



Die Rolle der Na⁺/K⁺-ATPase in der Herzinsuffizienz

The Na⁺/K⁺-ATPase and its role in heart failure

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Antonella Cellini

aus Dachau

Würzburg, 2022



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Peter Heuschmann

1. Betreuer: PD Dr. Petra Eder-Negrin

2. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bauer

3. Betreuer: Prof. Dr. Angela Mally

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaac Newton

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich meinen besonderen Dank an nachstehende Personen richten, die mich während meines Promotionsvorhabens unterstützt haben und die maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst PD Dr. Petra Eder-Negrin für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und für die Betreuung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich ihr für die Offenheit gegenüber Projektvorschlägen und den konstruktiven Austausch.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bauer für die unkomplizierte Übernahme der Zweitbetreuung und die Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Ebenso danke ich Prof. Angela Mally für die Drittbetreuung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Maack für die Betreuung im letzten Promotionsjahr bedanken sowie für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. An dieser Stelle gilt mein Dank insbesondere für der Hilfsbereitschaft in jeder Situation und für den wissenschaftlichen Austausch.

Ferner danke ich Prof. Dr. Peter Heuschmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Ich möchte ebenfalls Prof. Dr. Michaela Kuhn für die Unterstützung in der Methodik danken.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Michael Kohlhaas bedanken, der mich im letzten Promotionsjahr betreut hat. Ihm soll an dieser Stelle vor allem für die methodische Fachexpertise, die zahlreichen konstruktiven Kritiken und die stets hilfsbreite Unterstützung bei Problemen jeder Art gedankt sein.

Mein außerordentlicher Dank gilt zudem Dr. Anahi-Paula Arias-Loza für die Durchführung der Myokardinfarkt-Operationen und der echokardiographischen Untersuchungen. Ich möchte mich vor allem für die stets hilfsbereite Art und die zahlreichen Hilfestellungen bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenso bei Sandra Umbenhauer für die Durchführung der echokardiographischen Untersuchungen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich Dr. Sandra Bandleon für die für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfestellung im Labor danken.

Mein Dank gilt ebenso Anna-Karina Lamprecht, Alice Schaaf, Michelle Gulentz, Annette Berbner, Helga Wagner und Katharina Marnet für die hervorragende experimentelle Unterstützung und für die vielen praktischen Labortipps.

Des Weiteren richte ich mein Dank an Ilona Kutschka und Dr. Anna Janz für die mentale Unterstützung v.a. im letzten Jahr, sowie für die zahlreichen Hilfestellungen und für die Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Zudem möchte ich mich noch bei allen Arbeitskollegen am DZHI für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken, sowie für die Unterstützung bei allen Belangen.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Verlobten Kai Wagner für die stets uneingeschränkte Unterstützung und den jahrelangen Rückhalt bedanken. Ohne diesen Beistand hätte ich dies alles niemals erreichen können.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Formelverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	XI
Abstract.....	XII
1. Einleitung	1
1.1 Prävalenz und Bedeutung der Herzinsuffizienz	1
1.2 Formen der Herzinsuffizienz	3
1.3 Klassifikation der New York Heart Association	5
1.4 Klassifikation der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie	7
1.5 Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz.....	8
1.6 Adaptionsmechanismen.....	9
1.6.1 Frank-Starling-Mechanismus	9
1.6.2 Neuroendokrine Aktivierung	11
1.6.3 Sekretion natriuretischer Peptide	18
1.6.4 Kardiales Remodeling	18
1.7 Aufbau und Funktion des Herzens	25
1.8 Die β -adrenerge Signaltransduktion	26
1.9 Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$	30
1.9.1 Aufbau, Struktur und Funktion.....	30
1.9.2 Rolle in der Pathogenese kardialer Erkrankungen.....	34
1.9.3 Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ als pharmakologisches Target in der Therapie der Herzinsuffizienz.....	38
1.10 Ziele und Fragestellungen.....	42
2. Material	43
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	43
2.2 Enzyme.....	46

2.3	Antikörper.....	46
2.3.1	Primärantikörper	46
2.3.2	Sekundärantikörper.....	47
2.3.3	IgG-Antikörper.....	47
2.4	Primer	47
2.5	Puffer und Lösungen.....	48
2.6	Medien	50
2.7	Kits.....	51
2.8	Verbrauchsmaterialien	51
2.9	Geräte.....	53
2.10	Operations- bzw. Präparierbesteck	56
2.11	Mäuse mit einer kardialen Überexpression der NKA α 2-Isoform	56
2.12	Software und Datenbanken.....	57
3.	Methoden	58
3.1	Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR.....	58
3.1.1	Präparation genomischer DNA.....	58
3.1.2	Präparation genomischer DNA unter Zuhilfenahme des DNeasy Blood and Tissue Kits	58
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
3.1.4	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	60
3.1.5	Detektion mit dem QIAxcel® System	61
3.2	Chronischer Myokardinfarkt	62
3.3	Euthanasie und Gewebeentnahme	64
3.4	Gravimetrische Untersuchungen	65
3.5	Echokardiographische Untersuchungen.....	65
3.6	Histologie	66
3.6.1	Paraffinschnitte	66
3.6.2	Pikro-Siriusrot-Färbung	69
3.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	72

3.7	Proteinbiochemische Methoden	74
3.7.1	Herstellung der Gesamtproteinlysate	74
3.7.2	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay	74
3.7.3	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	74
3.7.4	Western Blot	76
3.7.5	Co-Immunpräzipitation	76
3.7.6	Strippen der Membran	77
3.8	Isolation adulter Kardiomyozyten	78
3.9	Intrazelluläre Calcium-Messungen	79
3.10	Intrazelluläre Natrium-Messungen.....	81
3.11	NADH/FAD-Messungen zur Ermittlung des mitochondrialen Redoxstatus	83
3.12	Statistische Auswertung	84
4.	Vorarbeiten	86
5.	Ergebnisse	87
5.1	WT und NKA- α 2 Tiere weisen vergleichbare Infarktgrößen auf.....	87
5.2	Überlebenszeitanalyse	88
5.3	Kardiales Remodeling nach MI.....	88
5.3.1	NKA- α 2 Tiere sind 3 Wochen post MI vor Funktionsverlust und Dilatation geschützt.....	88
5.3.2	NKA- α 2 Tiere sind auch nach 8 Wochen MI vor Funktionsverlust und Dilatation geschützt.....	90
5.3.3	NKA- α 2 Tiere zeigen nach 8 Wochen MI eine leicht verzögerte kardiale Hypertrophie und einer Lungenstauung.....	91
5.4	Ca ²⁺ - <i>Handling</i> und funktionale Veränderungen nach MI.....	93
5.4.1	Ein chronischer MI induziert eine Verringerung der Kontraktilität und des systolischen Ca ²⁺ -Spiegels in NKA- α 2 Kardiomyozyten	93
5.4.2	NKA- α 2 Kardiomyozyten sind nach achtwöchigem MI vor einer Ca ²⁺ -Desensibilisierung geschützt	94
5.4.3	MI-behandelte NKA- α 2 Kardiomyozyten zeichnen sich durch einen schnelleren Ca ²⁺ -Efflux und einen verringerten sarkoplasmatischen Ca ²⁺ -Gehalt aus.....	96

5.4.4	Reduktion der SERCA Aktivität in MI-behandelten WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten	98
5.5	β -adrenerges Signaling und die NKA- α 2	99
5.5.1	Auch nach chronischem MI bewirkt eine akute β -adrenerge Stimulation von NKA- α 2 Kardiomyozyten positiv inotrope Effekte	99
5.5.1	Die NKA- α 2 interagiert mit dem β 1-AR.....	106
5.5.2	Eine β -adrenerge Stimulation führt zu einer Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ in NKA- α 2, aber nicht in WT Tieren	107
5.5.3	Eine NKA- α 2 Überexpression fördert während einer β -adrenergen Stimulation die Kontraktilität bei gleichbleibendem Redox-Status.....	108
6.	Diskussion.....	112
6.1	Eine NKA- α 2 Überexpression schützt vor pathologischem Remodeling und funktionaler Beeinträchtigung nach MI.....	112
6.2	NKA- α 2 Überexpression moduliert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Spiegel und begünstigt hierdurch protektive Effekte	114
6.3	Eine NKA- α 2 Überexpression verhindert eine Desensitisierung β -adrenerger Sinalwege	125
7.	Möglicher Mechanismus der Kardioprotektiven Wirkung während eines chronischen Mi.....	131
8.	Ausblick.....	133
9.	Anlagen.....	136
10.	Literaturverzeichnis.....	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit des linksventrikulären enddiastolischen Volumens.....	10
Abbildung 2: β -adrenerge Signalkaskade.....	29
Abbildung 3: Digitalisglykoside.....	38
Abbildung 4: Wirkmechanismus der Digitalisglykoside.....	40
Abbildung 5: Detektion eines Agarosegels nach erfolgter Gelelektrophorese verschiedener Genotypisierungsproben.....	61
Abbildung 6: Klassifizierung der unterschiedlichen Bereiche im einem infarzierten murinen Herzgewebeschnitt.....	63
Abbildung 7: Darstellung des präparierten Herzens nach erfolgter Organentnahme....	64
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Gewebeeinbettung in Paraffin.....	68
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines infarzierten Herzgewebes, das mittels Pikro-Siriusrot (PSR)-Technik angefärbt wurde.....	71
Abbildung 10: Anregungsspektrum von Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2 AM) in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]$	79
Abbildung 11: Umsetzung von Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2 AM) zu Fura-2 durch unspezifische Esterasen innerhalb der Zelle.....	80
Abbildung 12 Umwandlung von Natrium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethylesters (SBFI AM) zu SBFI durch unspezifische Esterasen im Cytosol.....	81
Abbildung 13: Anregungsspektrum des ratiometrischen Farbstoffes Natrium binding benzofuran isophthalate acetoxymethylesters (SBFI AM) in Abhängigkeit der $[Na^+]$..	82
Abbildung 14: Die eingeschlossenen WT und NKA- α 2 Kohortenbesitzen vergleichbare Infarktgrößen.....	87
Abbildung 15: Überlebenszeitanalyse der beiden Kohorten nach einem chronischem MI.....	88
Abbildung 16: Echokardiographische Untersuchung nach drei Wochen chronischem MI.....	89
Abbildung 17: Echokardiographische Untersuchungen nach 8 Wochen MI.....	90
Abbildung 18: Gravimetrische Untersuchung der Herz- und Lungengewichte.....	92
Abbildung 19: Eine NKA- α 2 Überexpression begünstigt nach chronischer MI-Behandlung eine verringerte Kontraktilität sowie ein niedriges systolisches Ca^{2+} -Profil.....	94
Abbildung 20: MI-behandelte NKA- α 2 Kardiomyozyten sind vor einer Ca^{2+} -Desensibilisierung geschützt.....	95

Abbildung 21: Sarkoplasmatischer Ca ²⁺ -Gehalt und Ca ²⁺ -Efflux.....	97
Abbildung 22: Ein chronischer MI induziert eine Verringerung der SERCA Aktivität. ...	98
Abbildung 23: Sarkomerverkürzung vor und nach Isoprenalin (ISO) -Applikation.	100
Abbildung 24: Systolische und diastolische Ca ²⁺ -Spiegel vor und nach Isoprenalin (ISO)-Applikation.	103
Abbildung 25: Expressionsniveau des β ₁ - (β ₁ AR) bzw β ₂ -adrenergen Rezeptors (β ₂ AR) nach chronischem MI.	105
Abbildung 26: Die NKA-α ₂ interagiert mit dem β ₁ -adrenergen Rezeptor (β ₁ AR).....	106
Abbildung 27 [Na ⁺] _i in den Kardiomyozyten von WT und NKA-α ₂ Versuchstieren.	107
Abbildung 28: Redox-Status in WT und NKA-α ₂ Kardiomyozyten während unterschiedlicher Stimulationsbedingungen.....	108
Abbildung 29: Messung der Sarkomerverkürzung während unterschiedlicher Stimulationsbedingungen.	110
Abbildung 30 Arrhythmischer Index.....	111
Abbildung 31: Elektromechanische Kopplung.....	117
Abbildung 32: Möglicher Mechanismus über den die protektive Wirkung einer NKA-α ₂ Überexpression vermittelt wird.	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA). Die für die Einteilung verwendeten Kriterien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.	6
Tabelle 2: Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz entsprechend der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC). Die ESC unterteilt die chronische Herzinsuffizienz in eine Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF), mäßiggradig eingeschränkter (HFmrEF) und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Die für die Einteilung verwendeten Kriterien sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.	8
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien bzw. Reagenzien	43
Tabelle 4: Enzyme.....	46
Tabelle 5: Primärantikörper	46
Tabelle 6: Sekundärantikörper.....	47
Tabelle 7: Primer	47
Tabelle 8: Kits	51
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	51

Tabelle 10: Geräte.....	53
Tabelle 11: Operations- bzw. Präparierbesteck	56
Tabelle 12: Software	57
Tabelle 13: Pipettierschema für die Detektion mittels Agarosegelelektrophorese	59
Tabelle 14: Temperaturprotokoll für die Detektion mittels Agarosegelelektrophorese ..	59
Tabelle 15: Pipettierschema die Detektion mittels QIAxcel® System.....	60
Tabelle 16: Temperaturprotokoll für die Detektion mittels QIAxcel® System	60
Tabelle 17: Die für die Entwässerung im Entwässerungsautomaten verwendeten Lösungsmittel sowie die entsprechende Verweildauer des Gewebes.....	67
Tabelle 18: Absteigende Alkoholreihe	69
Tabelle 19: Aufsteigende Alkoholreihe	69
Tabelle 20. Absteigende Alkoholreihe	72
Tabelle 21: Färbung	72
Tabelle 22: Zusammensetzung des Sammelgels	75
Tabelle 23: Zusammensetzung von Trenngelen mit unterschiedlichem Acrylamid-Anteil	75

Formelverzeichnis

Formel 1: Rechnerische Bestimmung des prozentualen Anteils des infarzierten Endokards am Gesamtendokard.....	71
Formel 2: Rechnerische Ermittlung des prozentualen Anteils des infarzierten Epikards am Gesamtepikard.....	72
Formel 3: Bestimmung der durchschnittlichen prozentualen Infarktgröße durch Mittelwertbildung	72

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Ca ²⁺ -Konzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration
[K ⁺]	K ⁺ -Konzentration
[K ⁺] _i	intrazelluläre K ⁺ -Konzentration
[Na ⁺]	Na ⁺ -Konzentration
[Na ⁺] _i	intrazellulären Na ⁺ -Konzentration
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormons / Adiuretin / Vasopressin
ALD	Aldosteron
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	activation protein 1
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor 1
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
ATRAMI	Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction
BNP	brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide
BRS	Baroreflexsensitivität
cAMP	cyclisches AMP
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
EDD	Enddiastolischer Diameter
EF	Ejektionsfraktion
EtOH	Ethanol
FS	Fractional Shortening
F ₃₄₀ /F ₃₈₀	Ratio aus der Fluoreszenz bei 340 nm bzw. 380 nm
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Proteine	GTP bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels

HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HRV	Herzfrequenzvariabilität
I_{Ca}	Ca^{2+} -Einstrom
I_{Na}	Na^{+} -Einwärtstrom
I_{NCX}	NCX-spezifischer Strom
I_{pump}	NKA-spezifischer Strom
ISO	Isoprenalin
i.p.	intraperitoneal
LTCC	L-Typ Ca^{2+} -Kanal
LV EDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCU	mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter
MEF-2	myocytes enhancer factor 2
MHC	α -Myosin heavy chain
MI	Myokardinfarkt
NCX	Na^{+}/Ca^{2+} -Austauscher
NKA	Na^{+}/K^{+} -ATPase
NKA- α 1	NKA- α 1 Isoform
NKA- α 2	NKA- α 2 Isoform
NKA- α 3	NKA- α 3 Isoform
NKA- α 4	NKA- α 4 Isoform
NnT	Nicotinamid Nucleotid Transhydrogenase
NRC	neonatale Rattenkardiomyozyten
FAD	oxidierte Form des Flavin-Adenin-Dinucleotid
FADH ₂	reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinucleotid
NAD	oxidierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduzierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
NYHA	New York Heart Association
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLM	Phospholemman

PLM Ser63	Phospholemman Serin 63
PLM Ser68	Phospholemman Serin68
PLN	Phospholamban
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase
PSR	Pikro-Siriusrot
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor Typ 2
SDK	Serum-Digoxin-Konzentration
SDNN	Standardabweichung der NN-Intervalle
SERCA	sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SV	Schlagvolumen
TAC	Ligatur des Aortenbogens (engl.: transverse aortic constriction)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRPC	transient receptor potential canonical
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin
$\alpha 1^{+/-}$	Versuchstiere mit einer Reduktion der NKA- $\alpha 1$ Expression
$\alpha 1\text{AR}$	$\alpha 1$ -adrenerger Rezeptor
$\alpha 2^{+/-}$	Versuchstiere mit einer Reduktion der NKA- $\alpha 2$ Expression
$\beta 1\text{AR}$	$\beta 1$ -adrenerger Rezeptor
$\beta 2\text{AR}$	$\beta 2$ -adrenerger Rezeptor

Zusammenfassung

Die Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) ist maßgeblich an der Regulation der kardialen Na⁺-Homöostase beteiligt. Im Myokard werden hauptsächlich zwei Isoformen exprimiert: die α1 (NKA-α1) und die α2-Isoform (NKA-α2). Diese beiden Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Lokalisation als auch in ihrer zellulären Funktion. So ist die NKA-α1 recht homogen entlang des Sarkolemmes zu finden und ist verantwortlich für die Regulation der globalen intrazellulären Na⁺-Konzentration ([Na⁺]_i). Die NKA-α2 hingegen konzentriert sich hauptsächlich in den T-Tubuli und beeinflusst über Veränderung der lokalen [Na⁺]_i die Ca²⁺-Transienten und die Kontraktilität. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz wurde eine verminderte Expression und Aktivität der NKA beobachtet. Gleichzeitig werden Inhibitoren der NKA, sogenannte Digitalisglykoside, in fortgeschrittenen Herzinsuffizienz-Stadien eingesetzt. Die Studienlage über den Einsatz dieser Therapeutika ist recht uneinheitlich und reicht von einer verringerten Hospitalisierung bis hin zu einer erhöhten Mortalität.

Ziel dieser Arbeit war es die Folgen einer NKA-α2 Aktivierung während einer Herzinsuffizienz mit Hilfe eines murinen Überexpressionsmodells zu analysieren.

11-Wochen alte Mäuse mit einer kardialen NKA-α2 Überexpression (NKA-α2) und Wildtyp (WT) Versuchstiere wurden einem 8-wöchigen Myokardinfarkt (MI) unterzogen. NKA-α2 Versuchstiere waren vor einem pathologischem Remodeling und einer kardialen Dysfunktion geschützt. NKA-α2 Kardiomyozyten zeigten eine erhöhte Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) Aktivität, die zu niedrigeren diastolischen und systolischen Ca²⁺-Spiegeln führte und einer Ca²⁺-Desensibilisierung der Myofibrillen entgegenwirkte. WT Versuchstiere zeigten nach chronischem MI eine sarkoplasmatische Ca²⁺-Akkumulation, die in NKA-α2 Kardiomyozyten ausblieb. Gleichzeitig konnte in der NKA-α2 MI Kohorte im Vergleich zu den WT MI Versuchstieren eine erhöhte Expression von β1-adrenergen Rezeptoren (β1AR) beobachtet werden, die eine verbesserte Ansprechbarkeit gegenüber β-adrenergen Stimuli bewirkte. Zudem konnte in unbehandelten Versuchstieren eine Interaktion zwischen NKA-α2 und dem β1AR nachgewiesen werden, welche in der WT Kohorte größer ausfiel als in der NKA-α2 Versuchsgruppe. Gleichzeitig zeigten unbehandelte NKA-α2 Kardiomyozyten eine erhöhte Sensitivität gegenüber β-adrenerger Stimulation auf, welche nicht mit einer erhöhten Arrhythmie-Neigung oder vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einherging.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine NKA-α2 Überexpression vor pathologischem Remodeling und einer kardialen Funktionseinschränkung schützt, indem eine systolische, diastolische und sarkoplasmatische Ca²⁺-Akkumulation verhindert wird. Gleichzeitig wird die β1AR Expression stabilisiert, wodurch es zu einer verminderten neurohumoralen Aktivierung und einer Durchbrechung des Circulus vitiosus kommen könnte. Insgesamt scheint eine Aktivierung der NKA-α2 durchaus ein vielversprechendes Target in der Herzinsuffizienz Therapie darzustellen.

