaben für die neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 eine 2,5-fach gesteigerte Proteinsyntheserate, während in den wildtypischen Zellen eine Abnahme der Syntheseleistung unter Isoproterenol zu verzeichnen war (vgl. Resultate, Abb. 6).

In den hPMCA 4CI-überexprimierenden Herzmuskelzellen war Isoproterenol ein Hypertrophiestimulus, wie zuvor der  $\alpha$ -adrenerge Agonist Phenylephrin.

Der Abfall der Proteinsynthese in den wildtypischen Myozyten ist möglicherweise auf ein zytotoxisches Geschehen, etwa infolge Kalziumüberladung unter katecholaminerger Stimulation, zurückzuführen.

### *Die PMCA – ein kardioprotektives Enzym?*

Hohe lokale Katecholaminkonzentrationen üben auf Myozyten aufgrund intrazellulärer Kalziumüberladung direkt toxische Effekte aus, es kommt zu Störungen der mikrotubulären Strukturen der Zelle (Hori et al., 1994). Unter anhaltender und hochdosierter katecholaminerger Stimulation werden im Myokard sowohl Nekrose als auch Apoptose der Herzmuskelzellen beobachtet (Sabbah, 1999).

Communal et al. zeigten die Relevanz des  $\beta$ -adrenergen Signalweges für den pro-apoptotischen Effekt von Noradrenalin (Communal et al., 1998). Untersuchungen an  $G_{sc\alpha}$ -überexprimierenden Mäusen, in denen apoptotische Zelluntergänge der Kardiomyozyten auftreten, bestätigen dies (Geng et al., 1999).

Die bereits erwähnte Studie von Garcia et al. belegt, daß unphysiologisch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen in PMCA 4b-überexprimierenden Phäochromozytom-Zellen (PC12) weniger Apoptose hervorrufen (Garcia et al., 2001).

Während sich zuvor in den TUNEL-Versuchen kein Unterschied der spontanen Apoptoseraten zeigte, lassen die unter Isoproterenol beobachteten Differenzen zwischen transgenen und wildtypischen Kardiomyozyten eine veränderte Viabilität beider Zellgruppen vermuten. Die naheliegendste Erklärung hierfür liegt in der Annahme, daß die Überexpression der Plasmamembran  $Ca^{2+}$ -ATPase in den Zellen der Linie 1142 einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf zytotoxisches Niveau verhindert.

Eine zweite Hypothese ginge von einer durch PMCA-Überexpression veränderten caveolären Signalübertragung aus, die einen katecholaminergen „overdrive“ auf Ebene des Rezeptors, der involvierten G-Proteine ( $G_s/G_i$ ) oder der Adenylylzyklase reguliert. Alle genannten Elemente des  $\beta$ -adrenergen Signalweges konnten in Caveolae nachgewiesen werden (Shaul und Anderson, 1998).

Für einzelne Isoformen der Adenylylzyklase wurde bereits eine Regulation durch Kalzium und Caveolin gezeigt (Fagan et al., 2000), in Herzmuskelzellen bildet Caveolin-3 einen Komplex mit der Adenylylzyklase Typ V (Schwencke et al., 1999).

Unter dem Aspekt einer kardioprotektiven Rolle der PMCA gewinnen die bereits erwähnten Daten von Piuhola und Mitarbeitern, wonach die Überexpression der PMCA verringerte BNP-Genexpression unter ET-1 bewirkt (Piuhola et al., 2001), eine interessante Bedeutung: beginnendes Pumpversagen bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist charakterisiert durch einen Anstieg der natriuretischen Peptide ANP und BNP.

Die Höhe der BNP-Konzentration im Serum kann als Marker der linksventrikulären Funktion dienen (Kjaer und Hesse, 2001), und beinhaltet sowohl diagnostische wie auch potentiell therapeutische Ansätze.

#### *Veränderte $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion bei Herzinsuffizienz*

Der Übergang des druckbelasteten Herzens bei arterieller Hypertension zu Hypertrophie und schließlich zur Herzinsuffizienz wird begleitet von entscheidenden Veränderungen im  $\beta$ -adrenergen System (Bristow, 1997).

In Patienten mit Herzinsuffizienz finden sich erhöhte Serumkonzentrationen der Katecholamine, gleichzeitig jedoch ein vermindertes Ansprechen des Myokards auf diese Stimuli. Die Dichte der  $\beta$ -Adrenozeptoren nimmt ab („down-regulation“), noch vorhandene Rezeptoren zeigen eine Abnahme der Sensitivität (Bristow, 1997).

Anhaltende catecholaminerge Stimulation führt zu myozytärem Zelluntergang infolge Apoptose (Shizukuda et al., 1998) und Nekrose (Sabbah, 1999). Bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie finden sich Autoantikörper gegen  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität, auch hier kommt es zu zytotoxischer Kalziumüberladung der Myozyten (Gilbert et al., 1993; Magnusson et al., 1994).

Als wichtiger Schritt in der Progression der hypertensiven kardialen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz wurde im Tiermodell der „spontaneous hypertensive and heart failure“ (SHHF) Ratte eine Zunahme in Expression und Aktivität der  $\beta$ -Adrenozeptor-Kinase 1 ( $\beta$ ARK1) beobachtet, was die Ansprechbarkeit der  $\beta$ -Rezeptoren herabsetzt (Anderson et al., 1999). Gomez et al. wiesen in den hypertrophierten Herzen hypertensiver Dahl salt-sensitive-Ratten einen verringerten Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum als Antwort auf die elektrische Depolarisation nach (Gómez et al., 1997).

Diese Störung der elektromechanischen Koppelung war im Stadium der Hypertrophie durch Isoproterenolgabe zu beheben, wohingegen bei Ratten im Stadium der Herzinsuffizienz kein Ansprechen auf den  $\beta$ -adrenergen Stimulus mehr zu verzeichnen war (Gómez et al., 1997).

Nur aus der Kenntnis der molekularen Vorgänge wird ein Ableiten potentieller Therapieansätze möglich, wie dies bereits durch die Anwendung der  $\beta$ -Blocker in der Therapie der Herzinsuffizienz erfolgt. Zunächst scheinbar paradox, da aufgrund negativ inotroper und chronotroper Wirkung akut eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion zu erwarten ist, profitieren unter langfristiger Gabe die Patienten von einer verbesserten Belastbarkeit in Ruhe und Belastung (Sabbah, 1999). Der fatale Kreislauf aus adrenerger Überstimulation und dekompensierendem myozytärem System wird durchbrochen.

Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigen außer den Veränderungen im  $\beta$ -adrenergen Signalweg auch Modifikationen der an der Kalziumhomöostase beteiligten Proteine. Die Abnahme in Aktivität und Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) bedingt beispielsweise eine Beeinträchtigung der systolischen Kraftentwicklung in Relation zur Herzfrequenz (Hasenfuss et al., 1994; Arai et al., 1994).

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase moduliert die Antwort der Herzmuskelzelle auf adrenerge Stimuli, wobei sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -adrenerger Signalweg erfaßt werden. Die PMCA kann somit als Bindeglied zwischen kalzium- und katecholaminvermittelten Prozessen im Rahmen kardialer Hypertrophie gesehen werden.

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt möglicherweise ein neuer Ansatz zur Beeinflussung der myokardialen Reserve unter katecholaminerger Stimulation.



### **5.3 Kolokalisation der humanen Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Isoform 4 CI mit Caveolin-3 in neonatalen Kardiomyozyten**

Caveolae oder Mikrodomänen als hochspezialisierten Subkompartimenten der zellulären Plasmamembran scheint eine Schlüsselrolle in der Prozessierung transmembranärer Signale zuzukommen (Lisanti et al., 1994). Der Gedanke einer räumlichen Bündelung zentraler Signalmoleküle, um so Vorteile in der Koppelung gemeinsamer Rezeptoren und nachgeschalteter Botenstoffe zu nutzen, erscheint plausibel und biologisch effizient.

Die Funktion des Caveolins, der Hauptkomponente caveolärer Membranen, reicht über die eines reinen Gerüstproteins hinaus, neuere Untersuchungen belegen eine Regulation caveolärer Proteine durch Caveolin (Shaul und Anderson, 1998). Insbesondere inhibierende Wirkungen wurden bislang beschrieben, beispielsweise für die eNOS oder die Adenylylzyklase (Feron et al., 1998; Toya et al., 1998). In Muskelzellen und Kardiomyozyten wird die Isoform 3 des Caveolins exprimiert (Song et al., 1996).

Die Lokalisation eines Proteins in den Caveolae ermöglicht Rückschlüsse auf Funktion und Regulation dieses Moleküls.

#### **5.3.1 Vergleich der transgenen Rattenlinie 1142 vs. SD-Wildtypkontrollen**

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase war bereits 1993 mittels Immunogold-Technik in den Caveolae nachgewiesen worden (Fujimoto, 1993).

Entscheidende Bedeutung zur Interpretation der Wachstumsexperimente besaß die Frage, ob auch die transgen exprimierte humane Isoform PMCA 4CI in den Herzmuskelzellen der Linie 1142 in den Mikrodomänen lokalisiert war.