Abstract

The Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) is significantly involved in the regulation of the cardiac Na⁺ homeostasis. Two isoforms are mainly expressed in the myocardium: the α1- (NKA-α1) and the α2-isoform (NKA-α2). These two isoforms differ regarding their localization as well as their cellular function. The NKA-α1 is located along the sarcolemma and is responsible for the regulation of the global intracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_i). In contrast, the NKA-α2 is concentrated mostly in the t-tubules and influences the Ca²⁺ transients and contractility by changing the local [Na⁺]_i. During heart failure, a reduced activity and expression of the NKA has been observed. At the same time, inhibitors of the NKA, so-called digitalis glycosides, are used in the treatment of advanced stages of heart failure. The current evidence for the use of these substances remains still inconsistent ranging from decreased hospitalization to increased mortality.

The aim of this project was to analyze the consequences of an NKA-α2 activation during heart failure by using a murine overexpression system.

11-weeks old mice with a cardiac-specific overexpression of the NKA-α2 (NKA-α2) and wildtype (WT) animals were subjected to 8 weeks of myocardial infarction (MI). NKA-α2 mice were protected against pathological remodeling and functional impairment. NKA-α2 cardiomyocytes showed an increased Na⁺/Ca²⁺-exchanger (NCX) activity, which led to a reduction of the diastolic and systolic Ca²⁺ levels and prevented a Ca²⁺ desensitization of the myofilaments. WT animals showed a sarcoplasmic Ca²⁺ accumulation after MI, which did not occur in NKA-α2 cardiomyocytes. At the same time, NKA-α2 MI mice showed an increased expression of β1-adrenergic receptor (β1AR), which induced an improved response towards β-adrenergic stimuli. In addition, an interaction between the NKA-α2 and the β1AR was detected in untreated animals, which was tighter in the WT cohort than in the NKA-α2 group. Furthermore, untreated NKA-α2 cardiomyocytes showed an increased sensitivity towards β-adrenergic stimulation, which was not associated with a higher arrhythmic tendency or augmented generation of reactive oxygen species.

These results show that an NKA-α2 overexpression protects against pathological remodeling and cardiac dysfunction by preventing systolic, diastolic and sarcoplasmic Ca²⁺ accumulation. Concurrently, a β1AR downregulation is counteracted, probably inducing a reduced neurohormonal activation and an ending of the vicious circle. Altogether, it seems that an activation of the NKA-α2 might be a promising target in the therapy of heart failure.

1. EINLEITUNG

1.1 Prävalenz und Bedeutung der Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen den Großteil der Todesfälle in Deutschland¹, wobei allein 10,3 % auf eine Herzinsuffizienz zurückzuführen sind.² Weltweit leiden bereits ca. 26 Millionen Erwachsene an einer Herzschwäche.³ In Deutschland wird die Prävalenz dieser Erkrankung auf 3,96 % geschätzt. Die Inzidenz beträgt 655 Fälle je 100.000 Risikopatienten, sodass in Deutschland mit 524.000 Herzinsuffizienz Neudiagnosen pro Jahr zu rechnen ist.⁴ Die Herzinsuffizienz ist zudem ein Hauptgrund für einen Krankenhausaufenthalt der Betroffenen. 1 - 4 % aller Hospitalisierungen sind in den Industrieländern auf diese Diagnose zurückzuführen.³ 2006 verursachte die Herzschwäche erstmals mehr Krankenhausaufenthalte als jede andere Erkrankung in Deutschland (317.000).⁵ Dieser Trend setzt sich weiter fort. So war in Deutschland 2016 die Herzinsuffizienz mit 518 Fällen auf 100.000 Einwohnern die häufigste Einzeldiagnose bei stationären Krankenhauspatienten.⁶ Aufgrund der weitreichenden systemischen Schädigungen und der progressiv verlaufenden Einschränkungen haben Erkrankte eine geringe Überlebenswahrscheinlichkeit. Weltweit sterben 17-45% der hospitalisierten Patienten innerhalb eines Jahres. Der Großteil der Todesfälle ereignet sich hierbei innerhalb von 5 Jahren.³ Die engmaschige ärztliche Kontrolle, sowie die medikamentöse Therapie und die stationären Krankenhausaufenthalte sind mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. So wurden 2015 in Deutschland allein durch die Versorgung von Herzinsuffizienz-Patienten Krankheitskosten in Höhe von 5277 Millionen Euro verursacht.⁷ Demzufolge stellt die Herzinsuffizienz nicht nur ein gesundheitliches, sondern auch ein sozioökonomisches Problem dar. Des Weiteren nimmt die Inzidenz dieser Erkrankung mit steigendem Alter dramatisch zu.⁸ Durch die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung ist daher mit einer Verschärfung dieser Problematik zu rechnen. Aus diesen Gründen ist ein besseres Verständnis der pathologischen Prozesse unabdinglich, um neue Arzneistoff-Targets zu identifizieren und die Pharmakotherapie zu optimieren, sodass eine Verlängerung der Überlebenszeit oder zumindest eine Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden kann.

Bei einer Herzinsuffizienz kann das Herz den Körper nicht mehr mit ausreichend Blut und entsprechend Sauerstoff versorgen. Zu klassischen Symptomen zählen Atemnot, Leistungsminderung und Flüssigkeitsretention.⁶

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist sehr unterschiedlich. Hauptursachen sind hierbei die Koronare Herzkrankheit, Hypertonie, Herzklappenerkrankungen sowie Vorhofflimmern (5%).⁹ Rund 70 – 90 % der Herzinsuffizienzfälle in den westlichen Industrienationen sind

auf eine koronare Herzkrankheit, eine arterielle Hypertonie oder eine Kombination dieser beiden Erkrankungen zurückzuführen. In selteneren Fällen kann eine Herzinsuffizienz durch nicht-ischämische Kardiomyopathien, wie beispielsweise dilatative bzw. hypertrophe Kardiomyopathien, ausgelöst werden. Dilatative Kardiomyopathien können durch Infektionen oder auch durch bestimmte Substanzen wie Alkohol oder Zytostatika verursacht werden. Ebenso können Autoimmunerkrankungen und eine Schwangerschaft an der Pathogenese beteiligt sein. Hypertrophe Kardiomyopathien besitzen hingegen häufig einen genetischen Hintergrund. Bis heute existiert kein allgemeingültiges Modell zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Am Anfang dieser Erkrankung steht eine myokardiale Schädigung, die durch Druck- (z.B. Hypertonie) bzw. Volumenbelastung (z.B. Mitralklappeninsuffizienz) ausgelöst werden kann. Auch ein Gewebeverlust, wie er im Rahmen ischämischer Erkrankungen auftritt, kann der Ausgangspunkt einer Herzinsuffizienz sein. Ein typisches Beispiel hierfür ist der Myokardinfarkt, bei dem es durch einen Gefäßverschluss und der daraus resultierenden Minderversorgung zu einem Absterben von Herzgewebe kommt. Durch die myokardiale Schädigung, die im Rahmen verschiedener Erkrankungen ausgelöst wird, entsteht eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion.⁶ Die daraus resultierende verminderte Herzleistung aktiviert unterschiedliche Adaptionsmechanismen (s. 1.6) um eine ausreichende Durchblutung des Körpers sicherzustellen. Diese Adaptionsmechanismen können im Frühstadium die Pumpleistung noch ausreichend aufrechterhalten. In diesem Falle spricht man von einer kompensierten Herzinsuffizienz. Die Patienten sind in diesem Stadium weitestgehend beschwerdefrei. Eine chronische Aktivierung der Adaptionsmechanismen ist keinesfalls als unproblematisch zu erachten. Sie schädigen zunehmend irreversibel das Myokard und beeinträchtigen die kardiale Funktion. Es entsteht hierbei ein Circulus vitiosus aus verstärkt aktivierten Adaptionsmechanismen und zunehmenden Funktionseinbußen. Innerhalb dieses Prozesses kann eine kompensierte Herzinsuffizienz in eine dekomensierte übergehen. Die Patienten werden symptomatisch und ihr Zustand verschlechtert sich zunehmends. Es kommt zur Krankheitsprogression.¹⁰

1.2 Formen der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz kann unterschiedlich eingeteilt werden. Bei Berücksichtigung der Lokalisation des eingeschränkten Myokards kann in eine Linksherz-, Rechtsherz- oder globale Herzinsuffizienz unterteilt werden. Zudem ist eine Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz möglich. Bei einer akuten Herzinsuffizienz treten die Symptome nach einem akuten Ereignis auf, die chronische entwickelt sich hingegen über einen längeren Zeitraum.⁶ Eine akute Herzinsuffizienz wird meist durch einen Myokardinfarkt, seltener durch eine Myokarditis ausgelöst. Einer chronischen Herzinsuffizienz können eine koronare Herzerkrankung, eine arterielle Hypertonie aber auch nicht-ischämische Kardiomyopathien zugrunde liegen. Die akute Herzinsuffizienz wird weiterhin in eine neu auftretende akute Form (De-novo Herzinsuffizienz) und in die akut dekompensierte chronischen Herzinsuffizienz unterteilt.¹¹

Pathomechanistisch betrachtet kann des Weiteren zwischen einer systolischen und einer diastolischen Dysfunktion unterschieden werden, je nachdem in welcher Phase des Herzzyklus eine Beeinträchtigung auftritt. Eine systolische Dysfunktion ist durch eine verminderte Ejektionsfraktion (EF) gekennzeichnet. Diese bewirkt, dass eine verringerte Menge an Blut aus dem Herzen herausgepumpt wird, wodurch die enddiastolische Füllung und damit die Vorlast zunimmt. Diastolische Dysfunktionen hingegen zeichnen sich durch einen erhöhten Füllungswiderstand aus. Systolische Dysfunktionen können beispielsweise durch eine Koronare Herzerkrankung oder eine arterielle Hypertonie ausgelöst werden.¹² Im Rahmen einer diastolischen Dysfunktion können strukturelle Veränderungen den Widerstand gegenüber dem ventrikulären Einstrom erhöhen. Letzteres kann intramyokardial (z.B. Fibrose) oder extramyokardial (z.B. konstriktive Perikarditis) bedingt sein. Zudem kann auch eine gestörte kardiale Relaxation eine Erhöhung des Füllungswiderstands bewirken. Ein erhöhter Widerstand gegenüber dem ventrikulärem Einstrom und eine beeinträchtigte Relaxationsfähigkeit liegen beispielsweise bei einem post-infarzialem Remodeling mit Narbenbildung und hypertrophen Wachstum vor.¹³ Das postinfarziale Remodeling umfasst verschiedene Veränderungen des Herzgewebes, die bereits kurze Zeit nach einem Myokardinfarkt beginnen. Während der Heilungsphase kommt es zu einer Ausdünnung und Dilatation der infarzierten Herzwand, welche als Infarktexpansion bezeichnet wird. Dies bewirkt eine Vergrößerung des Ventrikels und tritt Stunden bis Tage nach einem Myokardinfarkt auf. Die späte Phase des post-infarzialen Remodelings umfasst eine Umstrukturierung des überlebenden Myokards, welche durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, eine interstitielle Fibrose sowie eine linksventrikuläre Dilatation gekennzeichnet ist. Diese Umstrukturierungsprozesse zeigen sich nach Wochen bis Monaten.¹⁴ Selbst nach einer erfolgreichen Angioplastie tritt das

Remodeling sowohl im infarzierten Bereich als auch in den angrenzenden Arealen auf. Dies bewirkt letztlich einen Verlust der Kontraktions- und Verkürzungsfähigkeit mit Auftreten von Asynchronitäten, sowie eine Hypokinesie, Akinesie und Dyskinesie im Infarktbereich. Im benachbarten Myokard kommt es zu einer anfänglichen Hyperkinesie, die von einer Hypokinesie abgelöst wird. Diese Veränderungen führen letztlich zu einer Verringerung der kardialen Funktion, des Herzzeitvolumens und des Blutdrucks sowie zu einer Erhöhung der ventrikulären Füllung. Die Dilatation, welche ebenfalls im Rahmen des post-infarzialen Remodelings auftritt, dient dazu trotz des sinkenden Anteils an überlebenden Myokard ein konstantes Schlagvolumen aufrechtzuerhalten. Ungeachtet dessen erhöht sie sowohl die systolische als auch die diastolische Wandspannung, wodurch eine weitere Dilatation begünstigt wird und ein Teufelskreis entsteht.¹⁵

Die Herzinsuffizienz kann nach den Kriterien der New York Heart Association (NYHA) und der Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) weiter unterteilt werden. Dies wird im Abschnitt 1.3 und 1.4 genauer erörtert.

1.3 Klassifikation der New York Heart Association

Eine Herzinsuffizienz-Erkrankung kann sich in unterschiedlichen Schweregraden manifestieren. Die Einteilung in unterschiedliche Stadien ermöglicht eine bedarfsgerechte Behandlung der Patienten und ist unabdinglich um den Schweregrad der Erkrankung abzuschätzen.

Eines der verwendeten Klassifizierungssysteme ist die Klassifikation der New York Heart Association (NYHA). Diese gliedert die Herzinsuffizienz in vier unterschiedliche Stadien: NYHA I, NYHA II, NYHA III und NYHA IV. Hierbei werden die Patienten in Abhängigkeit ihrer Leistungsfähigkeit untergliedert. Zur Klassifizierung werden die Symptome Atemnot, Erschöpfung, Herzrhythmusstörungen und Angina Pectoris herangezogen.⁶ Eine Angina pectoris zeichnet sich durch ein typisches Druckgefühl im Brustbereich aus, welches durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot entsteht.¹¹

Patienten im Stadium NYHA I sind asymptomatisch und weisen keine Einschränkungen auf. Eine alltägliche Belastungssituation löst keine unangemessene Erschöpfung, Herzrhythmusstörungen, Atemnot oder Angina pectoris aus. Patienten, die durch eine medikamentöse Therapie eingestellt sind und folglich keine Symptome aufweisen, werden ebenfalls dem NYHA I Stadium zugeordnet.⁶

Bei Patienten mit der Klassifikation NYHA II treten herzinsuffizienzspezifische Symptome erst durch eine stärkere körperliche Belastung auf, wie beispielsweise Treppensteigen. Es liegt lediglich eine leichte körperliche Einschränkung vor.⁶

In der Klasse NYHA III ist mit höhergradigen Beeinträchtigungen der Leistungsfähigkeit zu rechnen. Hier wird die Symptomatik bereits durch leichte körperliche Betätigung ausgelöst. Nur unter Ruhebedingungen treten Symptome wie Erschöpfung und Angina pectoris nicht auf.⁶

NYHA IV ist das gravierendste Stadium, in dem es zu schweren Einschränkungen für den Patienten kommt. Dieser wird bereits unter Ruhebedingungen symptomatisch und es kommt zur Bettlägerigkeit. Die Symptome treten bei allen körperlichen Tätigkeiten auf.⁶

Die unterschiedlichen Stadien mit den entsprechenden Symptomen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA). Die für die Einteilung verwendeten Kriterien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Stadium	Symptome
NYHA I (asymptomatisch)	Keine Einschränkungen im Alltag. Die Erkrankung löst keine herzinsuffizienztypischen Symptome aus, weder unter Ruhe- noch unter Belastungsbedingungen;
NYHA II (leicht)	Die Erkrankung löst erste leichte körperliche Einschränkungen aus. Unter Ruhebedingungen und leichter körperliche Anstrengung tritt keine Symptomatik auf. Erst eine stärkere Belastung löst Symptome wie Atemnot, Erschöpfung etc. aus.
NYHA III (mittelschwer)	Es erscheinen höhergradige Einschränkungen. Die Symptomatik kommt bereits bei leichter körperlicher Betätigung zum Vorschein. Keine Ruhesymptomatik.
NYHA IV (schwer)	In diesem Stadium erleidet der Patient hochgradige Einschränkungen. Bei allen körperlichen Betätigungen und unter Ruhebedingungen treten Symptome auf.

1.4 Klassifikation der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie

Die ESC untergliedert die chronische Herzinsuffizienz in drei verschiedene Subtypen: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF) und Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Die HFmrEF hat allerdings erst 2016 Eingang in die entsprechenden Leitlinien gefunden.¹⁶

Für die Einteilung werden Herzinsuffizienz-Symptome und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) herangezogen. Eine HFrEF liegt bei einer LVEF < 40 % vor. Zusätzlich müssen herzinsuffizienzspezifische Symptome beim Patienten vorliegen. Von HFmrEF spricht man, wenn die LVEF zwischen 40 und 49 % liegt. Eine HFpEF wird hingegen durch eine LVEF ≥ 50 % charakterisiert. Wie bei der HFrEF müssen sowohl bei der HFmrEF als auch bei der HFpEF Zeichen bzw. Symptome einer Herzinsuffizienz vorliegen. Die Diagnose einer HFmrEF und HFpEF erfordert zudem das zusätzliche Vorhandensein folgender Parameter: neben einer erhöhten Serumkonzentration der natriuretischen Peptide muss entweder eine relevante strukturelle Herzerkrankung vorliegen (linksventrikuläre Hypertrophie, Vergrößerung des linken Vorhofes) oder eine diastolische Dysfunktion. Zu beachten ist, dass die Anzeichen einer Herzinsuffizienz in frühen Stadien oder unter Diuretika-Therapie fehlen können. Ein Überblick über die Einteilung anhand der entsprechenden Parameter kann aus *Tabelle 2* entnommen werden.^{16,17} Die Beeinträchtigungen bei einer HFrEF bzw. HFpEF besitzen einen unterschiedlichen Ursprung. Eine HFrEF basiert auf einer reduzierten linksventrikulären Pumpleistung⁶ – also dementsprechend einer systolischen Herzinsuffizienz¹¹ - wohingegen bei der HFpEF die linksventrikuläre Funktion intakt ist. Allerdings liegt im letzteren Fall eine beeinträchtigte Füllung des Herzens vor.⁶ Demzufolge handelt es sich hierbei um eine diastolische Herzinsuffizienz.¹¹ Charakteristisch für eine HFrEF ist eine systolische und für die HFpEF eine diastolische Dysfunktion. Häufig kommt es hier allerdings zu Überschneidungen unterschiedlichen Ausmaßes.¹⁸ Bei einer HFmrEF ist höchstwahrscheinlich von einer milden systolischen Dysfunktion auszugehen mit einer zusätzlich beeinträchtigten diastolischen Komponente.^{17,18} Es ist allerdings nicht klar, ob eine HFmrEF lediglich ein Übergang zwischen HFrEF und HFpEF darstellt oder ob es sich hierbei um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt.¹⁸

Eine HFrEF entsteht auf der Grundlage einer myokardialen Schädigung, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt oder eine ausgeprägte koronare Herzkrankheit. Bei einer HFpEF ist die Pathophysiologie hingegen sehr heterogen und ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass hier chronische Komorbiditäten, wie z.B. Diabetes mellitus oder eine arterielle Hypertonie, eine wichtige Rolle spielen. Diese Erkrankungen fördern Prozesse, die mikrovaskuläre Störungen verursachen können,

wodurch myokardiale Schäden, z.B. Hypertrophie und Fibrose, begünstigt werden. Als Folge kommt es dann zu einer diastolischen, teilweise aber auch zu einer systolischen Dysfunktion.⁶

Tabelle 2: Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz entsprechend der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC). Die ESC unterteilt die chronische Herzinsuffizienz in eine Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF), mäßiggradig eingeschränkter (HFmrEF) und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Die für die Einteilung verwendeten Kriterien sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

	HFrEF	HFmrEF	HFpEF
1	Symptome* z.B. Atemnot, Flüssigkeitsretention, Erschöpfung	Symptome* z.B. Atemnot, Flüssigkeitsretention, Erschöpfung	Symptome* z.B. Atemnot, Flüssigkeitsretention, Erschöpfung
2	LVEF < 40%	LVEF 40 - 49%	LVEF ≥ 50 %
3	-	1) Erhöhung der Serumkonzentration natriuretischer Peptide 2) Mindestens ein weiteres der folgenden Kriterien: a. Relevante strukturelle Herzerkrankung (LVH und/oder LAE) b. Diastolische Dysfunktion	
* können in frühen Stadien oder unter Diuretika-Therapie fehlen LAE Vergrößerung des linken Vorhofs LVH: linksventrikuläre Hypertrophie			

1.5 Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Der Beginn einer chronischen Herzinsuffizienz wird grundsätzlich durch eine Schädigung des Myokards ausgelöst. Dies kann sich im Rahmen einer Druck- (z.B. arterielle Hypertonie) oder Volumenbelastung (z.B. Aortenklappeninsuffizienz) oder durch Gewebsnekrosen entwickeln. Hierbei werden eine Reihe von Kompensationsmechanismen angeregt, die zwar die Pumpleistung aufrechterhalten können, aber langfristig zu einer zunehmenden myokardialen Schädigung und einer damit einhergehenden Krankheitsprogression führen. Zu diesen daher maladaptiven Anpassungsmechanismen zählen die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die Sekretion des Antidiuretischen Hormons (ADH; auch Vasopressin / Adiuretin genannt), des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und des brain natriuretic peptide (BNP) sowie die Erhöhung des Sympathikustonus.¹¹ Auch der Frank-Starling-Mechanismus ist in frühen Herzinsuffizienz-Stadien am Kompensationsgeschehen beteiligt.¹⁹

In den folgenden Abschnitten wird auf die unterschiedlichen Adaptionsmechanismen, deren Pathomechanismus und Auswirkungen eingegangen.

1.6 Adaptionsmechanismen

1.6.1 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling Mechanismus beschreibt den Zusammenhang zwischen Ventrikelfüllung und Kontraktionskraft bzw. Schlagvolumen (SV).

Das SV ist in *Abbildung 1* als Funktion des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LV EDV), der Vorlast, dargestellt. Ein Anstieg des LV EDV führt im gesunden Herzen zu einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes, wodurch die Myofibrillen stärker gedehnt werden.¹⁹ Als Folge kommt es zu einer stärkeren Kontraktion der Herzmuskelfasern und damit zu einer erhöhten Auswurfleistung. Eine Erhöhung der Ventrikelfüllung und damit des SV wird beispielsweise durch einen erhöhten Venendruck bewirkt. Der zugrundeliegende physiologische Prozess wird als Frank-Starling Mechanismus bezeichnet¹¹

Der Frank-Starling Mechanismus besitzt Grenzen und das SV kann nicht beliebig durch eine erhöhte Ventrikelfüllung gesteigert werden. Ab einer gewissen Vorlast kommt es zum Abflachen der SV-LV EDV Kurve. Eine Steigerung des LV EDV bewirkt hier nur noch eine geringfügige Steigerung der Auswurfleistung (*Abbildung 1*).¹⁹ Dies ist darauf zurückzuführen, dass Sarkomere eine Länge besitzen, bei der die Kraftentwicklung am höchsten ausfällt. Diese Sarkomerlänge wird als optimale Länge bezeichnet und beträgt ca. 2,2 μm . Unter physiologischen Bedingungen können die Sarkomere nur bis zu dieser Länge gedehnt werden. Eine stärkere Dehnung führt entsprechend zu einer myokardialen Schädigung.²⁰

Die Grundlage des Frank-Starling-Mechanismus bildet u.a. eine dehnungsabhängige Sensitivierung der Herzmuskelfasern gegenüber Ca^{2+} . Eine Zunahme der Dehnung steigert die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates, d.h. dass bei gleicher Ca^{2+} -Konzentration [Ca^{2+}] eine stärkere Kontraktionskraft erzielt werden kann.²⁰

Die Aufgabe des Frank-Starling Mechanismus besteht darin kurzfristige Schwankungen des Blutvolumen auszugleichen und die Schlagvolumina des linken und rechten Herzens aufeinander abzustimmen.¹¹ Folglich ist er an der Anpassung des Herzens auf kurzfristige dynamische Änderung beteiligt.

Das SV kann ebenfalls durch Catecholamine (Adrenalin und Noradrenalin) erhöht werden, die z.B. unter Belastungssituationen freigesetzt werden. Diese bewirken einen Anstieg der Herzfrequenz und Kontraktilität sowie eine Vasokonstriktion peripherer Gefäße. Dieser Effekt ist in der *Abbildung 1* als „Inotropie“ dargestellt.¹⁹

Die SV-LV EDV Kurve eines insuffizienten Herzens verläuft unterhalb der eines Gesunden. Da das Herz nicht mehr in der Lage ist eine ausreichende Kontraktionskraft aufzubringen, verbleibt aufgrund des geringeren SV mehr Blut im Ventrikel, wodurch die Vorlast (LV EDV) ansteigt. Zu Beginn einer Herzinsuffizienz bewirkt dieser Anstieg des LV EDV (Vorlast), wie im gesunden Myokard, einen kompensatorischen Anstieg des SV. Allerdings fällt dieser Anstieg geringer aus als im gesunden Patienten. Die Auswurfleistung ist bei vergleichbarer Vorlast im insuffizienten Ventrikel reduziert. Bei Voranschreiten der Erkrankung führt eine Erhöhung des LV EDV nur noch zu einem geringen Anstieg des SV. Bei Erschöpfung des Kompensationsmechanismus und Dekompensation des Herzmuskels kann die Kurve abflachen und sogar eine Abwärtsverschiebung erfahren. Letzteres bedeutet, dass eine Erhöhung des LV EDV sogar eine Senkung der Auswurfleistung und eine Lungenstauung hervorrufen kann (Abbildung 1).¹⁹

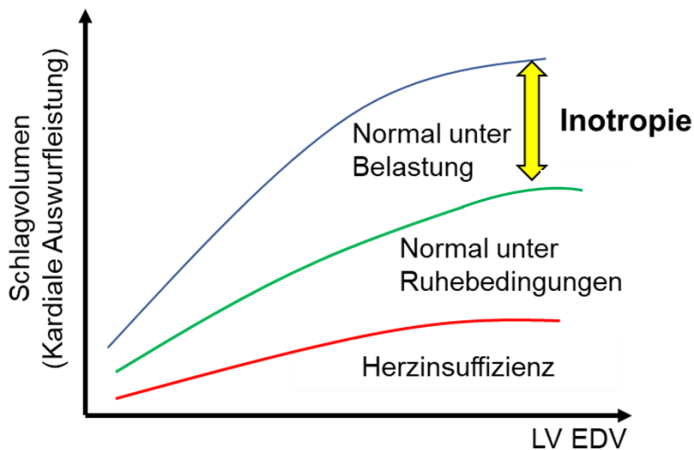


Abbildung 1: Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit des linksventrikulären enddiastolischen Volumens.

Das linksventrikulären enddiastolische Volumen (LV EDV) bestimmt über die Dehnung der Muskelfasern die kardiale Auswurfleistung des Herzens. Ein höheres LV EDV steigert über eine verstärkte Vordehnung der Myofibrillen das Schlagvolumen (SV) des Herzens. Dies wird als Frank-Starling Mechanismus bezeichnet. Ein insuffizientes Herz besitzt bei gleicher LV EDV eine geringere Auswurfleistung als ein gesundes Herz. Hierdurch verbleibt aufgrund einer unvollständigen Entleerung eine erhöhte Menge an Blut im Ventrikel. Dies führt durch eine Erhöhung der Vorlast (=LV EDV) zu einem kompensatorischen Anstieg des SV. Allerdings ist diese Kompensation durch den Frank-Starling Mechanismus begrenzt. In schweren Stadien der Herzinsuffizienz bewirkt eine Vorlasterhöhung nur noch einen geringen Anstieg des SV und kann sogar zu einer Verringerung des SV und einer Lungenstauung führen.

1.6.2 Neuroendokrine Aktivierung

1.6.2.1 Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)

Die verminderte Pumpleistung des Herzens, z.B. im Rahmen einer HFrEF, bewirkt eine Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens im arteriellen System sowie eine reduzierte Nierenperfusion. Dies führt letztlich zu einer chronischen Aktivierung des RAAS.¹¹ Ein Blutdruckabfall im Vas afferens der Glomeruli bewirkt dort die Freisetzung der Protease Renin aus den juxtaglomerulären Zellen. Dieses proteolytische Enzym spaltet aus dem Angiotensinogen, welches konstitutiv in der Leber synthetisiert wird, das Angiotensin I ab. Letzteres wird durch das Enzym Angiotensin-converting-Enzym zu Angiotensin II (AT II) umgewandelt.¹⁰ AT II zählt zu den stärksten blutdrucksteigernden Substanzen und entfaltet seine Wirkung an zwei verschiedenen Rezeptortypen, dem Angiotensin-II-Typ-1(AT₁)- und Angiotensin-II-Typ-2(AT₂)-Rezeptor.¹¹ Die bedeutsamsten Einflüsse von AT II auf das Herz-Kreislauf-System erfolgen durch den AT₁-Rezeptor.¹⁰ Durch dessen Stimulation kommt es zu einer Blutdrucksteigerung mittels Vasokonstriktion und Na⁺-Retention sowie zu einer Proliferation von Fibroblasten. Der AT₂-Rezeptor inhibiert hingegen die pathologische Vermehrung von glatten Gefäßmuskelzellen. Letztere sind an der Pathogenese von artherosklerotischen Veränderungen in den Gefäßen involviert.¹¹

Durch die Vasokonstriktion erhöht AT II die Nachlast des Herzens.¹¹ Des Weiteren aktiviert AT II präsynaptische AT₁-Rezeptoren, was zu einer vermehrten Freisetzung von Noradrenalin führt. Hierdurch wird der periphere Gefäßwiderstand noch zusätzlich erhöht. Ein weiterer Effekt des AT II beruht auf der Freisetzung von Aldosteron (ALD). Selbst wenn die AT II-Konzentration für eine Vasokonstriktion nicht ausreichend ist, genügt diese geringe Mengen bereits aus um die Bildung und Sekretion von ALD aus der Nebennierenrinde zu stimulieren. ALD erhöht sowohl die Na⁺-Rückresorption als auch die K⁺-Sekretion in der Niere. Dies wird durch eine gesteigerte Expression und einen vermehrten Einbau von luminalen Na⁺-Kanälen und einer vermehrten Synthese von basolateralen Na⁺/K⁺-ATPasen (NKA) erzielt.¹⁰ Neben einer Erhöhung der Na⁺-Resorption wird durch ALD auch vermehrt Wasser in der Niere resorbiert. Die ALD-abhängige Na⁺- und Wasserretention führt zu einer Erhöhung der Vorlast und fördert die Entstehung peripherer Ödeme. Bei Herzinsuffizienz-Patienten wird zudem durch eine verminderte Leberperfusion die hepatische ALD-Clearance verringert, was - neben der RAAS-Aktivierung - zu erhöhten Plasmakonzentrationen und einer länger anhaltenden Wirkung führt.¹¹ Demzufolge wird die Wirkung des ohnehin bereits chronisch aktivierten RAAS noch einmal zusätzlich potenziert.

AT II und ALD beeinflussen zudem noch kardiale Ionenkanäle. In isolierten ventrikulären Kaninchen-Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass AT II L-Typ Ca^{2+} Kanäle (LTCC) aktiviert und dies durch Applikation von Losartan, einem AT_1 -Antagonisten, inhibiert wird.²¹ ALD hingegen ist in der Lage, die Genexpression der NKA $\alpha 1$ -Isoform (NKA- $\alpha 1$) zu beeinflussen. In kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRC) erhöhte eine ALD-Behandlung die NKA- $\alpha 1$ mRNA Spiegel. Es handelte sich hierbei um einen direkten Effekt des ALD, die keine Synthese weiterer Protein-Intermediate erforderte. Gleichzeitig konnte ebenfalls eine transiente Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) in den NRC nach ALD Applikation gemessen werden. In kultivierten adulten Ratten-Kardiomyozyten führte eine ALD-Behandlung zu einer erhöhten Proteinexpression der NKA- α Isoformen und zu einem Anstieg in den NKA- $\alpha 1$ mRNA Spiegel. Es konnte allerdings keine Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ festgestellt werden.²² Die Effekte des ALD beschränken sich nicht nur auf die kardialen Na^+ -Spiegel. Es wurde ebenfalls eine Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) im Herzen beschrieben. Beispielsweise führte eine 24-stündige Behandlung ventrikulärer Kardiomyozyten aus adulten Ratten-Herzen mit ALD zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms (I_{Ca}). Dies konnte durch die zusätzliche Applikation des Mineralkortikoid-Rezeptor-Antagonisten Spironolacton verhindert werden, weswegen von einem Mineralkortikoid-Rezeptor-vermittelten Effekt ausgegangen wurde.²³ Darüber hinaus ist AT II in der Lage durch Stimulation des Hypophysenhinterlappen die Freisetzung von ADH zu induzieren, welches die Wasserretention und Vasokonstriktion noch zusätzlich fördert. Folglich wird hierdurch nicht nur eine weitere Vorlast- sondern auch eine Nachlasterrhöhung begünstigt. In gesunden Individuen wird ADH bei Vorliegen einer erhöhten Osmolalität des Blutplasmas sezerniert, was durch sogenannte Osmosensoren des Hypothalamus ermittelt wird.¹¹ Bei vielen Herzinsuffizienz-Patienten sind die ADH-Spiegel erhöht. Es liegt hier eine nicht-osmotisch bedingte ADH-Sekretion vor, die das Entstehen einer Hyponatriämie und eine gesteigerte Vasokonstriktion begünstigt.²⁴ Zusammenfassend stellt die RAAS-Aktivierung einen kritischen Punkt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz dar, da zahlreiche Organe und Strukturen unter der Kontrolle dieses Systems stehen. Dementsprechend wirkt sich ein hyperaktives RAAS auf Multiorganebene aus und potenziert ebenso die Effekte anderer Adaptionsmechanismen.

1.6.2.2 Aktivierung des Sympathikus

Änderungen des peripheren Blutvolumens werden durch Barorezeptoren, die sich in der Aorta und dem Karotissinus befinden, erkannt. Diese sind in der Lage zusammen mit den kardiopulmonalen Barorezeptoren inhibitorische Signale an das Zentrale Nervensystem zu senden und hierdurch die sympathische Aktivität zu drosseln.²⁴ Während einer Herzinsuffizienz erhöhen genau diese Barorezeptoren aufgrund des verminderten Blutvolumens die sympathische Aktivität, wodurch es zu einem Anstieg der Catecholaminspiegel im Blut kommt.¹¹ Die Noradrenalin-Spiegel können als Surrogatmarker für die sympathische Aktivität herangezogen werden. Eine Studie zeigte, dass die arteriellen Noradrenalin-Plasmakonzentration in Herzinsuffizienz-Patienten um 164 % erhöht war. Diese erhöhte Plasma-Konzentration war sowohl auf eine gesteigerte Noradrenalin-Freisetzung als auch eine verringerte Plasma-Clearance zurückzuführen.²⁵ Der erhöhte Sympathikustonus tritt bereits sehr früh im Verlauf des Krankheitsgeschehens auf und beeinflusst zahlreiche Organe und Strukturen wie beispielsweise die Niere oder das Gefäßsystem. Die erhöhte sympathische Aktivität wirkt vasokonstringierend auf das Vas afferens des Nephrons, wodurch die Durchblutung des juxtaglomerulären Apparates sinkt. Dies führt zu einer Freisetzung von Renin und einer Aktivierung des RAAS, wie sie bereits in 1.6.2.1 beschrieben wurde. Die Catecholamine aktivieren zudem β_1 -adrenerge Rezeptoren (β_1 AR) im juxtaglomerulären Apparat, was zusätzlich die Freisetzung von Renin fördert. Es kommt zudem zu einer Stimulation von α_1 -adrenergen Rezeptoren (α_1 AR) der Arterien, die eine Konstriktion der Gefäße auslösen und eine Nachlast-erhöhende Wirkung haben. Auch der Gefäßtonus der Venen wird durch die sympathische Aktivierung erhöht und bewirkt eine Steigerung der linksventrikulären Füllung, die sich in Form einer erhöhten Vorlast manifestiert. Diese hämodynamischen Veränderungen begünstigen erneut eine neurohumorale Aktivierung, ein pathologisches Remodeling sowie eine Verschlechterung der Herzfunktion.²⁴

Eine chronische β -adrenerge Aktivierung begünstigt morphologische Veränderungen des Herzens und kardiale Dysfunktionen. So führte eine dreimonatige Administration von Isoprenalin (ISO), einem unspezifischen β -adrenergen Agonisten, in Ratten zu einer kardialen Hypertrophie. Dabei stiegen das Herzgewicht und das linksventrikuläre Gewicht um ~ 30 % an. Im relativen Herzgewicht und relativen linksventrikulären Gewicht war ebenfalls ein Anstieg zu verzeichnen. Auch eine linksventrikuläre Dilatation der ISO-behandelten Kohorte konnte mittels echokardiographischer Untersuchung identifiziert werden. Die Effekte der chronischen β -adrenergen Stimulation beschränkten sich hierbei allerdings nicht nur auf morphologische Veränderungen. Es wurden ebenfalls funktionale Beeinträchtigungen des Herzens nachgewiesen. So reduzierte sich

das linksventrikuläre endokardiale Fractional Shortening. Auch ein Anstieg apoptotischer Kardiomyozyten konnte nach 5 Tagen ISO-Behandlung beobachtet werden.²⁶

β -adrenerge Rezeptoren sind bei chronischer oder wiederholter Stimulierung sogenannten Desensitisierungs- und Downregulationsprozessen unterworfen, welche zu einem fortschreitenden Verlust an inotroper und β -adrenerger Reserve im Herzen führen. Unter einer Downregulation versteht man eine selektive Reduktion der kardialen β 1AR, wohingegen eine Desensitisierung eine funktionale Entkopplung der β 1AR und β 2-adrenerge Rezeptoren (β 2AR) von den entsprechenden G-Proteinen darstellt.²⁷ Die Downregulation β 1AR ist eine klassische Maladaptation, die im Rahmen einer Herzinsuffizienz auftritt. In Experimenten konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Herzinsuffizienz das Verhältnis zwischen β 1AR und β 2AR im humanen Ventrikel dramatisch verändert. Im insuffizientem Ventrikel betrug das Verhältnis von β 1AR : β 2AR 60 : 38, wohingegen die Kontrollgruppe ein Verhältnis von 77:23 aufwies. Diese annähernde Verdopplung des β 2AR Anteils ist allerdings auf die Downregulation der β 1AR zurückzuführen und nicht etwa auf eine gesteigerte β 2AR Expression. Insuffiziente Ventrikel enthielten im Durchschnitt lediglich 38,1 % der β 1AR Konzentration von Nicht-insuffizienten. In Hinblick auf die Konzentration der β 2AR konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die geringere β 1AR Expression wirkte sich auf die Ansprechbarkeit gegenüber dem selektiven β 1AR-Agonisten Denopamin aus. In den insuffizienten Ventrikeln konnte Denopamin, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, kaum einen inotropen Effekt erzielen. Die Behandlung mit dem selektiven β 2AR-Agonisten Zinterol zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Kohorten.²⁸ Ebenso konnte eine signifikante Reduktion der β 1AR mRNA im Septum von Patientenbiopsien beobachtet werden, die mit der NYHA-Klassifikation und damit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz korrelierte. Die β 2AR mRNA Level blieben hingegen unverändert.²⁹ Auch im Tiermodell ließ sich diese Desensitisierung beobachten. Eine chronische Administration von ISO reduzierte die Kontraktionskraft nach Dobutamin- (β 1AR-Agonist) und Salbutamol- (β 2AR-Agonist) Applikation in Ratten.²⁶ Diese Ergebnisse zeigen, dass die im Rahmen einer Herzinsuffizienz entstehende Desensitisierung und Downregulation der β 1AR mit einer verringerten Ansprechbarkeit gegenüber β -adrenergen Stimuli einhergehen. Sie stellen somit einen kritischen Punkt in der Progression der Herzinsuffizienz dar und beeinflussen direkt die kardiale Funktion.