Hierzu wurde der für diese Isoform spezifische Antikörper JA3 (Borke et al., 1987; Caride et al., 1996; Filoteo et al., 1997) in der Immunfluoreszenz verwendet. Zeitgleiches Auftragen eines polyklonalen Antikörpers gegen Caveolin-3 (Doppelfärbung) ermöglichte den Nachweis einer Kolokalisation beider Proteine in einer Zelle. Die Überlagerung beider Färbungen, in gelber Farbe kodiert, zeigt die Kolokalisation von PMCA und Caveolin-3; das transgene Enzym wird also ebenfalls in den Caveolae exprimiert (vgl. Resultate: Abb. 7a-c).

Das Signal der PMCA mittels JA3 ist in den wildtypischen Herzmuskelzellen erwartungsgemäß deutlich schwächer, jedoch ebenfalls vorhanden.

Dies muß interpretiert werden als Kreuzreaktion des Antikörpers mit der endogenen Isoform 4 der Ratte.

### 5.3.2 Expression der transgenen hPMCA 4CI in Tieren der Linie 1142

Die transgen exprimierte PMCA 4CI ist in neonatalen Kardiomyozyten der Linie 1142 nicht ausschließlich in den Caveolae lokalisiert. Neben den Bereichen der Superposition von Caveolin-3 und PMCA überzieht ein feines retikuläres Muster grüner Pixel die Zellen, daneben kommen größere, unscharf begrenzte Strukturen zur Darstellung.

Die konfokale Lasermikroskopie zeigte die Kolo-kalisation der PMCA mit Caveolin-3 zu etwa 60%.

Möglicherweise handelt es sich bei den größeren Komplexen um die Anfärbung von Strukturen des endoplasmatischen Retikulums. Ein „shuttling“ der caveolären Proteine zwischen den Mikrodomänen und zytosolischen Kompartimenten wie etwa dem Golgi-Komplex ist in der Literatur beschrieben (Couet et al., 1997b).

#### *Die Rolle der Plasmamembran $Ca^{2+}$ -ATPase in der caveolären Signaltransduktion*

Aus der Lokalisation der Plasmamembran  $Ca^{2+}$ -ATPase in den Caveolae ergeben sich im wesentlichen zwei Ansätze: erstens ermöglicht dies direkte Protein-Protein-Interaktionen mit anderen dort ansässigen Signalmolekülen, zweitens wäre eine Einflußnahme lokal veränderter Kalziumkonzentrationen in den Signalkomplexen denkbar.

In den Mikrodomänen befinden sich zahlreiche kalziummodulierte Signalmoleküle, zusammen mit der Beobachtung der Transzytose caveolärer Vesikel ergibt sich die Hypothese einer mobilen  $Ca^{2+}$ -Signaleinheit (Isshiki und Anderson, 1999).

Die Frage nach den direkten Interaktionspartnern der PMCA in den Caveolae kann mit den Methoden der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, jedoch bestehen Hinweise für eine Interaktion mit Caveolin. In der Aminosäuresequenz der PMCA findet sich eine bestimmte Abfolge, die als Bindungsmotiv für Caveolin gilt (Couet et al., 1997a).

Vermutet wird aufgrund inhibierender Wirkungen eine Funktion des Caveolin als genereller Kinase-Inhibitor (Okamoto et al., 1998). In Mäusen ist unter dauerhafter intravenöser Isoproterenolgabe eine Abnahme der Caveolinexpression zu beobachten (Oka et al., 1997).

Die Daten der Wachstumsexperimente belegen eine gesteigerte Proteinsynthese neonataler Kardiomyozyten der Linie 1142 unter adrenerger Stimulation, der Signalweg erfährt also durch die hPMCA 4CI-Überexpression eine Verstärkung.

Diese gegensätzlichen Effekte beider Moleküle legen den Schluß einer wechselseitigen Beeinflussung nahe, zusammen mit dem Bindungsmotiv für Caveolin sowie den Kollokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz erscheint eine direkte Interaktion wahrscheinlich.

Caveolin-3 besitzt offensichtlich eine wichtige Funktion in der myogenen Differenzierung. Aus Untersuchungen an der C2C12-Myoblastenlinie geht eine hochregulierte Expression während der Entwicklung zu Myotuben hervor (Song et al., 1996).

Eine andere Arbeit zeigt die Assoziation des Caveolin-3 mit den transversalen Tubuli während der Muskelentwicklung, wohingegen im ausdifferenzierten Skelettmuskel Caveolin auf die sarkolemmalen Kompartimente beschränkt ist (Parton et al., 1997). Diese Beobachtungen an quergestreifter Muskulatur werfen die Frage nach der Rolle des Caveolin-3 im Myokard auf, eine Beteiligung bei kardialen Umbauvorgängen wie der Hypertrophie erscheint hierbei naheliegend.

Spontan hypertensive Ratten zeigen bei zunehmender Myokardhypertrophie Veränderungen in Zahl und Anordnung der Caveolae (Goto et al., 1990).

Abgesehen von direkten Protein-Protein-Interaktionen gilt es auch andere Faktoren im komplexen Geschehen der Signaltransduktion zu berücksichtigen.

Die verstärkte Expression eines Moleküls in den Caveolae nimmt Einfluß auf die Komposition der Plasmamembran, die keinesfalls eine starre Trägerschicht ist, sondern ein stets in Bewegung befindliches Konglomerat aus Lipiden und Proteinen.

Die Lokalisation eines Signalmoleküls kann ligandenabhängig oder –unabhängig sein, d. h. Rezeptoren wie der  $\beta$ -adrenerge werden erst durch Bindung an den Agonisten (NE/ISO) in die Caveolae transportiert, wohingegen der Endothelin-Rezeptor dauerhaft in den Mikrodomänen anzutreffen ist (Okamoto et al., 1998).

In der Translokation des Agonist-Rezeptor-Komplexes in die Caveolae ist ein essentieller Schritt zu Beginn einer Signalkaskade zu sehen. Denkbar wäre ein Einfluß der hPMCA 4CI-Überexpression in den Tieren der Linie 1142 auf diesen Schritt, beispielsweise in der  $\beta$ -adrenergen Signalübertragung.

Bündelung von Rezeptoren und Effektoren in Signalkomplexen bietet die Möglichkeit der Vernetzung einzelner Signalwege über gemeinsam benutzte Botenstoffe.

So aktiviert beispielsweise das ebenfalls in Caveolae lokalisierte Calmodulin (Shaul und Anderson, 1998) nicht nur die PMCA, sondern auch die eNOS (Feron et al., 1998).

## **5.4 Modulation der Wachstumsantwort neonataler Kardiomyozyten unter NOS-Inhibition**

In den letzten zehn Jahren entstanden eine Vielzahl neuer Erkenntnisse und Hypothesen zum Thema NO. Diskutiert wurde eine mögliche Beteiligung des Stickoxids als „second messenger“ in nahezu allen bereits bekannten Parametern und Signalwegen unterschiedlichster Gewebe und Zellarten (Übersicht in Nathan und Xie, 1994).

Zahlreiche klinische Studien belegen eine relevante Beteiligung dieses Signalmoleküls sowohl an physiologischen als auch pathologischen Prozessen am Herzen (Kelly et al., 1996). Die molekularen Grundlagen der Mechanismen, über die NO die kardiale Funktion moduliert, sind jedoch nur teilweise geklärt.

NO als freies radikales Gas ist rasch flüchtig, seine Wirkung dauert nur wenige Sekunden an. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Regulation der Stickoxidwirkung auf Stufe der Synthese. Entscheidende Bedeutung kommt somit einer Funktionsanalyse der generierenden Enzyme, der NO-Synthasen, zu.

### **5.4.1 Die Inhibition der NO-Synthasen durch L-NAME wirkt in neonatalen Kardiomyozyten als Hypertrophiestimulus**

Unter den vielfältigen Wirkungen des Stickoxid (NO) am Myokard wird auch ein anti-proliferativer und pro-apoptotischer Einfluß diskutiert (Garg et al., 1989; Pinsky et al., 1999).

In Experimenten mit  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation wurde mittels L-NAME unselektiv, d. h. nicht-isoformspezifisch, eine Blockade der NO-Synthasen erzielt.

Hierunter war eine Steigerung der Proteinsyntheserate in den neonatalen Kardiomyozyten gegenüber reiner Mediumkultivierung auf den 1,5 bis 2-fachen Wert zu verzeichnen (vgl. Resultate: Abb. 9a, 1. Balkenreihe). Dies entspricht annähernd den unter Isoproterenolstimulation erreichten Werten (vgl. Resultate: Abb. 9a, 2. Balkenreihe).

NOS-Inhibition stellt folglich in neonatalen Herzmuskelzellen einen hypertrophen Stimulus dar, der in seiner Stärke der catecholaminergen Rezeptorstimulation gleichzusetzen ist.

Unter dauerhafter NOS-Inhibition *in vivo* wird im Tiermodell eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks beobachtet (Arnal et al., 1993; Morton et al., 1993).