Mechanistisch betrachtet kann die Desensitisierung in eine homologe und heterologe Desensitisierung unterteilt werden, je nachdem welcher Effektor am Prozess beteiligt ist. β -adrenerge Rezeptoren zählen zu den sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die nach Bindung eines Agonisten G-Proteine für die weitere

Signaltransduktion verwenden. Die homologe Desensibilisierung erfolgt durch sogenannte GPCR Kinasen (GRK), welche die β -adrenergen Rezeptoren phosphorylieren. Nach der Phosphorylierung können β -Arrestine binden, die den Rezeptor vom G-Protein entkoppeln. Dies geschieht indem β -Arrestine durch sterische Hinderung die Bindung des G-Proteins am Rezeptor verhindern.²⁷ Die Bindung der β -Arrestine kann auch eine Internalisierung der Rezeptoren in Endosomen bewirken. Hier können die Rezeptoren anschließend dephosphoryliert und wieder in der Plasmamembran eingebaut werden, sodass eine weitere Stimulation noch möglich ist. Sie können jedoch auch abgebaut werden, wodurch die Rezeptordichte verringert wird. In diesem Fall spricht man von einer Downregulation.³⁰ Die homologe Desensibilisierung wird durch Agonisten-Bindung vermittelt und betrifft folglich nur Rezeptoren, die eine Aktivierung erfahren haben. Inaktive Rezeptoren bleiben hiervon unberührt. Bei der heterologen Desensibilisierung werden die β -adrenergen Rezeptoren durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Dies erfolgt unabhängig von einer Agonisten-Bindung und führt zu einer Entkopplung des Rezeptors. Demzufolge werden sowohl aktivierte als auch inaktive Rezeptoren desensibilisiert.²⁷ Diese Desensibilisierungsmechanismen können die β -adrenergen Rezeptoren sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Expression beeinflussen. Veränderungen der Rezeptorfunktion können binnen weniger Sekunden erfolgen. Dies geschieht hauptsächlich durch eine Entkopplung des G-Proteins. Die Rezeptorexpression wird hingegen durch chronische Agonisten-Stimulation beeinflusst und Änderungen erfolgen erst nach stundenlanger Rezeptor-Aktivierung. Es kommt hierbei zu einem Abbau des Rezeptors sowie zu einer verringerten Neusynthese aufgrund erniedrigter mRNA Spiegel.³¹

Der hohe Sympathikustonus verringert nicht nur die Leistungsfähigkeit des insuffizienten Herzens, sondern kann auch supraventrikuläre Tachykardien auslösen. Ventrikuläre Herzrhythmusstörungen sind eine häufige Todesursache von Patienten in einem fortgeschrittenem Herzinsuffizienzstadium.¹¹

Die β -adrenerge Hyperaktivität verändert demnach zahlreiche Parameter im Herzen von Herzinsuffizienz-Patienten und begünstigt Desensibilisierungs- und Remodeling-Prozesse, die zu einer kardialen Dysfunktion führen.

1.6.2.3 Ungleichgewicht zwischen sympathischer und parasympathischer Aktivität

Die Herzinsuffizienz beeinflusst nicht nur die Aktivität des sympathischen Nervensystems. Auch das parasympathische Nervensystem wird im Rahmen dieser Multisystemerkrankung zahlreichen Veränderungen unterworfen. Bereits im frühen Stadium einer linksventrikulären Dysfunktion kommt es zu einer Verringerung der parasympathischen Regulierung des Herzens. So konnte schon vier Tage nach Induktion einer linksventrikulären Dysfunktion in Hunden eine reduzierte Kontrolle der Herzfrequenz durch den Parasympathikus festgestellt werden. Darüber hinaus war die Herzfrequenz von Hunden mit bestehender Herzinsuffizienz kaum durch den Parasympathikus beeinflussbar.³² Eine weitere Forschergruppe konnte eine verringerte Dichte an muskarinergen Rezeptoren in insuffizienten linken Hundeventrikeln feststellen.³³ Muskarinrezeptoren können - wie Nikotinrezeptoren - durch Acetylcholin (ACh) stimuliert werden. Bei den nikotinischen Rezeptoren handelt es sich um ionotrope Rezeptoren, die muskarinischen Rezeptoren sind hingegen metabotrope Rezeptoren.³⁴ Die Baroreflexsensitivität (BRS) ist ein Maß für die Fähigkeit den vagalen Tonus nach plötzlichem Blutdruckanstieg zu steigern und die sympathische Aktivität zu hemmen. Die Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) kann für die Ermittlung der Herzfrequenzvariabilität (HRV) herangezogen werden.³⁵ Bei der SDNN wird die Dauer der Intervalle zwischen den Herzschlägen in ms ermittelt um daraus die entsprechende Standardabweichung zu berechnen. Als Ausgangspunkt dient ein normaler Sinusrhythmus, abnorme Herzschläge bleiben hierbei unberücksichtigt.³⁶ Die HRV-Analyse ermöglicht es die Funktion des autonomen Nervensystems einzuschätzen. Das hier zugrundeliegende Konzept beruht auf der Annahme, dass schnelle Fluktuationen auf Änderungen der sympathischen und parasympathischen Aktivität zurückzuführen sind. Niedrige HRV-Werte deuten auf einen dominierenden Sympathikustonus hin. Dies kann Folge einer erhöhten sympathischen Aktivität und/oder eines verringerten Vagustonus sein. Hohe HRV-Werte hingegen spiegeln eine erhöhte parasympathische Aktivität wieder. Die SDNN gibt Auskunft über die sympathische und parasympathische Modulation der Herzfrequenz.³⁷ Die multizentrische Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction (ATRAMI) Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen BRS, SDNN und Mortalität in Patienten nach MI. Eine niedrige BRS oder SDNN waren mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Lag eine kombinierte Verringerung beider Parameter vor, so erhöhte dies die Mortalität noch zusätzlich. Dies führte zur Annahme, dass sich eine Dysbalance des autonomen Nervensystems in Form einer verringerten parasympathischen und erhöhten sympathischen Aktivität negativ auf die Überlebenschancen nach myokardialer Schädigung auswirkt.³⁵ Folglich

stellt eine autonome Dysbalance ein Risikofaktor für eine erhöhte Sterblichkeit dar und kann im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen auftreten.

Neben den kardialen Effekten einer veränderten parasympathischen Aktivität konnten auch immunologische Zusammenhänge nachgewiesen werden. ACh inhibiert über den nikotinischen Rezeptor dosisabhängig die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF) in humanen Makrophagenkulturen.³⁸ Dies deutete bereits auf ein Zusammenspiel zwischen Immunsystem und cholinergem System hin. Schließlich wurde das Modell des cholinergen anti-inflammatorische Signalwegs postuliert. Dieses Modell besagt, dass eine Aktivierung vagaler Efferenzen mit anschließender Freisetzung von ACh in Organen wie beispielsweise Herz oder Leber die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (TNF, Interleukin-1, Interleukin 18) in Makrophagen inhibiert. Dies wird über den nikotinischen Rezeptor vermittelt. Die Bildung anti-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-10, bleibt hingegen durch ACh unbeeinflusst.³⁹ Der cholinerge anti-inflammatorische Signalweg setzt sich aus den vagalen Efferenzen, dem Neurotransmitter ACh und der $\alpha 7$ -Untereinheit des nikotinischen Rezeptors zusammen.⁴⁰ Die Beziehung zwischen Immunsystem und Parasympathikus ist allerdings nicht einseitig. So interagieren das Immunsystem und das parasympathische System und beeinflussen sich wechselseitig über den sogenannten inflammatorischen Reflex. Geschädigtes Gewebe oder Pathogene aktivieren die Zellen des angeborene Immunsystems. Diese Immunzellen sezernieren Zytokine und führen hierdurch zu einer Aktivierung sensorischer Nervenfasern des Nervus Vagus. Die daraus resultierende erhöhte Aktivität efferenter vagaler Nervenfasern bewirkt durch Stimulation des nikotinischen Rezeptors an Makrophagen und des cholinergen anti-inflammatorischen Pathways eine verringerte Sekretion von Zytokinen wie TNF oder Interleukin-1. Ebenso kann diese erhöhte Vagusaktivität die Sekretion des Adrenocortikotropen Hormons bewirken, welches wiederum zu einer Glucocorticoid-Freisetzung und einer Aktivierung des humoralen anti-inflammatorischen Systems führt. Die Schädigung kann über den verursachten Schmerz und Stress auch den Sympathikus aktivieren. Noradrenalin und Adrenalin sind ebenfalls in der Lage die Aktivierung von Makrophagen zu inhibieren, sodass die Bildung von TNF und weiteren Zytokinen ausbleibt. Das Zusammenspiel zwischen Sympathikus und Parasympathikus in Hinblick auf die Immunreaktion ergibt einen Synergismus, der zu einer verstärkten Herabsetzung der Immunantwort führt.³⁹ Somit kann eine vagale Hypoaktivität wie sie im Rahmen einer Herzinsuffizienz auftritt wahrscheinlich auch die Immunmodulation durch den inflammatorischen Reflex beeinflussen. Ebenso könnte sich eine geringe vagale Aktivität auch in einem verringerten anti-inflammatorischen Synergismus zwischen Sympathikus und Parasympathikus manifestieren. Weitere Untersuchungen

sind allerdings erforderlich, um die genauen Auswirkungen dieser Dysbalancen, vor allem im Kontext einer Herzinsuffizienz, aufzuklären.

1.6.3 Sekretion natriuretischer Peptide

Die verstärkte Dehnung des Herzens führt zu einer Freisetzung der natriuretischen Peptide ANP und BNP aus Kardiomyozyten.¹¹ Verantwortlich für diesen Prozess ist ein Anstieg des arteriellen Drucks. Durch die Sekretion der natriuretischen Peptide soll hierbei die RAAS-vermittelte Zunahme des Blutvolumens begrenzt werden.²⁰

Dies geschieht durch die natriuretischen und vasodilatatorischen Effekte von ANP und BNP, die als Gegenspieler des RAAS und Sympathikus fungieren.¹¹ Bei Progression der Herzinsuffizienz entsteht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen natriuretischem System und RAAS bzw. Sympathikus. Je weiter die Krankheit fortschreitet desto größer wird dieses Ungleichgewicht und letztlich setzen sich die pathologischen Effekte der RAAS-Aktivierung und Sympathikushyperaktivität gegenüber den protektiven Effekten der natriuretischen Peptide durch.¹¹

BNP-Plasmaspiegel und Schwere der Herzinsuffizienz korrelieren miteinander. Je ausgeprägter die Herzinsuffizienz desto stärker ist die BNP-Erhöhung. Die Bestimmung von BNP und NT-proBNP (inaktives Spaltprodukt, das bei der Bildung von BNP aus proBNP entsteht) kann daher für die Diagnose einer Herzinsuffizienz herangezogen werden (s. auch 1.4).¹¹

1.6.4 Kardiales Remodeling

Als kardiales Remodeling werden eine Reihe struktureller Umbauprozesse im Herzen bezeichnet, die beispielsweise im Rahmen einer Herzinsuffizienz auftreten können. Diese strukturellen Veränderungen bestehen aus kardialer Fibrose und Hypertrophie und werden durch die neurohumorale Aktivierung vermittelt. Im folgenden Abschnitt werden die Auswirkungen des Remodeling sowie dessen Pathomechanismus genauer erörtert.

Unter Hypertrophie versteht man die Vergrößerung des Herzens und der enthaltenen Kardiomyozyten als Reaktion auf eine erhöhte kardiale Arbeitsbelastung bzw. Schädigung. Diese Faktoren bewirken eine stärkere Wandspannung im Ventrikel und Septum, welche durch eine hypertrophe Reaktion herabgesetzt werden kann.⁴¹ Zudem bewirkt eine Hypertrophie zu Beginn noch eine Kontraktilitätserhöhung des Myokards. Hierbei ist zu beachten, dass eine Hypertrophie keinesfalls eine rein maladaptive Anpassung des Herzens darstellt. So gibt es sowohl eine physiologische als auch eine pathologische Hypertrophie. Bei der physiologischen Hypertrophie kommt es zu einem

leichten Anstieg (10 - 20%) der Herzmasse. Auf zellulärer Ebene findet sowohl eine Vergrößerung der Kardiomyozyten in ihrer Länge als auch in ihrer Breite statt. Charakteristisch für eine physiologische Hypertrophie sind die fehlenden negativen Effekte auf die Herzfunktion. So bleibt die Kontraktilität erhalten oder kann sich sogar erhöhen. Es findet hier keine Fibrosierung und Apoptose statt. Die physiologische Hypertrophie ist vollständig reversibel⁴² und kann sich beispielsweise während einer Schwangerschaft oder im Rahmen des körperlichen Trainings entwickeln.⁴¹ So zeigten beispielsweise Sportler in einer Metaanalyse eine höhere linksventrikuläre Masse als die Kontrollgruppe.⁴³ In Rahmen einer pathologischen Hypertrophie kann eine interstitielle und perivaskuläre Fibrose und erhöhte Mengen an Kollagen Typ I vorgefunden werden. Ebenso ist sie mit einer vermehrten Kardiomyozyten-Apoptose assoziiert.⁴² Sie tritt beispielsweise bei einer Hypertonie, myokardialen Schädigung oder im Rahmen einer exzessiven neurohumoralen Aktivierung, z.B. bei einer Herzinsuffizienz, auf.⁴⁴ In diesem Kontext stellt die Hypertrophie einen Mechanismus dar, um die zusätzliche Arbeitsleistung zu kompensieren. Während dieser Phase kommt es zu keiner Beeinträchtigung der kardialen Funktion. Dieser Zustand wird auch als kompensierte Hypertrophie bezeichnet. Bleiben die Belastungsfaktoren bestehen können eine ventrikuläre Dilatation und kardiale Dysfunktion auftreten. In diesem Fall kann die kompensierte Hypertrophie sogar in eine Herzinsuffizienz übergehen.⁴⁵

Morphologisch betrachtet kann zwischen einer konzentrischen und exzentrischen Hypertrophie unterschieden werden. Für eine konzentrische Hypertrophie ist ein Dickenwachstum der Kardiomyozyten charakteristisch. Die Sarkomere in den Kardiomyozyten vermehren sich hierbei parallel zueinander. Bei einer exzentrischen Hypertrophie findet hingegen hauptsächlich ein Längenwachstum der Kardiomyozyten statt. Die zusätzlichen Sarkomere sind hier in Reihe geschaltet. Eine Volumenbelastung induziert eine exzentrische Hypertrophie mit einer Vergrößerung des ventrikulären Innenradius, wohingegen eine Druckbelastung die Entstehung einer konzentrischen Hypertrophie auslöst.⁴¹ Beide Hypertrophie-Arten treten sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Kontext auf. Die konzentrische und exzentrische Hypertrophie ist damit nicht als Reaktion auf eine rein pathologische Anpassung zu verstehen. So kann eine pathologische exzentrische Hypertrophie im Rahmen eines Myokardinfarktes oder einer dilatativen Kardiomyopathie entstehen. Eine arterielle Hypertonie oder ein Herzklappenfehler sind beispielsweise an der Entstehung einer pathologischen konzentrischen Hypertrophie beteiligt. Eine nicht-pathologische konzentrische Hypertrophie kann wiederum durch bestimmte sportliche Tätigkeiten begünstigt werden.⁴⁴

Nach einem Myokardinfarkt tritt eine Hypertrophie im Rahmen des späten Remodelings auf. Generell kann das Remodeling in eine frühe (innerhalb 72 Stunden) und späte Phase (nach 72 Stunden) unterteilt werden. Während des frühen Remodelings erfolgt eine Ausbreitung des Infarktareals. Charakteristisch für das späte Remodeling ist, neben einer Dilatation und Verformung des Ventrikels, auch eine hypertrophe Veränderung. Zu Beginn einer Myokardinfarkt-induzierten Hypertrophie steht eine Hypotonie, die zu einer Aktivierung des RAAS sowie zu einer vermehrten Produktion und Freisetzung von Catecholaminen führt. Ebenso werden vermehrt natriuretische Peptide freigesetzt. Serin Proteasen aktivieren darüber hinaus das lokale RAAS im nicht-infarzierten Gewebe, wodurch es zu einer Hochregulation der Angiotensinogen Genexpression und erhöhten Aktivität des lokalen ACE kommt. Dies fördert die Bildung von lokalem AT II, welches wiederum die Entstehung einer Hypertrophie im gesunden Gewebe begünstigt. Darüber hinaus sezernieren Kardiomyozyten nach mechanischer Dehnung, wie sie im Rahmen einer erhöhten Wandspannung auftritt, AT II. Diese Faktoren führen letztlich zu einer hypertrophen Reaktion der Kardiomyozyten.⁴⁶

Im pathologischen Geschehen ist der auslösende Stimulus entscheidend dafür, welche Hypertrophie-Form induziert wird. *Toischer et al.* zeigten in Experimenten, dass eine Nachlasterhöhung bzw. Druckbelastung mittels Ligatur des Aortenbogens (TAC; *transverse aortic constriction*) eine konzentrische Hypertrophie und eine Erhöhung der Vorlast bzw. eine Volumenbelastung eine exzentrische Hypertrophie auslöst. Ein Anstieg der Vorlast wurde hier durch Bildung eines Shunts zwischen Aorta und *Vena cava inferior* induziert.⁴⁷ Ebenso konnten sie im Tiermodell nachweisen, dass die exzentrische Hypertrophie, im Gegensatz zur konzentrischen Hypertrophie, keine Fibrose und Entzündung entwickelte. Auch zeigte die Gruppe mit chronischem aortocavalem Shunt eine geringere Apoptose von Kardiomyozyten als die TAC-Kohorte. Zudem war die konzentrische Hypertrophie mit einer höheren Mortalität und einer stärkeren linksventrikulären Dysfunktion assoziiert.⁴⁷

Sowohl die konzentrische als auch die exzentrische Hypertrophie können zu einer Herzinsuffizienz mit entsprechender Dilatation und kardialer Dysfunktion voranschreiten. Im Gegensatz hierzu kann sich aus einer physiologischen Hypertrophie keine Herzinsuffizienz entwickeln.⁴¹

Neben den funktionalen Aspekten beeinflusst die Herzmuskelhypertrophie auch den Stoffwechsel des Herzens. So kommt es zu metabolischen Veränderungen im hypertrophen Herzen. Das gesunde Herz deckt 60 - 90 % seines Energiebedarfs über Fettsäuren, die restlichen 10 - 40 % durch Laktat und Glucose. Im hypertrophen Herz kommt es zu einer Verringerung der Fettsäureoxidation hin zu einem vermehrten Glucosemetabolismus. Dies wird als Substrat Switch bezeichnet. Der verdickte

Herzmuskel erhöht die Diffusionsstrecke für Substrate und O₂, besitzt aber gleichzeitig einen erhöhten Bedarf an Adenosintriphosphat (ATP). Da die ATP-Gewinnung mittels Glucose weniger O₂ benötigt als die mittels Fettsäuren, wird der Substrat Switch im hypertrophen Herzen begünstigt.⁴⁵

Insgesamt stellt die Hypertrophie eine Anpassung des Herzens auf eine stärkere Arbeitsbelastung dar. Ein hypertrophes Wachstum kann die Kontraktilität steigern, die Wandspannung senken und den Mehrbedarf an Substraten decken. Die Hypertrophie kann je nach Auslöser physiologisch oder pathologisch sein. Eine pathologische Hypertrophie resultiert in einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion und ist häufig mit einem erhöhten Sterberisiko und einer vermehrten Apoptose von Kardiomyozyten assoziiert. Sie tritt im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise einer arteriellen Hypertonie oder nach myokardialer Schädigung auf. Charakteristisch für eine physiologische Hypertrophie sind die fehlenden negativen Auswirkungen auf die Herzfunktion.