Einige Autoren beschreiben zusätzlich eine kardiale Hypertrophie, andere beobachten lediglich erhöhte Blutdruckwerte ohne begleitende Zunahme des Herzgewichts (DiFusco und Anand-Srivastava, 2000; Simko und Simko, 2000).

eNOS-knockout Mäuse zeigen eine deutliche Hypertension (Gödecke et al., 1998), in höherem Alter entwickeln diese Tiere Hypertrophie des Herzens. Devlin und Mitarbeiter beschreiben Herzhypertrophie, begleitet von Polyploidie (Mehrkernigkeit) der glatten Gefäßmuskelzellen, unter chronischer NOS-Inhibition durch L-NAME in Ratten (Devlin et al., 1998).

Diese Kontroverse muß in Zusammenhang mit den verwendeten Methoden, Dosierungen und Versuchsmodellen gesehen werden. So ist beispielsweise im *in vivo*-Versuch die begleitende Aktivierung des Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems infolge der Hypertension zu berücksichtigen, was zur Entstehung kardialer Hypertrophie beiträgt (Simko und Simko, 2000).

Systemische Auswirkungen können in der isolierten Kardiomyozytenkultur ausgeschlossen werden. Jedoch ist eine lokale, autokrine Bradykinin-Kallikrein-Produktion für Kardiomyozyten gezeigt worden (Nolly et al., 1994), ein Einfluß der NOS-Inhibition auf diesen Parameter wäre somit denkbar.

Die NO-Synthese und die Beteiligung der einzelnen Isoformen ist zellartspezifisch (Moncada und Higgs, 1993). Bei Experimenten am isolierten Herzen müssen daher parakrine Effekte, etwa die NO-Produktion der Endothelzellen, berücksichtigt werden. Unter der Annahme einer annähernd reinen Kultur aus Myozyten besitzt dies keine Relevanz.

Die Daten der vorliegenden Arbeit legen somit einen direkten molekularen Mechanismus in den neonatalen Kardiomyozyten nahe, durch den L-NAME eine hypertrophe Wachstumsantwort in Form einer gesteigerten Proteinsyntheserate zu bewirken vermag.

Dieser Effekt konnte nach 24 Stunden nicht mehr beobachtet werden (vgl. Resultate: Abb. 9b, 1. Balkenreihe), er zeigte also eine Abhängigkeit von der Zeit.

L-NAME als Esther flutet in den Zellen schnell an und wieder ab, sein Wirkmaximum liegt im Bereich weniger Stunden. Nach 24 Stunden ist bereits von einer Aufhebung der NOS-Inhibition auszugehen. Darüberhinaus könnte die Halbwertszeit der NO-Synthasen eine Rolle spielen, die etwa für die eNOS mit ca. 20 Stunden angegeben wird (Andries et al., 1998).

#### 5.4.2 Die Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase moduliert die Wachstumsantwort auf NOS-Inhibition durch L-NAME

Die Kombination aus L-NAME und Isoproterenol führte zu einer Addition der hypertrophen Wirkung beider Stimuli. Gegenüber den Ausgangswerten in reinem Medium waren die Proteinsyntheseraten in den Myozyten der Linie 1142 auf das 5-fache, in den Wildtypkontrollen auf das 3-fache gesteigert ( vgl. Resultate: Abb. 9a, 3. Balkenreihe). Die hPMCA 4CI-überexprimierenden Zellen sprachen somit signifikant stärker an, während sich in der Analyse des Wachstumsverhaltens unter L-NAME alleine keine Unterschiede zwischen wildtypischen und transgenen neonatalen Kardiomyozyten ergeben hatten.

Bei der Interpretation dieser Daten ergeben sich im wesentlichen zwei Fragestellungen:  
-ad 1, beruht die gesteigerte Proteinsyntheserate bei Kombination von L-NAME und Isoproterenol auf einer Interaktion beider Stimuli, oder handelt es sich um die Summation zweier unabhängiger Effekte?

-ad 2, weswegen sprechen die hPMCA 4CI-überexprimierenden Zellen besser an?

### *Interaktion oder Summation?*

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf gegenseitige Beeinflussung von NO- und  $\beta$ -adrenergem Signalweg im Myokard (Kelly et al., 1996), wobei vorwiegend Auswirkungen auf die Kontraktilität untersucht wurden. Hohe NO-Konzentrationen vermindern die kontraktile Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli; dies wurde sowohl im Tiermodell als auch an isolierten Kardiomyozyten gezeigt (Belhassen et al., 1996; Balligand et al., 1993). Umgekehrt läßt sich unter NOS-Inhibition, z. B. durch L-NAME, eine Verstärkung der inotropen Antwort auf Isoproterenol erzielen (Keaney et al., 1996). Diese Beobachtungen werden gestützt durch klinische Daten, beispielsweise belegen Studien an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie ein verbessertes Ansprechen auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli unter L-NAME (Hare et al., 1998).

In der signifikant gesteigerten Proteinsyntheserate der Herzmuskelzellen unter L-NAME und Isoproterenol wird deutlich, daß NOS-Inhibition außer der kontraktile Funktion auch andere  $\beta$ -adrenerge Effekte beeinflusst. Der Gedanke einer verbesserten Ansprechbarkeit des Myokards auf katecholaminerge Stimuli bei niedrigen NO-Konzentrationen findet hierin Bestätigung.

Im bereits erwähnten eNOS-knockout-Modell der Maus kann eine um 50% erhöhte Dichte der  $\beta$ -Adrenozeptoren beobachtet werden (Gödecke et al., 2001).

Umgekehrt reduziert hohes intrazelluläres cAMP, etwa infolge anhaltender Isoproterenolzufuhr, in Myozyten die eNOS in Expression (mRNA- und Proteinebene) und Aktivität (Belhassen et al., 1996).

Eine Studie von Fukuchi und Mitarbeitern ergab eine verstärkte Expression der eNOS bei Patienten mit Herzinsuffizienz unter Therapie mit  $\beta$ -Blockern (Fukuchi et al., 1998).

Diese Daten machen die wechselseitige Einflußnahme von NO- und  $\beta$ -adrenergem Signalweg deutlich. Die Wachstumsexperimente der vorliegenden Arbeit bestätigen den Gedanken einer Interaktion beider Systeme.



Die molekularen Grundlagen dieser Interaktion sind noch nicht vollständig geklärt. Gemäß der sogenannten Yin-Yang-Hypothese ist das unter NO entstehende cGMP ein Gegenspieler des im katecholaminergen Signalweg generierten cAMP (Mohan et al., 1996). In jüngster Zeit wird auch ein Guanylylzyklase/cGMP-unabhängiger Einfluß des Stickoxids diskutiert (Vila-Petroff et al., 1999).

Direkten Einfluß des NO via S-Nitrosylierung auf die Regulation von Enzymen und Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B), aber auch von Ionenkanälen wie der SERCA sind beschrieben (Drexler, 1999; Xu et al., 1998). Daneben bietet die eNOS aufgrund ihrer spezifischen Lokalisation in den Caveolae den Ansatz für direkte Protein-Protein-Interaktionen mit benachbarten Signalmolekülen der katecholaminergen Signalkaskade (Feron et al., 1996).

#### *Die Rolle der hPMCA 4CI-Überexpression im Rahmen der NO-modulierten $\beta$ -adrenergen Antwort*

Die Überexpression der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beeinflusst die interagierende Signaltransduktion von NO und Isoproterenol, da neonatale Kardiomyozyten der Linie 1142 unter Isoproterenol und L-NAME signifikant höhere Proteinsyntheseraten zeigen als wildtypische Herzmuskelzellen (vgl. Resultate, Abb. 9a).

Die Signalwege von NO und Kalzium sind offensichtlich eng verknüpft, was in muskulärem Gewebe insbesondere den Energiestoffwechsel während des Kontraktionszyklus beeinflusst (Drexler, 1999). Im Myokard scheinen niedrige NO-Konzentrationen die Relation  $\text{O}_2$ -Verbrauch zu Kraftentwicklung positiv zu beeinflussen (Ingwall und Kelly, 1998).

Die Aktivierung der Proteinkinase G durch hohes Stickoxid setzt dagegen die Kalziumsensitivität der Myofilamente herab, mit der Folge eingeschränkter Kontraktilität (Shah et al., 1994; Kaye et al., 1996). Die Höhe der NO-Konzentration entscheidet augenscheinlich über die Wirkung auf die Myozyten: hohes Stickoxid übt negative, niedriges dagegen positive Effekte auf Zellstoffwechsel und Kontraktilität aus (Mohan et al., 1996; Drexler, 1999).

Einfluß hierauf besitzt die generierende Isoform der NOS: während die konstitutiven Enzyme eNOS und nNOS niedrige NO-Spiegel erzeugen, entstehen hohe Spiegel nach Induktion der iNOS (Drexler, 1999).

L-NAME inhibiert unselektiv die NO-Synthasen, daher sind alle in Herzmuskelzellen exprimierten Isoformen für eine Interaktion mit der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Betracht zu ziehen.

Die vorherrschende Isoform ist hierbei die muskelspezifische eNOS. Die gemeinsame Lokalisation von eNOS und PMCA in Caveolae legt eine Interaktion beider Moleküle in diesen Subkompartimenten nahe. Der Regulationskreislauf der eNOS besteht aus der Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und der Inhibierung durch Caveolin, wobei die Translokation in die Mikrodomänen über zwei verschiedene Lipidmodifikationen gesteuert wird (Feron et al., 1998). Calmodulin aktiviert auch die PMCA, die eine hohe Affinität zu diesem Enzym aufweist ( $K_d \sim 1\text{nM}$ ). Möglicherweise verändert die PMCA-Überexpression die Verfügbarkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, und beeinflusst so den Aktivitätsstatus der endothelialen NOS.

Neuere Daten weisen eine herzspezifische nNOS am sarkolemmalen Retikulum (SR) nach, so daß nun entgegen früheren Annahmen die neuronale NOS (NOS-I) am Myokard auch direkt in Kardiomyozyten exprimiert wird (Xu et al., 1999). Das am SR produzierte Stickoxid inhibiert den sarkolemmalen Kalziumeinstrom, vermutlich durch direkte molekulare Interaktion mit der SERCA.

Xu und Mitarbeiter konnten eine Konformationsänderung des sarkolemmalen Kalziumkanals via S-Nitrosylierung zeigen (Xu et al., 1998). Auch für den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanal ist bereits eine NO-abhängige Regulation beschrieben (Campbell et al., 1996).

Eine jüngst veröffentlichte Untersuchung aus dem hiesigen Labor erbrachte den Nachweis einer funktionellen Interaktion der NOS-I mit der PMCA 4b in embryonalen Nierenzellen und Neuroblastomzellen (Schuh et al., 2001).

Mutationsexperimente belegten hierbei eine direkte Bindung über eine spezielle Sequenz beider Moleküle, die sogenannte PDZ-Domäne (Kim et al., 1998), was inhibierend auf die NOS-I wirkt. Deutlich wurde die Relevanz der Kalziumtransportfunktion bzw. der ATPase-Aktivität der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe für diese Inhibition. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Herzmuskelzellen zu prüfen.

Die dritte der NO-Synthasen, die iNOS, ist ein kalziumunabhängiges, nicht konstitutiv exprimiertes Enzym. Ihre Expression wird durch Modulatoren des Immunsystems, wie z. B. Zytokine, gesteuert, ähnlich einer inflammatorischen Reaktion.

Neuere Untersuchungen belegen eine Rolle der iNOS bei pathologischen Zuständen des Herzens (Drexler, 1999). Haywood und Mitarbeiter fanden eine gesteigerte Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Patienten mit Herzinsuffizienz (Haywood et al., 1996). Die Höhe der iNOS-Expression korreliert in endomyokardialen Biopsien transplantierter humaner Herzen mit der Entwicklung systolischer und/oder diastolischer Dysfunktion (Lewis et al., 1996).

Die verbesserte Ansprechbarkeit der  $\beta$ -Adrenozeptoren unter L-NAME bei Patienten mit Herzinsuffizienz wird vorwiegend einer Blockade der iNOS zugeschrieben (Drexler, 1999).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluß der PMCA-Überexpression auf das Ansprechen des  $\beta$ -Rezeptors unter NOS-Inhibition deutlich.

Dies wirft die Frage nach der exakten Verknüpfung der beteiligten Signalwege auf. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die molekularen Mechanismen eines PMCA-modulierten NO-Effekts auf die Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu verstehen, und so gegebenenfalls neue Ansätze für die Therapie der Herzinsuffizienz abzuleiten.

## 5.5 Ausblick: Mögliche Perspektiven in Klinik und Forschung

Nachdem aus der Überexpression der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4CI im transgenen Rattenmodell wichtige Hinweise zur Rolle des Enzyms in der Signaltransduktion gewonnen werden konnten, erfolgt gegenwärtig die Etablierung einer PMCA-knockout-Maus. Anhand der somit möglichen Funktionsanalyse *in vivo* soll die Bedeutung des Enzyms in physiologischen und pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System weiter aufgeklärt werden.

Weiteren Aufschluß über die exakten molekularen Mechanismen, über die die PMCA myozytäres Wachstum moduliert, könnte darüber hinaus durch die Suche nach möglichen Kandidatengen gewonnen werden. Die Charakterisierung der downstream-Regulation ausgehend von beteiligten Faktoren im caveolären Signalgeschehen wurde bereits im Rahmen einer Interaktion von eNOS und Syntrophin unternommen.

Die längerfristige Beobachtung der transgenen Rattenlinie 1142, ggf. zusätzlich unter pathologischen Bedingungen wie erhöhter Nachlast, Hypertonie etc., könnte die Annahme eines gänzlich unveränderten Phänotyps modifizieren und so neue Einblicke ermöglichen.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen zur Modulation des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs in Myozyten durch die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ergibt sich möglicherweise ein neuer therapeutischer Ansatz zur Beeinflussung myokardialer Funktion unter den Bedingungen der Herzinsuffizienz.

## 6 Zusammenfassung

Die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist ein ubiquitär in eukaryonten Zellen vorkommendes Enzym. In Myokardzellen ist ihre Funktion trotz eingehender biochemischer Charakterisierung unklar. Die frühere Hypothese einer Zuständigkeit für die Feinabstimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde in neuerer Zeit ergänzt durch die vermutete Rolle der PMCA in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Dafür spricht auch die Lokalisation der ATPase in Caveolae, spezifischen Membraninvaginationen, in denen wichtige Zentren der zellulären Signalverarbeitung gesehen werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktion der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Myokardzellen, insbesondere in der Übermittlung zellulärer Signale im Rahmen von Apoptose und Wachstum.

Apoptoseexperimente in dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Technik wurden an einer Myoblastenlinie und an transgenen Ratten mit hPMCA 4CI-Überexpression durchgeführt. Neonatale Kardiomyozyten dieser Tiere wurden mittels  $^3\text{H}$ -Leucin-Inkorporation in Ruhe und unter Stimulation mit hypertrophieinduzierenden Substanzen gegenüber wildtypischen Tieren verglichen. Ergänzt wurden diese funktionellen Versuche durch Immunfluoreszenzanalysen.

Ein Einfluß der PMCA-Überexpression auf die Apoptoseraten der untersuchten Zellen bestand nicht. Dagegen zeigten die Wachstumsexperimenten signifikant gesteigerte Proteinsyntheseraten der überexprimierenden neonatalen Kardiomyozyten gegenüber Wildtypkontrollen. Katecholamine sowie NOS-Inhibition mit L-NAME induzierten in den neonatalen Herzmuskelzellen Hypertrophie, Kombination beider Stimuli vervielfachte die Effekte. Die Immunfluoreszenz belegt die Kollokalisierung endogener und transgen exprimierter PMCA mit Caveolin-3 zu 60%.

Wie diese Resultate zeigen, moduliert Überexpression der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase myozytäres Wachstum. Der Einfluß auf den adrenergen und NO-Signalweg belegt die Verknüpfung des Botenstoffs Kalzium mit anderen Signalkaskaden.

Vieles spricht hierbei für eine Interaktion der PMCA mit anderen Signaltransduktionsmolekülen in den Caveolae.

## 7 Literaturverzeichnis

ANDERSON, K. M., ECKHART, A. D., WILLETTE, R. N., KOCH, W. J. (1999). The myocardial  $\beta$ -adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* **33**: 402-407

ANDERSON, R. G. W. (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10909-10913

ANDRIES, L. J., BRUTSAERT, D. L., SYS, S. U. (1998). Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ. Res.* **82**: 195-203

ARAI, M., MATSUI, H., PERIASAMY, M. (1994). Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* **74**: 555-564

ARNAL, J.-F., EL AMRANI, A.-I., CHATELLIER, G., MENARD, J., MICHEL, J.-B. (1993). Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* **22**: 380-387

AUTELITANO, D. J. und WOODCOCK, E. A. (1998). Selective activation of  $\alpha_{1A}$ -adrenergic receptors in neonatal cardiac myocytes is sufficient to cause hypertrophy and differential regulation of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype mRNAs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: 1515-1523

BALLIGAND, J.-L., KELLY, R. A., MARSDEN, P. A., SMITH, T. W., MICHEL, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 347-351