Neben der Hypertrophie ist die myokardiale Fibrose eine weitere Komponente des Remodelings im insuffizienten Herz. Bei einer Fibrose akkumulieren hohe Mengen an Bindegewebe (z.B. Kollagen Typ I und III) im myokardialen Interstitium.⁴⁸ Das Herz besteht nicht ausschließlich aus Kardiomyozyten. So machen diese lediglich 30 % der Zellen aus, wie adulte Mausventrikel gezeigt haben. Neben den Kardiomyozyten kommen noch Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen (z.B. Makrophagen) und Perizyten vor. Die Fibroblasten befinden sich dabei zwischen den Herzmuskelfasern und sind im ganzen Herzen verteilt. Sie erhalten die Homöostase der extrazellulären Matrix aufrecht, wodurch die strukturelle Integrität des Herzens bewahrt werden kann. Die extrazelluläre Matrix dient zudem als Gerüst für Kardiomyozyten. Eine myokardiale Schädigung induziert eine Vermehrung der Fibroblasten. Letztere spielen eine wichtige Rolle im Hinblick auf postinfarzielle Wundheilungs- und Remodeling-Prozesse. So besteht während der Heilungsphase nach einem MI die Mehrheit der Zellen im infarzierten Bereich aus Fibroblasten.⁴⁹

Eine Fibrose kann im Rahmen einer Gewebsregeneration im Herzen entstehen. Die abgestorbenen Kardiomyozyten werden hier durch eine Fibrosierung ersetzt und es entstehen dabei Mikronarben. Diese Fibrose-Form wird als Replacement Fibrose bezeichnet. Bei der reaktiven Fibrose sammelt sich hingegen Bindegewebe im perivaskulären Bereich rund um die Koronararterien an. Ebenso kommt es zu fibrotischen Veränderungen des Perimysiums und Endomysiums. Die eigentlich dünne Bindegewebsschicht, die Muskelfaserbündel und Kardiomyozyten umgibt, verdickt. Eine reaktive Fibrose kann durch zahlreiche Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. eine Druckbelastung oder Ischämie. Hier findet kein Zelltod der Kardiomyozyten statt. Noch

unklar ist, ob es sich tatsächlich um zwei separate Manifestationsformen handelt, da beide Fibrose-Arten in den meisten Patienten gleichzeitig vorliegen.⁴⁸ Auch bei einem Myokardinfarkt treten beide Fibroseformen auf. Im Wundareal proliferieren zunächst Fibroblasten und differenzieren zu Myofibroblasten. Letztere sezernieren hohe Mengen an extrazellulärer Matrix, sodass eine Narbe entsteht und man von Replacement Fibrose spricht. Die Narbenbildung nach einem MI ist dabei als eine kritische Phase im Heilungsprozess zu erachten. Eine beeinträchtigte oder unorganisierte Kollagen-Matrix führt bei Volumenbelastungen zu einer geringeren Widerstandsfähigkeit der Infarkt Narbe gegenüber Dehnung. Darüber hinaus wird ein Anstieg der Wandpannung, eine Verdünnung des Infarktes und eine Kammerdilatation begünstigt. Die reaktive Fibrose findet im nicht-infarzierten Gewebe statt und erhöht die Steifigkeit des Herzens. Letzteres führt zu einer gestörten Relaxation des Herzens sowie einer progressiven diastolischen Dysfunktion und Herzinsuffizienz. Zudem fördert die reaktive Fibrose die Entstehung von Arrhythmien. Auch die perivaskuläre Fibrose hat negative Auswirkungen auf das Herzgewebe. So bewirkt sie eine geringere Verfügbarkeit von O₂ in den Kardiomyozyten, eine Reduktion der Koronarreserve und eine Verschlimmerung der kardialen Ischämie.¹⁴ Die Folgen der Fibrose beschränken sich jedoch nicht allein die kardiale Funktion. Sowohl das Infarktgewebe als auch die interstitielle Fibrose beeinflussen die elektrische Leitfähigkeit des Herzens, wodurch die Entstehung von Arrhythmien gefördert wird. Darüber hinaus stellt die Infarkt Narbe ein elektrisch isoliertes nicht-erregbares Areal dar, welches den Ausgangspunkt für Reentry Arrhythmien bildet. Letztere können wiederum zu anhaltenden ventrikulären Tachykardien führen.⁴⁹ Bei einem Reentry, auch als kreisende Erregung bezeichnet, liegt eine Störung der Reizweiterleitung im Herzen vor. Diese führt zu einer verzögerten Erregung nachgeschalteter Herzmuskelfasern. Wenn diese Verzögerung lange genug andauert, können Areale erneut erregt werden, bei der die initiale Depolarisation bereits abgeschlossen und eine erneute Erregbarkeit wiederhergestellt ist. Dies kann geschehen, wenn die Bereiche eine unterschiedliche Reizweiterleitungsgeschwindigkeit oder Refraktärität besitzen.⁵⁰ Eine reaktive Fibrose ist ebenfalls in der Lage Reentry Arrhythmien zu begünstigen, da Kollagen-Fasern keine Leitfähigkeit besitzen. Dies geschieht indem eine fokal ektopische Aktivität induziert oder die Reizweiterleitung verlangsamt bzw. blockiert wird.⁴⁹

Die negativen Auswirkungen einer Fibrose wurden bereits in der Literatur beschrieben. Beispielsweise zeigten *Schelbert et al.* eine Korrelation zwischen Fibrose, Mortalität und Hospitalisierung. Eine Fibrose erhöhte das Sterberisiko sowie die Wahrscheinlichkeit einer Herzinsuffizienz-bedingten Hospitalisierung. Auch bei zusätzlicher

Mitberücksichtigung der EF, korrelierte der Fibrosegrad mit dem Eintreten eines negativen Outcomes. Dies traf sowohl für eine EF < 45 % als auch EF ≥ 45 % zu.⁵¹

Am Anfang einer Fibrose steht eine myokardiale Schädigung. Diese kann auf kardiovaskuläre Erkrankungen oder auf systemische Faktoren zurückzuführen sein, die im Rahmen anderer Krankheiten, wie z.B. einem Diabetes mellitus, freigesetzt werden. Das Absterben von Kardiomyozyten, sowie mechanische, ischämische oder metabolische Schädigungen durch beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder RAAS führen zu einer direkten Aktivierung der Fibroblasten. Letztere können auch durch profibrotische Faktoren aktiviert werden, die durch Kardiomyozyten, Endothelzellen und Immunzellen im Rahmen myokardialer Schädigungen freigesetzt werden. Dies hat zur Folge, dass die Fibroblasten proliferieren und sich zu Myofibroblasten differenzieren. Myofibroblasten sezernieren schließlich Pro-Kollagen Typ I und III sowie Moleküle, die für die Regulierung des Auf- und Abbaus (Turnover) von extrazellulärem Kollagen Typ I und III erforderlich sind.⁴⁸ Kollagen ist die Hauptkomponente der interstitiellen Matrix. Im kardialen Interstitium kommt Kollagen Typ I am häufigsten vor. Letzteres bildet dicke Fasern im Epimysium und Perimysium. Kollagen Typ III formt hingegen ein feines Faser-Netzwerk, welches hauptsächlich im Endomysium vorkommt.⁵² Die Myofibroblasten setzen auch autokrine und parakrine Faktoren frei, die den eigenen Metabolismus der Myofibroblasten stimulieren und die Fibrogenese aufrechterhalten.⁴⁸

Neben der reinen Akkumulation von Kollagen kann es im Rahmen einer Fibrose auch zu einer Quervernetzung von Kollagenfibrillen kommen. Die Quervernetzung wird durch das Enzym Lysyloxidase vermittelt, welches die Kollagenfibrillen kovalent miteinander verknüpft. Die Kollagenfibrillen weisen hierdurch eine Verdickung und erhöhte Steifigkeit auf. Eine verstärkte Quervernetzung ist mit pathologischen Veränderungen assoziiert. Beispielsweise wiesen Patienten mit einer Hypertonie-induzierten Herzinsuffizienz eine erhöhte Menge an quervernetztem Kollagen auf. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Quervernetzung und Hospitalisierung festgestellt werden. So erhöhte das vermehrte Auftreten von quervernetztem Kollagen die Herzinsuffizienz-assoziierte Hospitalisierung. Das kardiovaskulär-assoziierte Mortalitätsrisiko wurde allerdings nicht erhöht.⁵³ Auch in Hunden, die einer chronischen Volumenbelastung unterzogen wurden, konnte eine erhöhte Menge an quervernetztem Kollagen nachgewiesen werden. Letzteres ging mit einer Erhöhung der enddiastolischen Steifheit und des enddiastolischen Druckes einher.⁵⁴

Eine kardiale Fibrose hat zahlreiche negative Auswirkungen auf die Herzfunktion. So begünstigt eine interstitielle Fibrose die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion.⁴⁸

Letzteres ist auf die vermehrte Kollagenakkumulation zurückzuführen, welche zu einem steiferen Herzen führt und hierdurch die enddiastolische Füllung beeinträchtigt.⁵⁵

Die negativen Effekte beschränken sich allerdings nicht nur auf die Diastole. Ebenso kann die Kraftübertragung der Kardiomyozyten und die Kontraktilität beeinträchtigt werden, sodass eine systolische Dysfunktion entsteht. Fibrose ist auch an dem Entstehen von atrialen und ventrikulären Arrhythmien mittels Reentry Mechanismus beteiligt.⁴⁸ Des Weiteren sind Myofibroblasten in der Lage, die elektrische Aktivität von Kardiomyozyten zu modulieren. Dies kann über eine direkte physische Interaktion oder über die Sekretion parakriner Faktoren geschehen. Dies trägt ebenfalls zu der ventrikulären Arrhythmogenität fibrotischer Veränderungen bei. Ebenso wie die Hypertrophie wirkt sich die Fibrose negativ auf die Sauerstoffversorgung des Herzens aus. Die Fibrose vergrößert ebenfalls die Diffusionsstrecke des O₂, sodass auch hier der O₂-Bedarf der Kardiomyozyten schlechter gedeckt wird.⁴⁸

Fibrotische Veränderungen des Herzens führen somit zu einer Beeinträchtigung sowohl der diastolischen als auch der systolischen Funktion. Die Fibrose begünstigt zudem arrhythmogene Prozesse im Herzen und ist mit einem negativen klinischen Outcome assoziiert. Nicht nur die Menge an Kollagen, sondern auch die Art hat einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Herzens. So beeinträchtigt quervernetztes Kollagen die systolische und diastolische Funktion und begünstigt Herzinsuffizienz-assoziierte Hospitalisierungen.

1.7 Aufbau und Funktion des Herzens

Der Herzmuskel zählt zur quergestreiften Muskulatur. Diese besteht aus zahlreichen Faserbündeln, die sich wiederum aus verschiedenen Muskelfasern zusammensetzen. Eine Muskelfaser enthält eine hohe Menge an Myofibrillen, die in Sarkomere untergliedert werden. Eine Muskelkontraktion wird durch Verkürzung der Sarkomere erreicht, die vorwiegend aus den Proteinen Aktin und Myosin bestehen. Diese werden auch als Myofilamente bezeichnet.⁵⁶

Die Herzmuskulatur kann in Arbeitsmuskulatur und Muskulatur des Erregungsbildungs- und -leitungssystems untergliedert werden. Kardiomyozyten der Arbeitsmuskulatur besitzen unregelmäßige Verzweigungen und bilden hierdurch mit weiteren Herzmuskelzellen ein Netzwerk. Die Länge beträgt ca. 100 µm und der Durchmesser 10 - 20 µm. Benachbarte Kardiomyozyten sind über End- zu Endverbindungen namens Disci intercalares (Glanzstreifen) miteinander verknüpft. Im Sarkoplasma von Vorhof-Kardiomyozyten befinden sich neuroendokrine Granula, die ANP und Cardiodilatin enthalten. In den Granula ventrikulärer Herzmuskelzellen kann hingegen überwiegend BNP vorgefunden werden. Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems sind in der Regel größer als Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards und kaum miteinander verbunden.⁵⁷

Zu wichtigen Zellorganellen der Kardiomyozyten zählen die T-Tubuli und das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Bei den T-Tubuli handelt es sich um querverlaufende Einstülpungen des Sarkolemm, die auch transversales System genannt werden. Im Herzen sind die T-Tubuli stärker entwickelt als in der Skelettmuskulatur. Das SR verläuft in Längsrichtung und wird daher auch als L-System bezeichnet. Es handelt sich hier um das glatte endoplasmatische Retikulum der quergestreiften Muskulatur. Das SR dient als Speicher für Ca^{2+} , das für die Muskelkontraktion erforderlich ist. Das SR ist im Gegensatz zu den T-Tubuli nur gering ausgeprägt.⁵⁷

Reparaturprozesse finden in der Skelettmuskulatur durch Satellitenzellen, die sich an der Oberfläche befinden, statt. Bei diesen Satellitenzellen handelt es sich um Myoblasten, die sich bei Bedarf zu Muskelfasern differenzieren. Im Herzen fehlen hingegen genau diese Satellitenzellen, weswegen eine Regeneration des Myokards nicht möglich ist. Folglich können abgestorbene Kardiomyozyten nicht mehr ersetzt werden.⁵⁷

1.8 Die β -adrenerge Signaltransduktion

Die β -adrenergen Rezeptoren zählen zur Klasse der GPCR.²⁷ GPCR bestehen aus sieben helikalen Transmembrandomänen und ihre Struktur wird daher als heptahelikale bezeichnet. Neben der Transmembrandomäne besitzen GPCR noch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen.¹¹ Die extrazellulären Bereiche dienen der Ligandenbindung, bestimmte intrazelluläre Anteile hingegen der Rekrutierung heterotrimerer Guanosintriphosphat (GTP)-bindender Proteine (G-Proteine).⁵⁸ Die Bezeichnung GPCR ist auf genau diese Interaktion des Rezeptors mit einem G-Protein zurückzuführen.¹¹ Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten G_α , G_β und G_γ .⁵⁸ Diese sind unter Ruhebedingungen zu einem Komplex ($G_{\alpha\beta\gamma}$) assoziiert und sind nicht mit dem Rezeptor verbunden.¹¹ G_α bindet zudem im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP).⁵⁸ Bei Ligandenbindung verbindet sich $G_{\alpha\beta\gamma}$ mit dem Rezeptor und es kommt zum Austausch von GDP durch GTP. G_α dissoziiert vom restlichen G_β/G_γ Komplex ($G_{\beta\gamma}$). Sowohl G_α als auch $G_{\beta\gamma}$ sind nun in der Lage ein Effektorprotein zu stimulieren oder inhibieren.¹¹ Wenn die G_α eine stimulatorische Wirkung gegenüber der Adenylatcyclase (AC) entfaltet ist das G-Protein der G_s -Familie zuzuordnen, bei einem blockierenden Effekt hingegen der G_i -Familie. Aktiviert G_α jedoch die Phospholipase C_β gehört das Protein der G_q -Familie an.⁵⁸ G_α besitzt eine GTPase Aktivität und spaltet zur Signalterminierung GTP in GDP und anorganisches Phosphat.¹¹ Hierdurch wird G_α inaktiviert und assoziiert wieder mit $G_{\beta\gamma}$ zum $G_{\alpha\beta\gamma}$ -Komplex.⁵⁸ Im Falle einer β -adrenergen Stimulation wird die Adenylatcyclase mittels G_s aktiviert⁵⁹, wodurch vermehrt ATP in cyclisches AMP (cAMP) umgewandelt wird.⁵⁸ Als Folge kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration. Dies wiederum aktiviert die PKA, die verschiedene Ca^{2+} -regulierende Proteine phosphoryliert.⁵⁹

Eines dieser Phosphorylierungstargets ist der LTCC. Die Phosphorylierung des LTCC bewirkt im Ventrikel einen 2- bis 4-fachen Anstieg des I_{Ca} . Gleichzeitig wird die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung in Richtung negativerer Membranpotentiale verschoben. Dies hat zur Folge, dass I_{Ca} hauptsächlich bei negativem Membranpotentialen stattfindet und dass die Maximalwerte des I_{Ca} bei einem negativeren Membranpotential erreicht werden.⁵⁹ Auch in den Zellen des Erregungsbildungs- und leitungssystems erfolgt eine Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle wodurch es zu einer Abnahme der atrioventrikulären Überleitungszeit (positive Dromotropie) kommt.⁶⁰

Die PKA phosphoryliert Phospholamban (PLN) am Serin 16. Unphosphoryliertes PLN inhibiert SERCA, indem es dessen Ca^{2+} -Affinität senkt. Die Phosphorylierung durch die PKA hebt diese inhibitorische Wirkung auf und es kommt zu einem 2- bis 3-fachen Anstieg in der Ca^{2+} -Affinität von SERCA. Dies bewirkt einen stärkeren Ca^{2+} -Transport

aus dem Cytosol in das SR während der Diastole, wodurch eine schnellere Relaxation des Herzmuskels erzielt wird.⁵⁹

Der verstärkte I_{Ca} und der erhöhte sarkoplasmatische Ca^{2+} -Gehalt können den Anteil an Ca^{2+} , welches bei der Kontraktion aus dem SR freigesetzt wird, steigern. Dies bewirkt insgesamt eine gesteigerte $[Ca^{2+}]_i$ und damit einen positiv inotropen Effekt.⁵⁹

Troponin I stellt ebenfalls eine Zielstruktur der PKA dar und kann ebenfalls durch diese am Serin 23 und Serin 24 phosphoryliert werden. Dies führt zu einer Verringerung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente und einer schnelleren Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C, wodurch eine schnellere Relaxation in der Diastole erzielt wird. Der lusitrope Effekt einer β -adrenergen Stimulierung ist jedoch weitestgehend auf die PLN Phosphorylierung (~ 85 %) zurückzuführen.⁵⁹

Eine weitere Zielstruktur der β -adrenergen Signalkaskade ist der Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR). Eine Phosphorylierung mittels PKA führt hier zu einem vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR und damit zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$.²⁷ Dennoch führt diese verstärkte Ca^{2+} -Freisetzung nicht zu einer anhaltenden Inotropie, da hierdurch ein stärkerer Ca^{2+} -Efflux mittels Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) induziert wird. Dies wiederum verringert die Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) im SR, wodurch es zu einem Absinken der Ca^{2+} -Transienten auf Ausgangsniveau kommt.⁵⁹

Die PKA phosphoryliert ebenfalls das Myosin-bindende Protein C und fördert hierdurch den Querbrückenzyklus, woraus ein schnellerer Auswurf resultiert.⁵⁹

Eine β -adrenerge Aktivierung der PKA entfaltet auch seine Wirkung an dem inhibitorischen Protein Phospholemman (PLM). Eine Phosphorylierung des PLM bewirkt eine Disinhibition der NKA, wodurch der Repolarisierungsprozess und die Relaxation beschleunigt werden.²⁷ Dies ist jedoch nicht der einzige Effekt der PLM-vermittelten NKA-Aktivierung. So kann PLM den β -adrenerg vermittelten Anstieg der $[Na^+]_i$ und Ca^{2+} -Amplitude einschränken. Während einer β -adrenergen Stimulierung steigt der Na^+ -Einstrom erheblich an. Dies geschieht einmal durch häufigere Na^+ -Einwärtsströme, aber auch durch einen Ca^{2+} -vermittelten Na^+ -Influx mittels NCX. Je größer die Ca^{2+} -Transienten sind, desto mehr Ca^{2+} muss über den NCX abtransportiert werden. Dies wiederum geschieht im Austausch mit Na^+ , was letztlich eine erhöhte $[Na^+]_i$ mit sich bringen kann. Letztere wiederum kann den Ca^{2+} -Influx begünstigen und gleichzeitig den NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux behindern, wodurch ebenfalls eine inotrope Wirkung induziert werden kann. Die Aktivierung der NKA durch die Aufhebung der PLM Inhibition verbessert den Na^+ -Ausstrom und kann dadurch die maximale inotrope Wirkung des β -adrenergen Systems limitieren. Durch die Einschränkung des intrazellulären Na^+ -Anstiegs kann PLM letztlich einer Ca^{2+} -Überladung und Arrhythmien während einer sympathotonen Aktivierung des Herzens vorbeugen.⁵⁹

Auch K⁺-Kanäle stellen ein Target der PKA dar. So phosphoryliert die PKA die Kanalproteine KCNQ1 und KCNE1, die für den langsamen spannungsgesteuerten K⁺-Ausstrom verantwortlich sind. Dies ermöglicht zum einen die Aktivierung bei negativeren Membranpotentialen, zum anderen die Stabilisierung des offenen Zustandes. Dies hat die Erhöhung des langsamen K⁺-Ausstroms und damit eine schnellere Repolarisation zur Folge.

Die positive Chronotropie des Sympathikus verkürzt die kumulative Dauer der Diastole. Problematisch dabei ist, dass die Füllung und weitestgehend auch die koronararterielle Durchblutung des Herzens ausschließlich in der Diastole stattfinden. Durch die schnellere Repolarisation und damit verkürzte Aktionspotentialdauer wird die Systole verkürzt, sodass auch bei einer hohen Herzfrequenz (bis 220/min) eine ausreichende Füllung und Perfusion sichergestellt wird.⁶⁰

cAMP beeinflusst zudem direkt die Aktivität von hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) in den Schrittmacherzellen. Dabei entfaltet cAMP seine Wirkung durch direkte Bindung, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle erhöht wird.⁶⁰ Als Folge erhöht sich der Schrittmacherstrom, wodurch die Geschwindigkeit der diastolischen Depolarisation und die Erregungsfrequenz zunehmen. Es wird hierdurch ein positiv chronotroper Effekt vermittelt.⁵⁰

cAMP kann schließlich durch Phosphodiesterasen zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) abgebaut werden, wodurch es zu Inaktivierung und folglich Signalterminierung kommt.⁵⁸

Der Sympathikus vermittelt mit Hilfe seiner β -adrenergen Signalkaskade positiv chronotrope, dromotrope, inotrope und lusitrope Effekte. Als Rezeptormoleküle dienen hierbei GPCR, die mit Hilfe der PKA verschiedene Ca²⁺-regulierende Kanäle aktivieren. Die Wirkung des Sympathikus beschränkt sich allerdings nicht nur auf den Ca²⁺-Haushalt. So werden ebenfalls K⁺- und Na⁺-regulierende Proteine in ihrer Aktivität beeinflusst. Dieses Zusammenspiel ermöglicht letztlich eine adäquate Anpassung an Belastungssituationen ohne dabei negative Effekte wie beispielsweise Arrhythmien zu begünstigen.

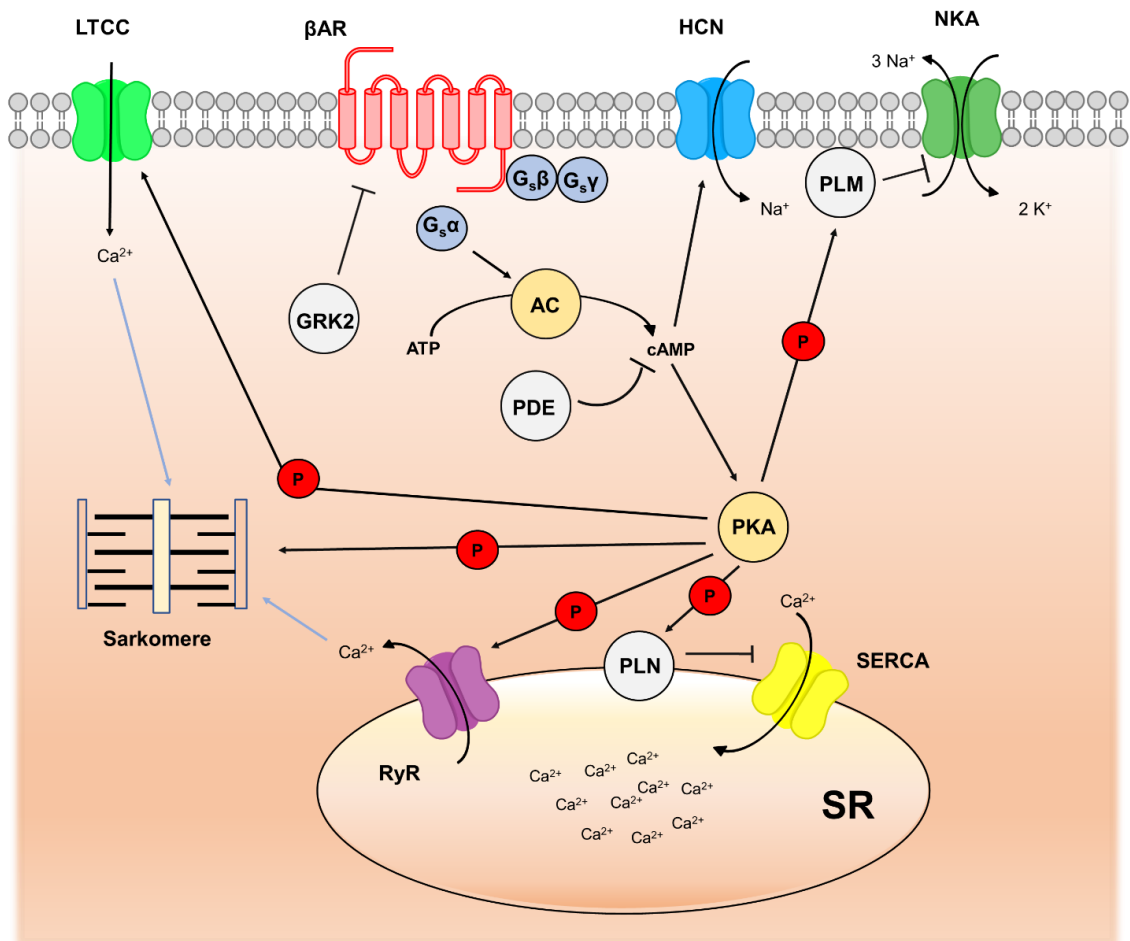


Abbildung 2: β-adrenerge Signalkaskade.

Die β-adrenerge Signaltransduktion wird durch β-adrenerger Rezeptoren (βAR), die zur Klasse der G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zählen, vermittelt. Die Bindung eines Liganden an den βAR führt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), die daraufhin cAMP aus ATP bildet. cAMP wiederum stimuliert die Proteinkinase A (PKA), die verschiedene Zielproteine phosphoryliert und hierdurch in ihrer Aktivität beeinflusst.

AC: Adenylatcyclase; GRK2: GPCR Kinase 2; LTCC: L-Typ Ca^{2+} -Kanal; NKA: Na^+/K^+ -ATPase; P: Phosphorylierung; PDE: Phosphodiesterase; PLM: Phospholemman; PLN: Phospholamban; RyR: Ryanodin Rezeptor; SERCA: sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

1.9 Die Na⁺-K⁺-ATPase

1.9.1 Aufbau, Struktur und Funktion

Die NKA ist ein membrangebundenes Protein, das für die Aufrechterhaltung des Na⁺- und K⁺-Gradienten zwischen Intra- und Extrazellularraum verantwortlich ist. Sie transportiert hierbei 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle hinaus und 2 K⁺-Ionen hinein, sodass die für tierische Zellen typische Verteilung aufrechterhalten bleibt. Die [Na⁺]_i bleibt hierdurch niedrig, die K⁺-Konzentration hingegen hoch. Es handelt sich hierbei um einen aktiven Transport, d.h. er erfolgt entgegen des Konzentrationsgradienten und erfordert aus diesem Grund Energie. Die erforderliche Energie wird durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Der generierte elektrochemische Gradient ist für zahlreiche zelluläre Prozesse unabdinglich. So ist er für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials in zahlreichen Zellen erforderlich. Er spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Erregbarkeit von Muskel- und Nervenzellen. Des Weiteren ist der Na⁺-Gradient auch am Transport zahlreicher Substanzen beteiligt. Er ist die treibende Kraft hinter dem Na⁺-gekoppelten Transport von Ionen (z.B. Ca²⁺, Cl⁻), Substraten (Glucose, Aminosäuren) und Neurotransmittern.⁶¹ Die NKA besteht aus drei Untereinheiten: α, β und FXYD. In Säugetieren werden vier α-, drei β- und sieben FXYD-Isoformen exprimiert. Am häufigsten tritt die Kombination α1- und β1-Isoform auf. Die NKA-α1 wird ubiquitär exprimiert. Die NKA-α2 Isoform (NKA-α2) befindet sich im Herz- und Skelettmuskel, sowie in Gliazellen und Astrozyten. Die α3-Isoform (NKA-α3) kann sowohl im Gehirn als auch im humanen Herz nachgewiesen werden. Die NKA-α4 Isoform (NKA-α4) kann in Spermien vorgefunden werden und zählt zu den spermien-spezifischen Proteinen. Die β1-, β2- und β3-Isoformen kommen beispielsweise in murinen Kardiomyozyten oder humanen Erythrozyten vor. Im murinen Herz wird hauptsächlich die β1-Isoform exprimiert.⁶² Die sieben FXYD-Isoformen besitzen neben der numerischen Nomenklatur (FXYD1, FXYD2 etc.) zusätzlich noch eigenständige Namen. So wird z.B. das FXYD1 als PLM und das FXYD2 als γ-Untereinheit bezeichnet. PLM wird hauptsächlich in Herzen und in der Skelettmuskulatur exprimiert.⁶³ Aufgrund seiner Bedeutung für die Herzfunktion, wird in den folgenden Abschnitten lediglich auf das PLM näher eingegangen.

Die α-Untereinheit der NKA besitzt 10 Transmembranhelices und drei cytoplasmatische Domänen. Zu den cytoplasmatischen Domänen zählen die Aktuator (A)-, Nukleotid-bindende (N)- und Phosphorylierungsdomäne (P).⁶⁴ Die NKA-α hat ein Molekulargewicht von ca. 112 kDa. Sie besitzt katalytische Eigenschaften und ist an den Transportprozessen beteiligt. Die NKA-α enthält die Bindungsstellen für ATP, Kationen und Inhibitoren, wie beispielsweise Ouabain.⁶¹

Im Folgenden wird ausschließlich auf die NKA- α 1 und NKA- α 2 eingegangen, da sich diese Arbeit hauptsächlich auf diese beiden Isoformen fokussiert.

In murinen ventrikulären Kardiomyozyten werden sowohl die NKA- α 1 als auch die NKA- α 2 exprimiert. Dennoch zählt die NKA- α 1 als die vorherrschende Isoform. So konnte 88 % des messbaren NKA-spezifischen Stroms (I_{pump}) allein auf die NKA- α 1 zurückgeführt werden. Die beiden NKA-Isoformen unterscheiden sich nicht allein in ihrem quantitativen Vorkommen, sondern auch in ihrer Lokalisation. Die NKA- α 1 ist relativ einheitlich entlang des Sarkolemms und der T-Tubuli verteilt, wohingegen sich die NKA- α 2 hauptsächlich in den T-Tubuli konzentriert.⁶⁵ In einem μm^2 T-Tubuli konnten ca. 800 Einheiten NKA- α 1 nachgewiesen werden, in einem μm^2 Sarkolemm in etwa 670. Anders hingegen verhält es sich mit der NKA- α 2. Hier kamen in den T-Tubuli auf einen μm^2 rund 680 NKA- α 2 Proteine und im Sarkolemm ca. 150 pro μm^2 vor. Dies entspricht einer ca. 4,5 fachen Konzentrierung der NKA- α 2 in den T-Tubuli.⁶⁶ Aus dieser Kompartimentierung ergeben sich unterschiedliche zelluläre Funktionen der jeweiligen Isoformen. Die NKA- α 1 kontrolliert die globale $[\text{Na}^+]_i$, die NKA- α 2 hingegen ist verantwortlich für eine lokale Regulierung über welche sie die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Freisetzung und die Ca^{2+} -Transienten beeinflusst.⁶⁷ Genetisch veränderte Versuchstiere, welche eine Reduktion in der kardialen NKA- α 2 Expression aufwiesen ($\alpha 2^{+/-}$), manifestierten einen hyperkontraktilen Phänotyp, der auf eine vermehrte sarkoplasmatische Ca^{2+} -Freisetzung zurückzuführen war. Mäuse mit verringerter NKA- α 1 Expression im Herzen ($\alpha 1^{+/-}$) waren hingegen durch eine myokardiale Hypokontraktilität gekennzeichnet und zeigten keine Veränderungen in ihren Ca^{2+} -Transienten. Interessanterweise verringerte die Inhibition der NKA mittels Ouabain in $\alpha 1^{+/-}$ nicht zusätzlich die Kontraktilität, sondern erhöhte sie. Somit scheint die NKA- α 2 nicht nur an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt zu sein, sondern sie ist ebenfalls in der Lage mittels Inhibition eine positiv inotrope Wirkung zu vermitteln.⁶⁸ Darüber hinaus wurde in $\alpha 2^{+/-}$ Kardiomyozyten ein Anstieg des NCX-spezifischen Stroms (I_{NCX}) im reverse mode festgestellt, was die Existenz einer subsarkolemmalen Mikrodomäne zwischen NKA- α 2 und NCX vermuten lässt. Die NKA- α 2 kann in dieser Mikrodomäne über Veränderung der $[\text{Na}^+]_i$ Einfluss auf die Aktivität des NCX nehmen, wodurch wiederum die Ca^{2+} -Transienten und die Kontraktilität beeinflusst werden.⁶⁹ Die Beeinflussung der Ca^{2+} -Freisetzung durch eine Inhibition bzw. verminderten Expression der NKA- α 2 bestätigt ebenfalls diese Annahme.^{67,68} Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine physische Interaktion zwischen NKA und NCX. In Immunfluoreszenzstudien kolokalisierte der NCX mit der NKA- α 1 bzw. NKA- α 2. Mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) konnte sogar eine Bindung zwischen NKA- α 1 und NCX bzw. NKA- α 2 und NCX nachgewiesen werden.⁷⁰ *Silvermann et al.* konnten in Kaninchen Herzen sogar einen

subsarkolemmalen Na^+ -Gradienten nachweisen, bei der die Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]$) unterhalb der Membran am höchsten war. Mit zunehmender Entfernung zur Zellmembran nahm hierbei die $[\text{Na}^+]$ ab. Bei einer Entfernung von ca. 200 nm erreichte die $[\text{Na}^+]$ schließlich ähnliche Werte wie Bereiche aus der Zellmitte. Dieser subsarkolemmale Na^+ -Gradient wies keine nennenswerten Unterschiede zwischen Systole und Diastole auf.⁷¹

Diese Ergebnisse zeigen die mögliche Existenz einer NKA- $\alpha 2$ NCX Mikrodomäne in den T-Tubuli, die an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt ist. Kennzeichnend für diese Mikrodomäne ist das hohe Vorkommen an NKA- $\alpha 2$ Molekülen, die in enger Nachbarschaft zum NCX lokalisiert sind. Diese enge physische Assoziation scheint auch die Ca^{2+} -regulierende Wirkung zu vermitteln. Der Na^+ -Gradient, der durch die NKA- $\alpha 2$ in der Mikrodomäne generiert wird, könnte unmittelbar durch den NCX wahrgenommen werden und einen Na^+ -Einstrom sowie einen Ca^{2+} -Ausstrom mittels NCX zur Folge haben. Kommt es zu einer Inhibition der NKA- $\alpha 2$, könnte die erhöhte $[\text{Na}^+]$ eine Aktivierung des NCX induzieren. Hierbei würde vermehrt Na^+ aus und Ca^{2+} in die Zelle transportiert werden. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ würde dann wiederum eine verstärkte Kontraktilität bewirken. Die genaue Funktionsweise und Bedeutung dieser Mikrodomäne bleiben allerdings bis heute noch unklar.

Die beiden NKA α -Isoformen weisen eine unterschiedliche Affinität zum Digitalisglykosid Ouabain auf, was eine Unterscheidung mittels pharmakologischer Inhibition ermöglicht. Die NKA- $\alpha 1$ weist eine geringe und die NKA- $\alpha 2$ eine hohe Affinität gegenüber Ouabain auf. Die Na^+ -Affinität beide Isoformen ist jedoch vergleichbar.⁶⁵

Die NKA β -Untereinheit (NKA- β) besitzt lediglich eine Transmembranhelix, welche die Membran in einem 45° Winkel durchquert.⁶⁴ Ihr Molekulargewicht beträgt, je nach Glykosylierungsgrad, zwischen 40 und 60 kDa. Die NKA- β nimmt eine wichtige Rolle in der Enzymfunktion ein. So moduliert sie beispielsweise die Affinität der NKA für Na^+ und K^+ und ist an der Okklusion der K^+ -Ionen beteiligt. Zudem nimmt die NKA- β in Wirbeltieren auch eine Chaperone-Funktion wahr und stellt somit die korrekte Faltung der NKA- α sicher. Letzteres erleichtert den Transport der NKA- α zur Plasmamembran.⁶¹

PLM besitzt eine vollständig α -helikale Struktur und liegt in vitro als tetrameres Homooligomer vor.⁷² Es besitzt, ähnlich wie die NKA- β , lediglich eine Transmembrandomäne.⁶³ PLM assoziiert mit verschiedenen NKA- α Isoformen, was in unterschiedlichen Experimenten nachgewiesen werden konnte. Beispielsweise wurde in *Xenopus* Oocyten mittels Co-IP gezeigt, dass eine Interaktion zwischen PLM und NKA $\alpha 1$ - $\beta 1$, $\alpha 2$ - $\beta 1$, $\alpha 3$ - $\beta 1$, $\alpha 1$ - $\beta 2$, $\alpha 2$ - $\beta 2$ und $\alpha 3$ - $\beta 2$ Isozyemen stattfindet.⁷³ Auch in isolierten Rattenkardiomyozyten assoziierte PLM mit der NKA- α .⁷⁴ Diese Interaktion beschränkte sich allerdings nicht nur auf in vitro Modelle. Eine Bindung zwischen PLM

und NKA- α 1 bzw. NKA- α 2 fand ebenso in Herzgewebe (Rind) und Skelettmuskelgewebe (Ratte) statt.⁷³ PLM hat eine inhibitorische Wirkung auf NKA. So zeigten z.B. PLM Knockout Versuchstiere eine stärkere NKA Aktivität als die WT Kontrollgruppe.⁷⁵ Noch unklar ist allerdings, ob PLM die Affinität der NKA gegenüber Na^+ oder die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) moduliert. In *Xenopus* Oocyten verringerte PLM die Affinität der NKA- α 1 und NKA- α 2 für externes K^+ und internes Na^+ . Dieser Effekt betraf hierbei stärker das Na^+ als das K^+ . So wurde die Na^+ -Affinität um das 1,5 bis 2-fache gesenkt, wohingegen es nur zu einer leichten Verringerung der K^+ -Affinität kam.⁷³ *Zhang et al.* hingegen zeigten, dass eine Überexpression von PLM in adulten Rattenkardiomyozyten eine verringerte V_{max} induzierte. Die Na^+ - und K^+ -Affinität blieb jedoch unverändert.⁷⁴ Durch eine Phosphorylierung von PLM kann die NKA-Inhibition aufgehoben werden. Beispielsweise zeigten *Despa et al.*, dass eine ISO Applikation nicht nur die NKA Aktivität erhöhte, sondern auch den Phosphorylierungsgrad am PLM Serin 68 (PLM Ser68), der PKA-Phosphorylierungsstelle.⁷⁶ Auch die Proteinkinase C (PKC) ist in der Lage PLM zu phosphorylieren und damit die NKA-Inhibition in Kardiomyozyten aufzuheben. Die Phosphorylierung erfolgt hierbei sowohl am PLM Serin 63 (PLM Ser63) als auch am PLM Ser68.⁷⁷ So genügt bereits die Phosphorylierung einer dieser Phosphorylierungsstellen um den inhibierenden Effekt des PLM aufzuheben. Die aktivierende Wirkung der PKC und PKA wird ausschließlich über PLM vermittelt. So konnte in HeLa Zellen, welche kein PLM exprimierten, nach PKA- und PKC-Aktivierung keine veränderte NKA-Funktion festgestellt werden. In PLM-exprimierenden HeLa Zellen führte hingegen eine PLM-Phosphorylierung durch die PKA bzw. PKC zu einer erhöhten Affinität der NKA gegenüber Na^+ .⁷⁸ Es gibt Hinweise, dass die NKA-Aktivierung durch die Bildung von inaktiven PLM Tetrameren vermittelt wird. So zeigten *Song et al.* in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK) 293 Zellen, dass phosphomimetische Mutationen im PLM die Interaktion zwischen NKA und PLM verringerten, indem eine Oligomerisierung des PLM zu Tetrameren stattfand. Als Mechanismus wurde eine Konformationsänderung des NKA-PLM Komplexes und eine Verringerung inhibitorischer Monomere vorgeschlagen. Eine Phosphorylierung mittels PKA bzw. PKC induziert eine Strukturänderung des PLM-Tetramers, wodurch dessen Stabilität erhöht wird. Letzteres bewirkt eine vermehrte Oligomerisierung, die zu einer Verminderung der PLM-Monomere führt. Als Folge kommt es zu einer verringerten Bindung von PLM an die NKA und einer entsprechenden geringeren NKA-Inhibition. Die Phosphorylierung von PLM beeinflusst nicht nur die Tetramerstruktur, sondern ebenso die Konformation des PLM-NKA-Komplexes. Hierbei werden die cytoplasmatische Domäne des PLM und der N-Terminus der NKA verstärkt voneinander entfernt⁷⁹

Insgesamt ist die NKA verantwortlich für die Aufrechterhaltung der kardialen Na^+ - und K^+ -Homöostase. Die NKA- $\alpha 2$ nimmt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Regulierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und entsprechend der Kontraktilität ein, indem sie die lokalen Na^+ -Spiegel beeinflusst. Es gibt zudem Hinweise, dass dies durch eine NKA- $\alpha 2$ NCX Mikrodomäne in den T-Tubuli vermittelt wird. In dieser Mikrodomäne kann die NKA- $\alpha 2$ die NCX Aktivität beeinflussen, wodurch letztlich Einfluss auf die kardialen Ca^{2+} -Spiegel und die Kontraktilität genommen werden kann. Im Gegensatz hierzu beeinflusst die NKA- $\alpha 1$ die globale $[\text{Na}^+]_i$ in den Kardiomyozyten. PLM wirkt inhibierend auf die NKA. Durch eine Phosphorylierung mittels PKA oder PKC am Ser63 oder Ser68 kann die PLM-Inhibition aufgehoben werden und die Aktivität der NKA erhöht werden. Somit stellt die NKA- $\alpha 2$ ein Schlüsselprotein in der kardialen Funktion dar, indem es sowohl die $[\text{Na}^+]_i$ als auch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beeinflussen kann.