- BALLIGAND, J.-L., UNGUREANU-LONGROIS, D., SIMMONS, W. W., PIMENTAL, D., MALINSKI, T. A., KAPTURCZAK, M., TAHA, Z., LOWENSTEIN, C. J., DAVIDOFF, A. J., KELLY, R. A., SMITH, T. W., MICHEL, T. (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes: characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**: 27580-27588
- BALLIGAND, J.-L., KOBZIK, L., HAN, X., KAYE, D. M., BELHASSEN, L., O'HARA, D. S., KELLY, R. A., SMITH, T. W., MICHEL, T. (1995). Nitric-oxide dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **270**: 14582-14586
- BELHASSEN, L., KELLY, R. A., SMITH, T. W., BALLIGAND, J.-L. (1996). Nitric oxide synthase (NOS3) and contractile responsiveness to adrenergic and cholinergic agonists in the heart. Regulation of NOS3 transcription in vitro and in vivo by cyclic adenosine monophosphate in rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* **97**: 1908-1915
- BERS, D. M., BASSANI, J. W. M., BASSANI, R. A. (1993). Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **27**: 1772-1777
- BORKE, J. L., MINAMI, J., VERMA, A., PENNISTON, J. T., KUMAR, R. (1987). Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$  adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J. Clin. Invest.* **80**: 1225-1231
- BOWMAN, J. C., STEINBERG, S. F., JIANG, T., GEENEN, D. L., FISHMAN, G. I., BUTTRICK, P. M. (1997). Expression of protein kinase  $\text{C}\beta$  in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J. Clin. Invest.* **100**: 2189-2195

- BRANDT, P. C., NEVE, R. L., KAMMESHEIDT, A., RHOADS, R. E., VANAMAN, T. C. (1992). Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels.  
*J. Biol. Chem.* **267**: 4376-4385
- BRANDT, P. C., SISKEN, J. E., NEVE, R. L., VANAMAN, T. C. (1996). Blockade of plasma membrane calcium pumping ATPase isoform 1 impairs nerve growth factor-induced neurite extension in pheochromocytoma cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13843-13848
- BRISTOW, M. R. (1997). Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure.  
*Am. J. Cardiol.* **80**: 26L-40L
- CAMPBELL, D. L., STAMLER, J. S., STRAUSS, H. C. (1996). Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols.  
*J. Gen. Physiol.* **108**: 277-293
- CARAFOLI, E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane.  
*Physiol. Rev.* **71**: 129-153
- CARAFOLI, E. (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane.  
*J. Biol. Chem.* **267**: 2115-2118
- CARAFOLI, E. (1994). Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme.  
*FASEB J.* **8**: 993-1002
- CARAFOLI, E. und STAUFFER, T. (1994). The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression.  
*J. Neurobiol.* **25**: 312-324



- CARIDE, A. J., FILOTEO, A. G., ENYEDI, A., VERMA, A. K., PENNISTON, J. T. (1996). Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies.  
*Biochem. J.* **316**: 353-359
- CHIEN, K. R., KNOWLTON, K. U., ZHU, H., CHIEN, S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response.  
*FASEB J.* **5**: 3037-3046
- CLARK, W. A., RUDNICK, S. J., LAPRES, J. J., LESCH, M., DECKER, R. S. (1991). Hypertrophy of isolated adult feline heart cells following  $\beta$ -adrenergic-induced beating.  
*Am. J. Physiol.* **261**: C530-C542
- COMMUNAL, C., SINGH, K., PIMENTEL, D. R., COLUCCI, W. S. (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of  $\beta$ -adrenergic pathway.  
*Circulation* **98**: 1329-1334
- COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., IKEZU, T., LISANTI, M. P. (1997a). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain.  
*J. Biol. Chem.* **272**: 6525-6533
- COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., SCHERER, P. E., LISANTI, M. P. (1997b). Molecular and cellular biology of caveolae. Paradoxes and plasticities.  
*Trends Cardiovasc. Med.* **7**: 103-110
- CUVILLIER, O., PIRIANOV, G., KLEUSER, B., VANEK, P. G., COSO, O. A., GUTKIND, J. S., SPIEGEL, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.  
*Nature* **381**: 800-803

- DEVLIN, A. M., BROSNAN, M. J., GRAHAM, D., MORTON, J. J., MCPHADEN, A. R., MCINTYRE, M., HAMILTON, C. A., REID, J. L., DOMINICZAK, A. F. (1998). Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo.  
*Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 43)* **274**: H52-H59
- DHALLA, N. S., WANG, X., BEAMISH, R. E. (1996). Intracellular calcium handling in normal and failing hearts.  
*Exp. Clin. Cardio.* **1**: 7-20
- DI FUSCO, F. und ANAND-SRIVASTAVA, M. B. (2000). Enhanced expression of G<sub>i</sub>-proteins in non-hypertrophic hearts from rats with hypertension induced by L-NAME treatment.  
*J. Hypertens.* **18**: 1081-1090
- DREXLER, H. (1999). Nitric oxide synthases in the failing human heart. A doubled-edged sword?  
*Circulation* **99**: 2972-2975
- FADEEL, B., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators.  
*FASEB. J.* **13**: 1647-1657
- FAGAN, K. A., SMITH, K. E., COOPER, D. M. F. (2000). Regulation of the Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase type VI by capacitative Ca<sup>2+</sup> entry requires localization in cholesterol-rich domains.  
*J. Biol. Chem.* **275**: 26530-26537
- FERON, O., BELHASSEN, L., KOBZIK, L., SMITH, T. W., KELLY, R. A., MICHEL, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae.  
*J. Biol. Chem.* **271**: 22810-22814

- FERON, O., MICHEL, J. B., SASE, K., MICHEL, T. (1998). Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions.  
*Biochemistry* **37**: 193-200
- FILOTEO, A. G., ELWESS, N. L., ENYEDI, A., CARIDE, A. J., AUNG, H. H., PENNISTON, J. T. (1997). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump in rat brain.  
*J. Biol. Chem.* **272**: 23741-23747
- FUJIMOTO, T. (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae.  
*J. Cell Biol.* **120**: 1147-1157
- FUKUCHI, M., HUSSAIN, S. N. A., GIAID, A. (1998). Heterogenous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. Their relation to lesion site and  $\beta$ -adrenergic receptor therapy.  
*Circulation* **98**: 132-139
- FURCHGOTT, R. F. und ZAWADZKI, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
*Nature* **288**:373-376
- GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D. F., LIU, J., SESSA, W. C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1.  
*J. Biol. Chem.* **271**: 27237-27240
- GARCIA, M. L., USACHEV, Y. M., THAYER, S. A., STREHLER, E. E., WINDEBANK, A. J. (2001). Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca(2+)-mediated cytotoxicity in PC12 cells.  
*J. Neurosci. Res.* **64 (6)**: 661-669

- GARG, U. C., HASSID, A. (1989). Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.  
*J. Clin. Invest.* **83**: 1774-1777
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.  
*J. Biol. Chem.* **119**: 493-501
- GENG, Y. J., ISHIKAWA, Y., VATNER, D. E., WAGNER, T. E., BISHOP, S. P., VATNER, S. F., HOMCY, C. J. (1999). Apoptosis of cardiac myocytes in  $G_{\text{sa}}$  transgenic mice.  
*Circ. Res.* **84**: 34-42
- GILBERT, E. M., OLSEN, S. L., RENLUND, D. G., BRISTOW, M. R. (1993). Beta-adrenergic receptor regulation and left ventricular function in idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*Am. J. Cardiol.* **71**: 23C-29C
- GÖDECKE, A., DECKING, U. K. M., DING, Z., HIRCHENHAIN, J., BIDMON, H.-J., GÖDECKE, S., SCHRADER, J. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice.  
*Circ. Res.* **82**: 186-194
- GÖDECKE, A., HEINICKE, T., KAMKIN, A., KISELEVA, I., STRASSER, R. H., DECKING, U., STUMPE, T., ISENBERG, G., SCHRADER, J. (2001). Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts.  
*J. Physiol.* **532**: 195-204
- GÓMEZ, A. M., VALDIVIA, H. H., CHENG, H., LEDERER, M. R., SANTANA, L. F., CANNELL, M. B., McCUNE, S. A., ALTSCHULD, R. A., LEDERER, W. J. (1997). Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure.  
*Science* **276**: 800-806

- GOTO, Y., YOSHIKANE, H., HONDA, M., MORIOKA, S., YAMORI, Y., MORIYAMA, K. (1990). Three-dimensional observation on sarcoplasmic reticulum and caveolae in myocardium of spontaneously hypertensive rats.  
*J. Submicrosc. Cythol. Pathol.* **22**: 535-542
- GUERINI, D., SCHRÖDER, S., FOLETTI, D., CARAFOLI, E. (1995). Isolation and characterization of a stable Chinese hamster ovary cell line overexpressing the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.  
*J. Biol. Chem.* **270**: 14643-14650
- HAMET, P., RICHARD, L., DAM, T. V., TEIGER, E., ORLOV, S. N., GABOURY, L., GOSARD, F., TREMBLAY, J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension.  
*Hypertension* **26**: 642-648
- HAMMES, A. (1997). Funktionsanalyse der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch Überexpression im Zellmodell und im Myokard transgener Ratten. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.
- HAMMES, A., OBERDORF, S., STREHLER, E. E., STAUFFER, T., CARAFOLI, E., VETTER, H., NEYSES, L. (1994). Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.  
*FASEB J.* **8**: 428-435
- HAMMES, A., OBERDORF-MAASS, S., JENATSCHKE, S., PELZER, T., MAASS, A., GOLLNICK, F., MEYER, R., AFFLERBACH, J., NEYSES, L. (1996). Expression of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in myogenic cells.  
*J. Biol. Chem.* **271**: 30816-30822

HAMMES, A., OBERDORF-MAASS, S., ROTHER, T., NETHING, K., GOLLNICK, F., LINZ, K. W., MEYER, R., HU, K., HAN, H., GAUDRON, P., ERTL, G., HOFFMANN, S., GANTEN, U., VETTER, R., SCHUH, K., BENKWITZ, C., ZIMMER, H. G., NEYSES, L. (1998). Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats.