1.9.2 Rolle in der Pathogenese kardialer Erkrankungen

Während der Pathogenese einer Herzinsuffizienz treten zahlreiche biochemische Veränderungen im Herzen auf. Der folgende Abschnitt konzentriert sich lediglich auf Veränderungen, welche die NKA betreffen.

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist immer noch unklar wie die Expression und Aktivität der NKA durch eine chronische Herzinsuffizienz beeinflusst wird. Verschiedene Forschungsgruppen konnten eine Verringerung der NKA in insuffizienten Herzgewebe nachweisen. $[\text{H}^3]$ Ouabain-Bindungsexperimente von *Shamraj et al.* wiesen beispielsweise eine 42 %-ige Reduktion der NKA-Konzentration in insuffizienten humanen Herzen nach.⁸⁰ Eine erniedrigte ventrikuläre NKA-Konzentration zeigte sich ebenfalls bei Durchführung der $[\text{H}^3]$ Ouabain-Bindungsexperimente in Patientenbiopsien mit einer Aortenstenose und / oder Aorteninsuffizienz.⁸¹ In Patienten mit einer terminalen idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie konnte sogar eine signifikante Korrelation zwischen NKA-Gehalt und LVEF nachgewiesen werden. *Ishino et al.* unterteilten diese Patienten hierbei in zwei Subgruppen: Patienten mit einer kompensierten Herzinsuffizienz, die eine Herztransplantation erhielten und Patienten, die einen irreversiblen kardiogenen Schock erlitten hatten und folglich dekompenziert waren. Letztere wiesen nicht nur eine schlechtere LVEF auf als Erkrankte mit einer kompensierten Herzinsuffizienz, sondern auch eine niedrigere NKA-Konzentration.⁸² Die Analyse verschiedener Tiermodelle lieferte ähnliche Beobachtungen. So wiesen Hamster, die an einer Kardiomyopathie litten, eine 19 %-ige Erhöhung des relativen Herzgewichtes und eine 33 %-ige Reduktion der ventrikulären NKA Spiegel auf.⁸³ *Larsen et al.* stellten in spontan hypertensiven Ratten eine Verringerung der NKA Expression

fest, die mit einem 75 % höherem relativem Herzgewicht einherging. Auch in kardiomyopathischen Hamstern konnte eine verringerte Menge an NKA nachgewiesen werden. Dies ging ebenfalls mit einer Erhöhung des relativen Herzgewichtes einher.⁸¹ Uneinheitlicher wird es hingegen bei Betrachtung expressioneller Veränderungen der jeweiligen NKA-Isoformen im pathologischen Kontext. Die ermittelte Expression einzelner Isoformen variiert je nach pathologischem Modell und verwendeter Bestimmungsmethode. Ebenso weisen manche Forschungsgruppen einen Isoformen-Switch nach, andere hingegen nicht. *Schwinger et al.* zeigten z.B., dass Herzinsuffizienzpatienten der NYHA Klasse IV einen geringeren Proteingehalt an NKA- α 1, NKA- α 3 und NKA- β 1 in ihrem Herzen aufwiesen. Die NKA- α 2- und NCX Expression unterschied sich hingegen nicht von der Kontrollgruppe. [³H]Ouabain-Bindungsexperimente wiesen zudem eine verringerte Gesamtmenge an NKA nach.⁸⁴ Auf mRNA Ebene konnte jedoch von *Sylvén et al.* eine andere Beobachtung gemacht werden. So konnten hier keine Unterschiede in den mRNA Spiegeln der NKA- α 1, NKA- α 2 und NKA- α 3 zwischen Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie und gesunden Individuen identifiziert werden.⁸⁵ Versuche an Ratten, die einem chronischen MI unterzogen wurden, zeigten andere Ergebnisse. Die MI-behandelten Ratten wiesen verglichen mit der Sham Kohorte 25 % niedrigere NKA- α 2 und 120 % höhere NKA- α 3 mRNA Spiegel auf. Der mRNA Gehalt der NKA- α 1 und NKA- β 1 blieb hingegen von der MI-Behandlung unbeeinflusst. Die Bestimmung des Proteingehaltes lieferte ein vergleichbares Bild. So waren auch hier keine Unterschiede in der NKA- α 1 und NKA- β 1 Expression zwischen Sham- und MI-Kohorte zu verzeichnen, was auf eine unveränderte NKA Gesamtmenge hindeutete. MI-Ratten zeigten ebenfalls eine Reduktion im NKA- α 2 Proteingehalt, in diesem Fall um 55 %. Die NKA- α 3 Expression war in der Sham-Gruppe kaum nachweisbar, wohingegen es nach einer MI-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg kam. Da keine Downregulation der NKA feststellbar war, wurde von einem Isoform-Switch von NKA- α 2 zu NKA- α 3 ausgegangen.⁸⁶

Da die NKA ein Enzym ist, können myokardiale Schädigungen nicht nur Einfluss auf die Expression haben, sondern auch auf dessen Aktivität. Auch hier ist immer noch unklar, welche Auswirkungen pathologische Veränderungen tatsächlich auf die NKA-Kinetik haben. Je nach Herzinsuffizienzmodell reichen die Ergebnisse von unveränderter bis verminderter NKA Aktivität. Beispielsweise zeigten *Schwinger et al.* im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten eine Verringerung der NKA Aktivität um 40 %.⁸⁴ *Semb et al.* konnten zwar nachweisen, dass die V_{max} des Na⁺-Effluxes in Ratten nach chronischem MI um 39 % herabgesetzt war, dennoch blieb die maximale Pumprate per Zelle unverändert.⁸⁶ In einem Kaninchen-Herzinsuffizienzmodell traten ebenfalls keine Veränderungen in der V_{max} des Na⁺-Ausstroms auf.⁸⁷

Die Hauptaufgabe der NKA liegt in der Regulation und Aufrechterhaltung der $[Na^+]_i$ und intrazellulären K^+ -Konzentration ($[K^+]_i$) im exprimierendem Gewebe.⁶¹ Dementsprechend können Veränderungen der NKA, sei es kinetischer oder expressioneller Natur, direkte Auswirkungen auf die Na^+ - und K^+ -Homöostase einer Zelle besitzen. Durch eine enge Kopplung des Na^+ - und Ca^{2+} -Haushaltes in Kardiomyozyten (s. 1.9.1) können sich Änderungen der $[Na^+]_i$ auf die $[Ca^{2+}]_i$ und damit auf die Kontraktilität auswirken.⁶⁷⁻⁶⁹ *Despa et al.* konnten beispielsweise in insuffizienten Kaninchen-Kardiomyozyten eine Erhöhung der $[Na^+]_i$ feststellen. Dies war sowohl mit als auch ohne elektrische Stimulation zu beobachten. Die $[Na^+]_i$ betrug unter Ruhebedingungen $6,6 \pm 0,5$ mmol/l in der Kontrollgruppe und $9,7 \pm 0,7$ mmol/l in den insuffizienten Kardiomyozyten. Letztere zeigten bei elektrischer Stimulation einen Anstieg der $[Na^+]_i$ auf durchschnittlich $11,3 \pm 0,9$ mmol/l. In den Kontrollen erhöhte sich die $[Na^+]_i$ ebenfalls, allerdings fiel der Anstieg deutlich milder aus. Die durchschnittliche $[Na^+]_i$ in kontrahierenden Kardiomyozyten betrug in diesem Fall lediglich $8,0 \pm 1,1$ mmol/l. Die erhöhte $[Na^+]_i$ war nicht auf eine verringerte NKA Aktivität zurückzuführen, sondern auf einen stärkeren diastolischen Na^+ -Influx hauptsächlich durch Tetrodotoxin-sensitive Na^+ -Kanäle.⁸⁷ Im Myokard von Herzinsuffizienzerkrankten konnten *Pieske et al.* eine erhöhte $[Na^+]_i$ und verstärkte diastolische Spannung nachweisen. Trotz der erhöhten $[Na^+]_i$ fiel bei niedriger Stimulationsfrequenz die Kontraktionskraft in gesundem und insuffizientem Myokard vergleichbar aus. Bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz sank die Kontraktionskraft des insuffizienten Herzgewebes, wohingegen das Gesunde hierin einen frequenzabhängigen Anstieg erfuhr. Ebenso nahm die diastolische Spannung nur in der Herzinsuffizienzgruppe mit steigender Stimulationsfrequenz zu. Im gesunden Myokard konnte hingegen keine Änderung festgestellt werden. Ca^{2+} -Messungen erlaubten den Nachweis einer stärkeren reverse mode Aktivität des NCX in insuffizienten Kardiomyozyten und damit einen NCX-vermittelten Ca^{2+} -Influx, was zu einer Erhöhung des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehaltes führte. *Pieske et al.* sehen in der erhöhten $[Na^+]_i$ der insuffizienten Kardiomyozyten eine Möglichkeit bei einer niedrigen Herzfrequenz einen relativ normalen sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehalt durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom mittels NCX aufrechtzuerhalten ohne dabei die diastolischen Ca^{2+} -Spiegel zu steigern. Bei höheren Herzfrequenzen greift dieser Mechanismus allerdings nicht mehr. Trotz der höheren $[Na^+]_i$ kann das SR insuffizienter Kardiomyozyten nicht mehr Ca^{2+} aufnehmen und es kann zu einer Ca^{2+} -Überladung in der Diastole kommen. Darüber hinaus reduziert die erhöhte $[Na^+]_i$ die systolische Kontraktionskraft und begünstigt eine erhöhte diastolische Spannung.⁸⁸ Eine ähnliche Beobachtung machten *Schillinger et al.* während der Durchführung verschiedener Experimente am insuffizientem Kaninchenmyokard. Letztere wiesen ebenfalls eine

höhere $[Na^+]_i$ auf. Auch in diesem Fall unterschied sich die isometrische Kontraktionskraft erst bei höheren Stimulationsfrequenzen von der Kontrollgruppe. Hierbei zeigten die insuffizienten Herzen ebenfalls eine niedrigere Kontraktionskraft als die gesunde Kohorte. Der sarkoplasmatische Ca^{2+} -Gehalt verhielt sich ähnlich. Bei niedrigen Stimulationsfrequenzen konnten hinsichtlich des SR Ca^{2+} -Gehaltes keine Unterschiede zwischen den Sham- und Herzinsuffizienzkohorte identifiziert werden. Bei höheren Stimulationsfrequenzen fiel in den insuffizienten Muskelfasern der frequenzabhängige Anstieg der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Beladung allerdings deutlich abgeschwächer als in der Sham-Gruppe aus. Auch *Schillinger et al.* mutmaßen, dass die erhaltene Funktion und sarkoplasmatische $[Ca^{2+}]_i$ bei niedriger Stimulationsfrequenz wahrscheinlich auf einen NCX-vermittelten Ca^{2+} -Influx zurückzuführen sind, der durch die erhöhte $[Na^+]_i$ getrieben wird.⁸⁹ Die Auswirkungen einer veränderten $[Na^+]_i$ beschränken sich allerdings nicht nur auf das SR. Es konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter $[Na^+]_i$ und Bildung von ROS festgestellt werden. *Kohlhaas et al.* zeigten, dass die Erhöhung der $[Na^+]_i$ eine verstärkte Bildung von H_2O_2 in Kardiomyozyten von gesunden Meerschweinchen induzierte. Ähnliches konnte in insuffizienten Zellen beobachtet werden. Hier fand ebenfalls eine erhöhte H_2O_2 -Generierung im Vergleich zu gesunden Herzmuskelzellen statt. Die Inhibition des Ca^{2+} -Effluxes über den mitochondrialen NCX verhinderte in den insuffizienten Kardiomyozyten die Produktion von H_2O_2 . Als Mechanismus der H_2O_2 -Entstehung wurde eine Na^+ -vermittelte Beeinträchtigung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme vorgeschlagen. So kann eine erhöhte $[Na^+]_i$ die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme stören und die Bildung H_2O_2 begünstigen.⁹⁰

Insgesamt gibt es demnach noch immer Unklarheit über die Rolle der NKA in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. So herrscht Uneinigkeit welche genauen Veränderungen die NKA im Rahmen einer Herzinsuffizienz erfährt. Fest steht allerdings, dass eine Erhöhung der $[Na^+]_i$ und eine Verringerung der NKA Expression im Krankheitsverlauf stattfindet. Aufgrund der wichtigen Rolle der NKA in der Aufrechterhaltung der zellulären Na^+ -Homöostase und besagter Veränderungen im pathologischem Kontext kann eine Beteiligung an der Krankheitsentwicklung nicht ausgeschlossen werden. Die enge Kopplung des Na^+ - und Ca^{2+} -Haushaltes potenziert zudem die Effekte einer gestörten Na^+ -Homöostase und erschwert die Identifizierung NKA-vermittelter Effekte. Um hier mehr Klarheit zu schaffen und evtl. sogar neue Arzneistofftarget in der Therapie der Herzinsuffizienz zu identifizieren, ist ein erhöhter Forschungsbedarf unabdinglich.

1.9.3 Die Na⁺-K⁺-ATPase als pharmakologisches Target in der Therapie der Herzinsuffizienz

Der Einsatz von Digitalisglykosiden zur Behandlung der Herzinsuffizienz geht auf eine lange Tradition zurück. So benutzten bereits die Römer den Fingerhut für die Behandlung der Herzinsuffizienz. Die Wirkstoffe der Fingerhüte (*Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata*) werden als Digitalisglykoside oder auch Herzglykoside bezeichnet. Hierzu zählen beispielsweise Digitoxin und Digoxin. 1785 beschrieb William Withering in einer wissenschaftlichen Abhandlung die erfolgreiche Behandlung von Herzinsuffizienz-Patienten mit rotem Fingerhut (*Digitalis purpurea*).⁹¹ 1874 gelang schließlich Oswald Schmiedeberg die Isolierung des ersten Reinglykosides, dem Digitoxin.⁹²

Noch heute werden die Digitalisglykoside in der Herzinsuffizienztherapie eingesetzt. Die Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz stellt hierbei eine enge Indikationsstellung. So sollen Herzglykoside nur bei therapierefraktären Patienten im NYHA III und IV Stadium mit stabilem Sinusrhythmus eingesetzt werden. Bei nicht beherrschbaren tachyarrhythmischen Vorhofflimmern können sie allerdings in allen NYHA-Klassen zur Kontrolle der Ruhfrequenz zum Einsatz kommen. Somit stellen die Digitalisglykoside ein Reservetherapeutikum in der Behandlung der Herzinsuffizienz dar.⁶ Zu den heutigen noch verwendeten Digitalisglykosiden zählen Digitoxin, Digoxin, Acetyldigoxin und Metildigoxin.¹¹

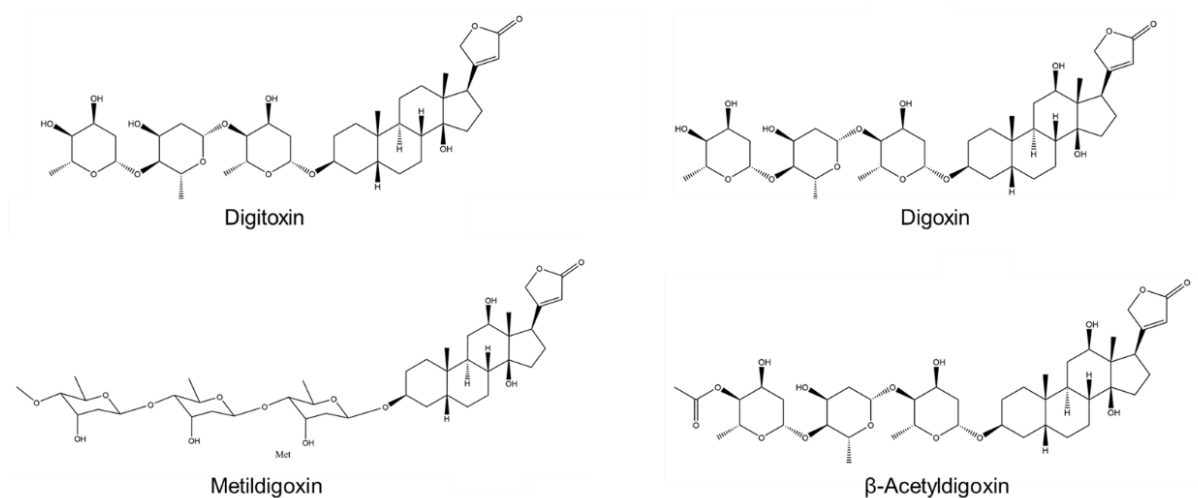


Abbildung 3: Digitalisglykoside.

Herzglykoside werden heute zur Behandlung therapierefraktärer Herzinsuffizienzpatienten mit stabilem Sinusrhythmus in den NYHA-Stadien III und IV verwendet. Bei nicht anders beherrschbaren tachyarrhythmischen Vorhofflimmern können sie allerdings in jeder NYHA-Klasse eingesetzt werden. Digitalisglykoside, die sich heute noch im Einsatz befinden, sind Digitoxin, Digoxin, Metildigoxin und β-Acetyldigoxin.