*Circ. Res.* **83**: 877-888

HARE, J. M., GIVERTZ, M. M., CREAGER, M. A., COLUCCI, W. S. (1998). Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure. Potentiation of  $\beta$ -adrenergic inotropic responsiveness.

*Circulation* **97**: 161-166

HASENFUSS, G. (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure.

*Cardiovasc. Res.* **37**: 279-289

HASENFUSS, G., REINECKE, H., STUDER, R., MEYER, M., PIESKE, B., HOLTZ, J., HOLUBARSCH, C., POSIVAL, H., JUST, H., DREXLER, H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in failing and non-failing human myocardium.

*Circ. Res.* **75**: 434-442

HASENFUSS, G., SCHILLINGER, W., LEHNART, S. E., PREUSS, M., PIESKE, B., MAIER, L. S., PRESTLE, J., MINAMI, K., JUST, H. (1999). Relationship between  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium.

*Circulation* **99**: 641-648

HAYWOOD, G. A., TSAO, P. S., VON DER LEYEN, H. E., MANN, M. J., KEELING, P. J., TRINDADE, P. T., LEWIS, N. P., BYRNE, C. D., RICKENBACHER, P. R., BISHOPRIC, N. H., COOKE, J. P., MCKENNA, W. J., FOWLER, M. B. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure.

*Circulation* **93**: 1087-1094

- HORI, M., SATO, H., KITAKAZE, M., IWAI, K., TAKEDA, H., INOUE, M., KAMADA, T. (1994).  $\beta$ -Adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload.  
*Circ. Res.* **75**: 324-334
- HUSAIN, M., JIANG, L., SEE, V., BEIN, K., SIMONS, M., ALPER, S. L., ROSENBERG, R. D. (1997). Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.  
*Am. J. Physiol.* **272** (*Cell Physiol.* **41**): C1947-C1959
- INGWALL, J. S. und KELLY, R. A. (1998). Nitric oxide, myocardial oxygen consumption, and ATP synthesis.  
*Circ. Res.* **83**: 1067-1068
- ISSHIKI, M. und ANDERSON, R. G. (1999). Calcium signal transduction from caveolae.  
*Cell Calcium* **26**(5): 201-208
- JAYARAMAN, T. und MARKS, A. R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis.  
*J. Mol. Cell. Biol.* **17** (6): 3005-3012
- JU, H., ZOU, R., VENEMA, V. J., VENEMA, R. C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity.  
*J. Biol. Chem.* **272**: 18522-18525
- KAJSTURA, J., CHENG, W., REISS, K., CLARK, W. A., SONNENBLICK, E. H., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., OLIVETTI, G., ANVERSA, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats.  
*Lab. Invest.* **74**: 86-107
- KANNEL, W. B., GORDON, T., OFFUTT, D. (1969). Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram: Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham Study.  
*Ann. Int. Med.* **71**: 89-101

- KATOH, Y., KOMURO, I., SHIBASAKI, Y., YAMAGUCHI, H., YAZAKI, Y. (1989). Angiotensin II induces hypertrophy and oncogene expression in cultured cardiac myocytes. *Circulation* **80** [Suppl. II]: II-450
- KAYE, D. M., WIVIOTT, S. D., BALLIGAND, J.-L., SIMMONS, W. W., SMITH, T. W., KELLY, R. A. (1996). Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function on adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **78**: 217-224
- KEANEY, J. F., HARE, J. M., BALLIGAND, J.-L., LOSCALZO, J., SMITH, T. W., COLUCCI, W. S. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol.* **271**: H2646-H2652
- KELLY, R. A., BALLIGAND, J.-L., SMITH, T. W. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* **79**: 363-380
- KIM, E., DEMARCO, S. J., MARFATIA, S. M., CHISHTI, A. H., SHENG, M., STREHLER, E. E. (1998). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains. *J. Biol. Chem.* **273**: 1591-1595
- KJAER, A. und HESSE, B. (2001). Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clin. Physiol.* **21**: 661-672
- KNOWLTON, K. U., BARACCHINI, E., ROSS, R. S., HENDERSON, S. A., EVANS, S. M., GLEMBOTSKI, C. C., CHIEN, K. R. (1991). Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during  $\alpha$ -adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 7759-7768



KUO, T. H., WANG, K. K., CARLOCK, L., DIGLIO, C., TSANG, W. (1991). Phorbol ester induces both gene expression and phosphorylation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump.

*J. Biol. Chem.* **266**: 2520-2525

LAM, M., DUBYAK, G., CHEN, L., NUNEZ, G., MIESFELD, R. L., DISTELHORST, C. W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6569-6573

LEVY, D., GARRISON, R. J., SAVAGE, D. D., KANNEL, W. B., CASTELLI, W. P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study.

*N. Engl. J. Med.* **322**: 1561-1566

LEWIS, N. P., TSAO, P. S., RICKENBACHER, P. R., XUE, C., JOHNS, R. A., HAYWOOD, G. A., VON DER LEYEN, H., TRINDADE, P. T., COOKE, J. P., HUNT, S. A., BILLINGHAM, M. E., VALANTINE, H. A., FOWLER, M. B. (1996). Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle.

*Circulation* **93**: 720-729

LISANTI, M. P., SCHERER, P. E., TANG, Z., SARGIACOMO, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis.

*Trends Cell Biol.* **4**: 231-235

LIU, B. F., XU, X., FRIDMAN, R., MUALLEM, S., KUO, T. H. (1996). Consequences of functional expression of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform 1a.

*J. Biol. Chem.* **271**: 5536-5544

MACLELLAN, W. R. und SCHNEIDER, M. D. (1997). Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease.

*Circ. Res.* **81**: 137-144

- MAGNUSSON, Y., WALLUKAT, G., WAAGSTEIN, F., HJALMARSON, Ä., HOEBEKE, J. (1994). Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the  $\beta_1$ -adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* **89**: 2760-2767
- MAJNO, G. und JORIS, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15
- MARLETTA, M. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**: 927-930
- MICHEL, T. und FERON, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100** (9): 2146-2152
- MINEO, C., YING, Y. S., CHAPLINE, C., JAKEN, S., ANDERSON, R. G. W. (1998). Targeting of protein kinase C $\alpha$  to caveolae. *J. Cell Biol.* **141**: 601-610
- MOHAN, P., BRUTSAERT, D. L., PAULUS, W. J., SYS, S. U. (1996). Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation* **93**: 1223-1229
- MOLKENTIN, J. D. und DORN, G. W. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 391-426
- MONCADA, S. und HIGGS, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**: 2002-2012

- MORTON, J. J., BEATTIE, E. C., SPEIRS, A., GULLIVER, F. (1993). Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy.  
*J. Hypertens.* **11**: 1083-1088
- NATHAN, C. und XIE, Q.-W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.  
*Cell* **78**: 915-918
- NEYSES, L., REINLIB, L., CARAFOLI, E. (1985). Phosphorylation of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane.  
*J. Biol. Chem.* **260**: 10283-10287
- NICOTERA, P. und ORRENIUS, S. (1998). The role of calcium in apoptosis.  
*Cell Calcium.* **23 (2-3)**: 173-180
- NOLLY, H., CARBINI, L. A., SCICLI, G., CARRETERO, O. A., SCICLI, A. G. (1994). A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts.  
*Hypertension* **23**: 919-923
- OKA, N., ASAI, K., KUDEJ, R. K., EDWARDS, J. G., TOYA, Y., SCHWENCKE, C., VATNER, D. E., VATNER, S. F., ISHIKAWA, Y. (1997). Downregulation of caveolin by chronic  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in mice.  
*Am. J. Physiol.* **273 (Cell Physiol. 42)**: C1957-C1962
- OKAMOTO, T., SCHLEGEL, A., SCHERER, P. E., LISANTI, M. P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.  
*J. Biol. Chem.* **273**: 5419-5422
- OLIVETTI, G., ABBI, R., QUAINI, F., KAJSTURA, J., CHENG, W., NITAHARA, J. A., QUAINI, E., DI LORETA, C., BELTRAMI, C. A., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., ANVERSA, P. (1997). Apoptosis in the failing human heart.  
*N. Engl. J. Med.* **336**: 1131-1141

- PACKER, M. (1993). How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease.  
*Am. J. Cardiol.* **71**: 3C-11C
- PALADE, G. E. (1953). Fine structure of blood capillaries.  
*J. Appl. Physics* **24**: 1424
- PARTON, R. G., WAY, M., ZORZI, N., STANG, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation.  
*J. Cell Biol.* **136**: 137-154
- PEUNOVA, N., KUZIN, B., ROBERTS, I., O'KANE, C., ENIKOLOPOV, G. (1996). Nitric oxide, cell multiplication, and cell survival.  
*Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **61**: 417-426
- PINSKY, D. J., AII, W., SZABOLCS, M., ATHAN, E. S., LIU, Y., YANG, Y. M., KLINE, R. P., OLSON, K. E., CANNON, P. J. (1999). Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture.  
*Am. J. Physiol.* **277** (*Heart Circ. Physiol.* **46**): H1189-H1199
- PINSON, A., SCHLÜTER, K.-D., ZHOU, X. J., SCHWARTZ, P., KESSLER-ICEKSON, G., PIPER, H. M. (1993).  $\alpha$ -And  $\beta$ -adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**: 477-490
- PIUHOLA, J., HAMMES, A., SCHUH, K., NEYSES, L., VUOLTEENAHO, O., RUSHKOA, H. (2001). Overexpression of sarcolemmal calcium pump attenuates induction of cardiac gene expression in response to ET-1.  
*Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281** (3): R699-R705
- RAPOSO, G., DUNIA, I., DELAVIER-KLUTCHKO, C., KAVERI, S., STROSBERG, A. D., BENEDETH, E. L. (1987). Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands.  
*Biol. Cell* **60**: 117-124

- RICHLER, C. und YAFFE, D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines.  
*Dev. Biol.* **23**: 1-22
- ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y., GLENNEY, J. R., ANDERSON, R. G. W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.  
*Cell* **68**: 673-682
- SABBAH, H. N. (1999). The cellular and physiologic effects of beta blockers in heart failure.  
*Clin. Cardiol.* **22** (Suppl. V): V16-V20
- SARASTE, A., PULKKI, K., KALLAJOKI, M., HENRIKSEN, K., PARVINEN, M., VOIPIO-PULKKI, L.-M. (1996). Apoptosis in human myocardial infarction.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: A106 (abstract)
- SARGIACOMO, M., SUDOL, M., TANG, Z., LISANTI, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells.  
*J. Cell Biol.* **122**: 789-807
- SCHATZMANN, H. J. (1966). ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion from human red cells.  
*Experientia* **22**:364-368
- SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F., LISANTI, M. P. (1996). Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 131-135
- SCHMIDT, H. H., GAGNE, G. D., NAKANE, M., POLLOCK, J. S., MILLER, M. F., MURAD, F. (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction.  
*J. Histochem. Cytochem.* **40**: 1439-1456

- SCHRAMM, C. M., OMLOR, G. J., QUINN, L. M., NOVERAL, J. P. (1996). Methylprednisolone and isoproterenol inhibit airway smooth muscle proliferation by separate and additive mechanisms.  
*Life Sci.* **59**: PL9-PL14
- SCHUH, K., ULDRIJAN, S., TELKAMP, M., RÖTHLEIN, N., NEYSES, L. (2001). The plasma-membrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I.  
*J. Cell. Biol.* **155**: 201-205
- SCHWENCKE, C., YAMAMOTO, M., OKUMURA, S., TOYA, Y., KIM, S.-J., ISHIKAWA, Y. (1999). Compartmentation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate signaling in caveolae.  
*Mol. Endocrinol.* **13**: 1061-1070
- SHAH, A. M., SPURGEON, H. A., SOLLOTT, S. J., TALO, A., LAKATTA, E. G. (1994). 8-Bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes.  
*Circ. Res.* **74**: 970-978
- SHAUL, P. W. und ANDERSON, R. G. W. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction.  
*Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* **19** **275**: L843-L851
- SHIZUKUDA, Y., BUTTRICK, P. M., GEENEN, D. L., BORCZUK, A. C., KITSIS, R. N., SONNENBLICK, E. H. (1998). Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy.  
*Am. J. Physiol.* **275**: H961-968
- SHUBEITA, H. E., MCDONOUGH, P. M., HARRIS, A. N., KNOWLTON, K. U., GLEMBOTSKI, C. C., BROWN, J. H., CHIEN, K. R. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy.  
*J. Biol. Chem.* **265**: 20555-20562

- SIMKO, F. und SIMKO, J. (2000). The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle.  
*Physiol. Res.* **49**: 37-46
- SIMPSON, P. C. (1985). Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an  $\alpha_1$ -adrenergic receptor and induction of beating through an  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptor interaction.  
*Circ. Res.* **56**: 884-894
- SIMPSON, P., SAVION, S. (1982). Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells.  
*Circ. Res.* **50**: 101-116
- SOMLYO, A. P. (1985). Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle.  
*Circ. Res.* **57**: 497-507
- SONG, K. S., SCHERER, P. E., TANG, Z., OKAMOTO, T., LI, S., CHAFEL, M., CHU, C., KOHTZ, D. S., LISANTI, M. P. (1996). Expression of Caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells.  
*J. Biol. Chem.* **271**: 15160-15165
- STAUFFER, T. P., HILFIKER, H., CARAFOLI, E., STREHLER, E. E. (1993). Quantitative analysis of the alternative splicing options of the human plasma membrane calcium pumps.  
*J. Biol. Chem.* **268**: 25993-26003
- STREHLER, E. E. (1990). Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers.  
*Semin. Cell. Biol.* **1**: 283-295
- STROSBERG, A. D. (1991). Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins.  
*Eur. J. Biochem.* **196**: 1-10

- STUDER, R., REINECKE, H., BILGER, J., ESCHENHAGEN, T., BÖHM, M., HASENFUSS, G., JUST, H., HOLTZ, J., DREXLER, H. (1994). Gene expression of the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure.  
*Circ. Res.* **75**: 443-453
- TEIGER, E., DAM, T.-V., RICHARD, L., WISNEWSKY, C., TEA, B.-S., GABOURY, L., TREMBLAY, J., SCHWARTZ, K., HAMET, P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat.  
*J. Clin. Invest.* **97**: 2891-2897
- TOYA, Y., SCHWENCKE, C., COUET, J., LISANTI, M. P., ISHIKAWA, Y. (1998). Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides.  
*Endocrinology* **139** (4): 2025-2031
- VETTER, R., STUDER, R., REINECKE, H., KOLAR, F., OSTÁDALOVÁ, I., DREXLER, H. (1995). Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and SERCA2 in rat heart.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 1689-1701
- VILA-PETROFF, M. G., YOUNES, A., EGAN, J., LAKATTA, E. G., SOLLOTT, S. J. (1999). Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes.  
*Circ. Res.* **84**: 1020-1031
- VORHERR, T., JAMES, P., KREBS, J., ENYEDI, A., MCCORMICK, D. J., PENNISTON, J. P., CARAFOLI, E. (1990). Interaction of calmodulin with the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump.  
*Biochemistry* **29**: 355-365
- WANG, J. und WALSH, K. (1996). Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation.  
*Science* **273**: 359-361



- WANG, K. K. W., WRIGHT, L. C., MACHAN, C. L., ALLEN, B. G., CONIGRAVE, A. D., ROUFOGALIS, B. D. (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes.  
*J. Biol. Chem.* **266**: 9078-9085
- WONG, K., BOHELER, K. R., PETROU, M., YACOUB, M. H. (1997). Pharmacological modulation of pressure-overload cardiac hypertrophy. Changes in ventricular function, extracellular matrix, and gene expression.  
*Circulation* **96**: 2239-2246
- XU, K. Y., HUSO, D. L., DAWSON, T. M., BREDT, D. S., BECKER, L. C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 657-662
- XU, L., EU, J. P., MEISSNER, G., STAMLER, J. S. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-s-nitrosylation.  
*Science* **279**: 234-237
- YAFFE, D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**: 477-483
- YAMADA, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.  
*J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**: 445-458
- YAMAZAKI, T., KOMURO, I., ZOU, Y., KUDOH, S., SHIOJIMA, I., HIROI, Y., MIZUNO, T., AIKAWA, R., TAKANO, H., YAZAKI, Y. (1997). Norepinephrine induces the *raf*-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors.  
*Circulation* **95**: 1260-1268
- YAMAZAKI, T., KOMURO, I., YAZAKI, Y. (1995). Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 133-140

ZOU, Y., KOMURO, I., YAMAZAKI, T., KUDOH, S., UOZUMI, H., KADOWAKI, T., YAZAKI, Y. (1999). Both G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> Proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy.  
*J. Biol. Chem.* **274**: 9760-9770

## 8 Appendix

### 8.1 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaM	Calmodulin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	(desoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS	(fetal calf serum) fetales Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin, N-2-ethansulfonat
mRNA	(messenger ribonucleic acid) messenger Ribonukleinsäure
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo Dalton
L-NAME	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
M	molar
MEM	Modified Eagle Medium
min.	Minute
Mio.	Million
Na <sup>+</sup>	Natrium
NO	(nitric oxide) Stickstoffmonoxid

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	(phosphate-buffered saline), s. Puffer
PFA	Paraformaldehyd
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> -ATPase
rpm	(rotations per minute), Umdrehungen pro Minute
SD	Sprague Dawley
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums
SSC	saline sodium citrate
TCA	(trichloroacetic acid) Essigsäure
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling

Hier nicht erwähnte Abkürzungen sind im folgenden unter Kapitel 8.2 „Verwendete Chemikalien und Materialien“, sowie Kapitel 8.4 „Verwendete Puffer und Lösungen“ (s. dort) aufgelistet.

Einheiten des SI (Système International d'Unités)-Systems wurden nicht aufgeführt.

## 8.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

Alle nicht im folgenden erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad war mindestens „pro analysi“.

Anti-Caveolin 3 Antikörper, polyklonal	Dianova, Best.-Nr. C 38330
Anti-PMCA Antikörper 5F10	Sigma, Best.-Nr. A 7952
BrdU	Sigma, Best.-Nr. B-5002
BSA	Sigma, Best.-Nr. A-7906
Cy <sup>TM</sup> -conjugated goat anti-mouse IgG	Dianova, Best.-Nr. 115-225-003
Deckgläschen („slides“)	Assistent, Ø 12mm

disposable cell scraper	Sarstedt, Best.-Nr. 83.1830
DMEM	PAA, Best.-Nr. E 15-806
HOECHST 33258	Sigma, Best.-Nr. B-1155
DNase	Sigma, Best.-Nr. DN-25
Einmal-Filterhalter 0,2µm	Schleicher & Schuell FP 030/3
Ethanol	J. T. Baker, Best.-Nr. 8006
FCS	Seromed, Best.-Nr. S 0115
Geneticin (G-418)	Sigma, Best.-Nr. G- 9516
Gentamicin	Sigma, Best.-Nr. G-1272
Heparin	Hoffmann-LaRoche, Liquemin <sup>®</sup> N 25 000
HEPES	Serva, Best.-Nr. 25245
<sup>3</sup> H-Leucin	Amersham, Best.-Nr. TRK 636
Insulin	Serva, Best.-Nr. 26350 (Insulin-Zn-Komplex)
(-)-Isoproterenol	Sigma, Best.-Nr. I-6504
L-NAME	Sigma, Best.-Nr. N-5751
MEM	Sigma, Best.-Nr. M 4655
Mowiol 40-88	Aldrich (Sigma), Best.-Nr. 32, 459-0
Multitest-Objektträger	DUNN-Labortechnik
Objektträger, geschnitten	Waldeck, 76x26 mm
Paraformaldehyd	Serva, Best.-Nr. 31628
Penicillin G	Sigma, Best.-Nr. PEN-K
(-)-Phenylephrine-HCL	Serva, Best.-Nr. 32341
Plastikpipetten 10ml	Bibby Sterilin Ltd.
SDS	Sigma, Best.-Nr. L-4509
Streptomycin-Sulfat	Sigma, Best.-Nr. S-6501
Szintillationsflüssigkeit Emulsifier-Safe™	Packard, Best.-Nr. 6013389
TexasRed conjugated goat anti-rabbit IgG	Dianova, Best.-Nr. 111-075-144
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco-BRL, Best.-Nr. 15250-061
Trypsin	Difco, Best.-Nr. 0152-15-9
TUNEL-Kit	Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1684817
TWEEN 20	Sigma, Best.-Nr. P-1379

VECTASHIELD®

VECTOR, Best.-Nr. H-1000

Vitamin B<sub>12</sub>

Serva, Best.-Nr. 38310

### 8.3 Geräteverzeichnis

Autoklav

Fedegari (Tecnomara) Nr. E, Typ FV

Membran-Vakuumpumpe

Vacuu-Brand

Szintillationszähler

Packard, Liquid Scintillation Analyzer  
1900 CA

Inkubator für Zellkultur (a)

Forma Scientific, Steri-Cult 200

Inkubator für Zellkultur (b)

Heraeus, Typ BB 16

Laser-Konfokalmikroskop

BioRad MRC 1024, LaserSharp Software

Küvetten (DNA-Messung)

Kartell dispolab 4,5 ml, P.N.1960

Lichtmikroskop, invers

Zeiss axiovert 135

Pipetus

Hirschmann

Spektrophotometer

Perkin-Elmer, LS 50 B

Sterilbank

Steril S. p. A., Antares 72

Zählkammer

Marienfels, nach Fuchs-Rosenthal

Zentrifuge (a)

Beckman CL-GPKR

Zentrifuge (b)

Eppendorf centrifuge 5415c

### 8.4 Verwendete Lösungen und Puffer

PBS (pH 7,4)

NaCl

137 mM

KCl

2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

4,3 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,4 mM

CBFHH (calcium and bicarbonate-free Hanks with HEPES)

HEPES, pH 7,4	20,06 mM
NaCl	137,0 mM
KCl	5,36 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,81 mM
Dextrose (D-Glukose)	5,55 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,34 mM

Verdau-Lösung (Kardiomyozytenpräparation)

CBFHH	s. o.
Trypsin	1,5 mg/ml CBFHH
Dnase (2 ng auf 1 ml 0,15 M NaCl)	1 µl/ml CBFHH

20 x SSC (pH 7,0)

NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> -Citrat	0,3 M

1x Trypsin/EDTA-Lösung (Myoblastenkultur)

EDTA	10mM
Trypsin	1x

Färbelösung der Kardiomyozyten

Trypanblau	4 mg/ml NaCl
NaCl	0,15 M

Mediumzusätze in „MEM-5“

FCS	5%
Penicillin G	1600 U/mg
Streptomycin	50 mg/ml MEM
Vitamin B <sub>12</sub>	2 mg/ml MEM
BrdU	3,074 mg/ml MEM

Mediumzusätze in „MEM-T/I“

Penicillin G	1600 U/mg
Streptomycin	50 mg/ml MEM
Vitamin B <sub>12</sub>	2 mg/ml MEM
BrdU (in H <sub>2</sub> O)	3,074 mg/ml MEM
Transferrin (in H <sub>2</sub> O)	1 mg/ml MEM
Insulin (in 1mM HCl)	1 mg/ml MEM

Fixationslösung (TUNEL-Assay)

PBS (pH 7,4)	s. o.
Paraformaldehyd	2%

Wasch-/Blockierlösung (TUNEL-Assay)

PBS (pH 7,4)	s. o.
BSA	2%, 4°C
TWEEN	20%

Permeabilisationslösung (TUNEL-Assay)

Triton	0,75%
Sodium citrate	0,1%



## 9 Danksagung

In besonderem Maße Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Ludwig Neyses für die Überlassung des Themas, die Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung während der Erstellung dieser Promotionsarbeit.

Die hPMCA 4CI-überexprimierenden L6-Zelllinie, die L6-neo-Kontrollen und die transgenen Ratten der Linie 1142 wurden von Frau Dr. Annette Hammes, Max-Delbrück-Centrum, Berlin etabliert und für die Versuche der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Frau Dr. Annette Hammes gilt hierfür mein herzlichster Dank, ebenso für die freundliche Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Neyses im kardiologischen Labor der Universität Würzburg möchte ich mich herzlich für die motivierende und kooperative Arbeitsatmosphäre bedanken. Für die ständige Diskussionsbereitschaft und fördernden Ratschläge danke ich besonders Herrn Dr. Kai Schuh. Frau Silke Oberdorf-Maass habe ich für die kompetente Beratung und tatkräftige Hilfe in allen technischen Fragen zu danken.

Für die Benutzung des BioRad MRC 1024 Laser-Konfokalmikroskops danke ich der Abteilung für Anästhesiologie der Universität Würzburg.

Ich danke von Herzen Peter Leisentritt für seine Unterstützung.

Nicht in Worte zu fassen ist der Dank, den ich an dieser Stelle meiner Mutter aussprechen möchte.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Katja Nething
Geburtsdatum/ -ort	19. Dezember 1972, Kirchheim/Teck
Familienstand	ledig
Eltern	Waltraud Nething, geb. Schwenk, Lehrerin Gunther Nething, Redakteur

### Schulbildung

1979-1983	Grundschule Alleenschule, Kirchheim/Teck
1983-1992	Ludwig-Uhland-Gymnasium, Kirchheim/Teck
Mai 1992	Abitur

### Studium

WS 1993/94	Studium der Biologie, Universität Würzburg
1994 – 2000	Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
März 1996	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 1998	USMLE Step I
Sept. 1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktische Tätigkeiten u. Beruf

1992-1993	Freiwilliges Soziales Jahr, Blindeninstitutsstiftung Würzburg
Okt. 99 – Okt. 00	Praktisches Jahr, Univ. Würzburg u. Frankfurt/M., University of North Carolina at Chapel Hill, USA
Febr. 01 – Dez. 01	Ärztin im Praktikum, Universitätskinderklinik Ulm (Ärztl. Dir.: Prof. Dr. K.-M. Debatin)
seit Jan. 2002	DRK-Kinderklinik Siegen (Chefarzt: Prof. Dr. R. Burghard). Abt. Allgemeine Pädiatrie, Kinder- kardiologische Ambulanz
Aug. 2002	Approbation