Pharmakologisch betrachtet beruht die Wirkung dieser Substanzklasse auf die Inhibition der NKA. Dies führt zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$, wodurch die Aktivität des NCX herabgesetzt wird. Es wird weniger Ca^{2+} aus der Zelle transportiert, sodass die $[Ca^{2+}]_i$ ansteigt. Während der Diastole kann nun mehr Ca^{2+} in das SR transportiert werden. Hierdurch steht während der Systole mehr Ca^{2+} im SR für die Freisetzung zur Verfügung, woraus eine erhöhte Kontraktilität resultiert (positive Inotropie).¹¹

Neben der positiv inotropen Wirkung kann auch eine positive Bathmotropie beobachtet werden. Durch die erhöhte $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ werden Ca^{2+} Kanäle in der Plateauphase inaktiviert, sodass es zu einer Verkürzung des Aktionspotentials kommt.⁹² Zudem führt die Hemmung der NKA ebenfalls zu einer Verringerung der $[K^+]_i$ in den Kardiomyozyten, wodurch das Ruhemembranpotential und damit die Leitungsgeschwindigkeit gesenkt wird.¹¹

Bereits geringe therapeutische Dosen an Herzglykosiden genügen um die Sensitivität des Barorezeptorreflexes zu steigern und zentrale Vaguskerne zu erregen. Dies bewirkt eine Erhöhung des parasympathischen Tonus sowie eine Herabsetzung der sympathischen Aktivität. Hierdurch wird die Herzfrequenz gesenkt und die atrioventrikuläre Überleitungszeit verlängert.⁹² Die Verringerung der Herzfrequenz „stellt eine Ökonomisierung der Herzarbeit [...] dar“ und entlastet das Herz. Die verlangsamte Reizweiterleitung wirkt sich positiv auf Vorhofflattern und -flimmern aus. Allerdings kann hierdurch auch die Erregungsausbreitung von den Vorhöfen zu den Ventrikeln gestört werden.¹¹

Digitalisglykoside bewirken auch eine Abnahme der Plasmanoradrenalin- und Reninkonzentration, die ebenfalls auf den verringerten Sympathikustonus zurückzuführen sind. Bereits bei niedrigen Dosen kann eine Verringerung der neurohumoralen Aktivierung beobachtet werden.⁹² Des Weiteren verursachen Herzglykoside ebenso eine Erhöhung des Herzzeitvolumens und eine besseren Entleerung der Herzkammern in der Systole. Letzteres bewirkt, dass die während der Systole verbleibende Restblutmenge in den Herzkammern abnimmt. Es erfolgt ebenso eine Beeinflussung des diastolischen Füllungszustandes. So nimmt die diastolische Füllung durch die Herzglykosid-Therapie zu, wodurch der Blutdruck im venösen System gesenkt werden kann. Die Folge der besseren Herztätigkeit ist eine Reduktion des Sympathikustonus. Letzteres senkt nicht nur die Herzfrequenz, sondern führt auch zu einer Vasodilatation in der Peripherie.¹¹

Zu beachten ist, dass Digitalisglykoside eine geringe therapeutische Breite besitzen. Toxische Effekte und verstärkte Nebenwirkungen treten bereits beim Überschreiten der 1,5 - 3-fachen therapeutischen Dosis auf. Hierzu zählen beispielsweise Kammertachykardie und Bradykardie.¹¹

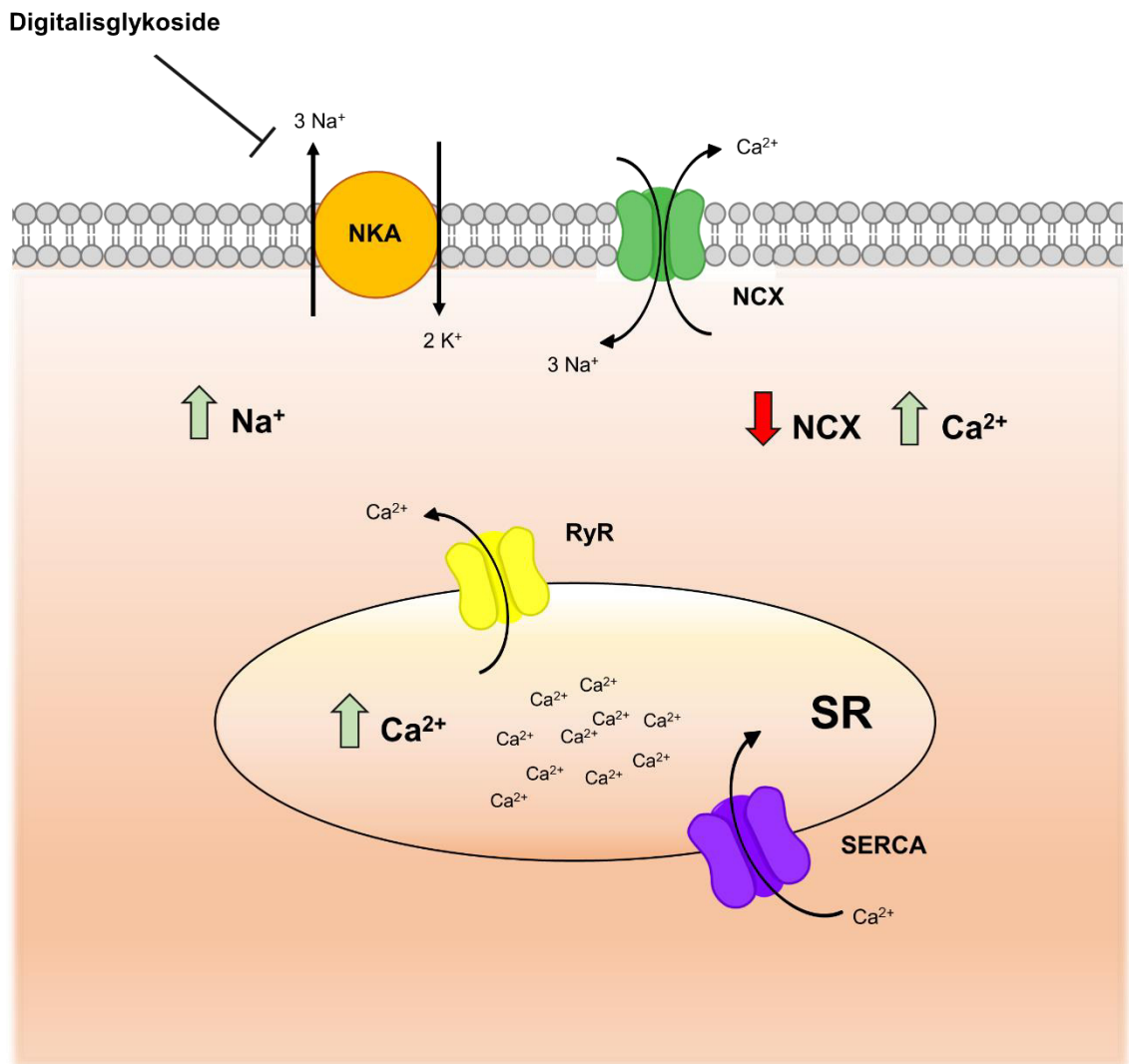


Abbildung 4: Wirkmechanismus der Digitalisglykoside.

Digitalisglykoside hemmen die Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), wodurch die intrazelluläre Na⁺-Konzentration erhöht wird. Dies wiederum hemmt die Aktivität des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCX). Als Folge steigt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration an. In der Diastole wird nun mehr Ca²⁺ durch die sarkoendoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) gepumpt. Die vermehrte Ca²⁺-Konzentration im SR führt letztlich zu einer stärkeren Kontraktion der Kardiomyozyten in der Systole.

RyR: Ryanodin-Rezeptor

Trotz des langjährigen Einsatzes der Digitalisglykoside und der Kenntnisse über deren Pharmakodynamik ist ihr Nutzen für den Patienten immer noch unklar. Die Studienlage hierzu ist, was die Mortalität und Hospitalisierung betrifft, immer noch widersprüchlich. So sprechen manche Studien von einer erhöhten bzw. gesenkten Mortalität, wohingegen andere wiederum keinerlei Effekte feststellen können. Die Digitalis Investigation Group beispielsweise zeigte, dass Digoxin zwar in Patienten mit einer Herzinsuffizienz nicht die Mortalität senkte, dafür aber die Hospitalisierungsrate. Dies betraf sowohl die

Gesamthospitalisierung als auch die Hospitalisierung aufgrund einer verschlechterten Herzinsuffizienz. Die Gesamthospitalisierungsrate betrug 64,3 % in der Digoxin Kohorte und 67,1 % in der Placebogruppe. 34,7% der Placebo-behandelten Patienten mussten aufgrund einer verschlechterten Herzinsuffizienz stationär behandelt werden, wohingegen die Hospitalisierungsrate in der Digoxin Kohorte lediglich 26,8 % betrug.⁹³ Anders verhält es sich in einer Post-hoc Analyse der Digitalis Investigation Group Studie von *Ahmed et al.* Diese stellten einen Zusammenhang zwischen Sterblichkeit bzw. Krankenhausaufenthalt und Serum-Digoxin-Konzentration (SDK) fest. Hierbei wurde zwischen einer niedrigen (SDK 0,5 - 0,9 ng/ml) und einer hohen SDK (SDK \geq 1,0 ng/ml) unterschieden. Eine niedrige SDK reduzierte die Mortalität sowie die Gesamthospitalisierung und Herzinsuffizienz-assoziierte Hospitalisierung. Bei einer hohen SDK konnte hingegen lediglich eine verminderte Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz beobachtet werden.⁹⁴ Noch komplizierter verhält es sich bei Analysen von Patientensubgruppen. In einer prospektiven multizentrischen Studie erhöhte eine Herzglykosidtherapie die Mortalität in MI-Patienten. So besaßen MI-Patienten, die Digitalisglykoside erhielten, ein 2,3-fach erhöhtes Risiko unmittelbar zu versterben.⁹⁵ *Coiro et al.* stellten lediglich eine Mortalitätserhöhung in einer speziellen Patientensubgruppe fest: MI-Überlebende, die an einer Herzinsuffizienz und / oder linksventrikulären systolischen Dysfunktion litten und kein Vorhofflimmern aufwiesen. In dieser Patientenkohorte war eine höhere Gesamtmortalität und ein erhöhtes Risiko für den plötzlichen Herztod nachweisbar. Litten die Patienten hingegen noch zusätzlich an Vorhofflimmern konnte dies nicht beobachtet werden. So kam es unter Digitalis-Behandlung lediglich zu einer Erhöhung des kombinierten Endpunktes „kardiovaskulär-assoziierte Mortalität oder Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz“. Ähnlich verhielt es sich bei der Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienzverschlechterung. Im Patientenkollektiv ohne Vorhofflimmern stieg das Risiko hierfür mit einer Digitalisbehandlung an, wohingegen bei Vorliegen von Vorhofflimmern ein neutraler Effekt beobachtet wurde.⁹⁶ Neben den unterschiedlichen Outcome bei verschiedenen zugrundeliegenden Erkrankungssubgruppen konnte auch ein geschlechtsspezifischer Effekt für Digoxin nachgewiesen werden. So führten *Rathore et al.* eine post-hoc Subgruppen-Analyse der Digitalis Investigation Group Studie durch, um festzustellen ob etwaige geschlechtsspezifische Unterschiede existieren. So erhöhte eine Digoxin-Therapie die Gesamtmortalität in Frauen, aber nicht in Männern. Ebenso nahm das Risiko für diese Patientengruppe zu an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben. Dies konnte in Digoxin-behandelten Männern nicht beobachtet werden. Gleichzeitig verringerte eine Digoxin-Behandlung in Männern

das Sterberisiko aufgrund einer Herzinsuffizienzverschlechterung. Dieser protektive Effekt konnte bei Frauen hingegen nicht nachgewiesen werden.⁹⁷

Die unklare Studienlage über den Nutzen der Digitalisglykoside wirft letztlich die Frage nach der Sinnhaftigkeit einer Inhibition der NKA auf. Trotz des jahrzehntelangen Einsatzes herrscht immer noch kein klarer Konsens darüber, ob eine Reduktion der Mortalität oder Hospitalisierung durch eine Digitalis-Therapie erzielt werden kann. Die beobachtete geringere NKA Aktivität und Expression im Rahmen einer Herzinsuffizienz (s. 1.9.2) verstärkt noch einmal diese Fragestellung. Den zahlreichen Benefits, wie einer erhöhten Kontraktilität und einer verlangsamten atrioventrikulären Überleitung, steht auch das Risiko arrhythmischer Ereignisse und eine geringe therapeutische Breite gegenüber. Folglich besteht noch immer Forschungsbedarf was den Nutzen einer NKA-Inhibition sowie den Einsatz von Digitalisglykosiden betrifft.

1.10 Ziele und Fragestellungen

Aufgrund der Schwere dieser Erkrankung, sowie der widersprüchlichen Studienlage in Hinblick auf den Nutzen einer NKA-Inhibition, soll in dieser Arbeit untersucht werden, welche Auswirkungen eine Aktivierung der NKA- α 2 im insuffizienten Herzen mit sich bringt. Es soll hierbei eine genauere Untersuchung der Na^+ - und Ca^{2+} - Homöostase erfolgen, um pathomechanistische Zusammenhänge besser verstehen zu können. Der Einsatz verschiedener Modelle soll dabei helfen die Folgen einer erhöhten NKA- α 2 Expression im pathologischen Kontext nachzuvollziehen zu können. Echokardiographische Untersuchungen sollen Aufschluss über funktionale und strukturelle Veränderungen des Herzens geben. Gravimetrische Techniken sollen hingegen helfen hypertrophe Prozesse zu ermitteln. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf das β -adrenerge System des Herzens gelegt, welchem eine besondere Rolle im Rahmen der maladapiven Prozesse zukommt. Das Ziel dieser Untersuchungen ist ein besseres Verständnis über die NKA zu erhalten und ggf. eine Antwort auf die Kernfrage zu geben, ob eine Inhibition oder Aktivierung der NKA eine bessere Therapieoption für Herzinsuffizienz-Patienten darstellt.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien bzw. Reagenzien mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien bzw. Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure (HEPES Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure (HEPES Pufferlösung 1 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamidmix: 30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
AnalaR Normapur Xylene, mixtures of isomers (Xylol)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin Lösung (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Buprenorphin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Carbo-free™ Blocking Solution (10x Concentrate)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Coffein	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Set dNTPs (jedes 25 μmol)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt, $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fura-2 Acetoxymethyl-Ester (Fura-2, AM)	Life technologies, Eugene, USA
Gibco™ Fötale Kälberserum (FCS) Herkunftsland: New Zealand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GelGreen™ in Wasser (10000x)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Gibco™ Medium 199 + GlutaMAX™ (Medium 199)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gramicidin from <i>Bacillus</i> <i>aneurolyticus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Heparin	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Hämatoxyllin, sauer nach Mayer	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Immobilon Forte Western HRP substrate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma-Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Deutschland
Isoprenalin HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Laminin (Maus, natürlich)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times$ $6 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MEDITE PURE™ Paraffin, polymerfrei	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumgluconat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid – Lösung (2 mol/l) (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyde 32 %	Science Services, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml Penicillin/10 mg/ml Streptomycin)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set IV	Merck, Darmstadt, Deutschland
PhosphoBLOCKER™ Blocking Reagent	Cell Biolabs Inc., San Diego, USA
Pikro-Siriusrot-Lösung	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Probenecid	Life technologies, Eugene, USA
Protease Inhibitor Cocktail tablets (complete Mini)	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein A Agarose-Beads	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Re-Blot Plus Strong Solution (10 x)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (2 mol/l) (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl esters (SBFI-AM)	Life technologies, Eugene, USA
Strophanthidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Taurin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

2.2 Enzyme

In Tabelle 4 sind die in den Versuchen verwendeten Enzyme mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Tabelle 4: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Liberase TH®	Roche, Mannheim, Deutschland
MangoTaq™ DNA Polymerase	Bioline London, Vereinigtes Königreich
Taq DNA-Polymerase E	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Tabelle 5 enthält die verwendeten Primärantikörper mit der eingesetzten Verdünnung, der jeweiligen Spezies, und dem Molekulargewicht. Zudem gibt die Tabelle noch Auskunft über die Abkürzung des verwendeten Primärantikörpers sowie den jeweiligen Hersteller.

Tabelle 5: Primärantikörper

Bezeichnung	Abkürzung	Spezies	Verdünnung	Molekulargewicht [kDa]	Hersteller
β1-adrenergic receptor	β1-AR	K	1:1000	50	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
β2-adrenergic receptor	β2-AR	K	1:1000	46	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	M	1:1000	37	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α2	NKA-α2	K	1:4000	100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

M= Maus, K= Kaninchen

Alle Primärantikörper wurden für Western Blot Analysen verwendet. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden der β 1-AR und die NKA- α 2 angewendet. Die Antikörper wurden mit in 1 % (m/V) Blotting Grade Blocker in TBS-T verdünnt.

2.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6 enthält die verwendeten Sekundärantikörper mit der jeweiligen Spezies, der angewendeten Verdünnung sowie den Hersteller. Die Sekundärantikörper wurden für die Detektion der Western Blots verwendet.

Tabelle 6: Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Spezies	Vedünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG HRPO	Schaf	1:3000	GE Healthcare, München, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG HRPO	Esel	1:3000	GE Healthcare, München, Deutschland

Bei den Sekundärantikörpern kam 1 % (m/V) Blotting Grade Blocker in TBS-T als Lösungsmittel zum Einsatz.

2.3.3 IgG-Antikörper

Für die IP wurden Kaninchen IgG-B der Firma Santa Cruz Biotechnology mit Sitz in Heidelberg verwendet. Diese wurden im Rahmen des Pre-Clearings und als Kontrollen verwendet

2.4 Primer

Tabelle 7 enthält die für die Genotypisierung verwendeten Primer. Es werden zudem die Sequenz und der Hersteller aufgeführt.

Tabelle 7: Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Hersteller
α 2 NKA rv	TTGGGAGGCCAAGGTGGGTA	Eurofins Genomic, Ebersberg
α 2 NKA fw	ACAGCTATGGACAAGAGTGGACC	Eurofins Genomic, Ebersberg

2.5 Puffer und Lösungen

Base Solution

25 mM NaOH, 200 nM EDTA in dH₂O; pH 12

Blocking-Puffer

5 % (m/V) Blotting Grade Blocker in TBS-T

Bradford-Reagenz

Bio-Rad Protein Assay 1:4 in dH₂O

Coffein-Lösung

10 mM Coffein in Normaltyrode 1

FCCP-Kalibrierlösung

5 µM in in Normaltyrode 2

Fura Stock

1mM Fura in DMSO

Isoprenalin-Lösung 1

1 µM Isoprenalin in Normaltyrode 1

Isoprenalin-Lösung 2

30 nM Isoprenalin, 300 nM Ascorbinsäure) in Normaltyrode 2

Lösung A (145 mM Na⁺)

115 mM Natriumgluconat, 30 mM NaCl, 10 mM Hepes, 2 mM EGTA, in dH₂O, pH 7,2

Lösung B (145 mM K⁺)

115 mM Kaliumgluconat, 30 mM KCl, 10 mM Hepes, 2 mM EGTA, in dH₂O, pH 7,2

Lysepuffer für Gesamtprotein

150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 1 % Triton X-1000, 5 mM DTT, 1 x Proteaseinhibitorcocktail, 1x Phosphataseinhibitorcocktail II, 1 x Phosphataseinhibitorcocktail IV

Natriumcyanid-Kalibrierlösung

4 mM Natriumcyanid in Normaltyrode 2

Na⁺-Kalibrierlösung 0mM

Lösung B, 10 µM Gramicidin, 100 µM Strophanthidin

Na⁺-Kalibrierlösung 10mM

7 % Lösung A, 93 % Lösung B, 10 µM Gramicidin, 100 µM Strophanthidin

Na⁺-Kalibrierlösung 20mM

13,8 % Lösung A, 86,2 % Lösung B, 10 µM Gramicidin, 100 µM Strophanthidin

Neutralization Solution

40 mM Tris-HCl in dH₂O; pH 5

Normaltyrode 1

140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂ x 7 H₂O, 5 mM Hepes Natriumsalz, 10 mM Glucose; 1 mM CaCl₂ in dH₂O; pH 7.4

Normaltyrode 2

130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes Natriumsalz, 2 mM Natriumpyruvat, 0,3 mM Ascorbinsäure, 10 mM Glucose, 1mM CaCl₂ in dH₂O; pH 7,4

Perfusionspuffer

113,01 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 0,6 mM KH₂PO₄, 0,6 mM Na₂HPO₄, 1,22 mM MgSO₄ x 7H₂O, 0,032 mM Phenolrot, 12,02 mM NaHCO₃, 10 mM KHCO₃, 10 mM HEPES Pufferlösung, 5,5 mM Glucose, 30 mM Taurine, 10 mM BDM

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

Probenecid

250 mM Probenecid in HBSS

SBFI Stock

1 mM SBFI in DMSO

SDS Ladepuffer (2x)

125 mM Tris pH 7,0 + 20 % (V/V) Glycerol + 4 % (V/V) SDS + 0,2 M DTT + 0,04 % (m/V) Bromphenolblau

SDS Ladepuffer (5X)

312,5 mM Tris pH 7,0 + 50 % (V/V) Glycerol + 10% (V/V) SDS + 0,5 M DTT + 0,1 % (m/V) Bromphenolblau

SDS Laufpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % (V/V) SDS

Stop Puffer 1

Perfusionspuffer + 10 % (V/V) FCS, 12,5 µM CaCl₂

Stop Puffer 2

Perfusionspuffer + 5 % (V/V) FCS, 12,5 µM CaCl₂

TBS-T

20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

Transferpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % (V/V) Methanol

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

Verdaupuffer

Perfusionspuffer + 0.08 mg/ml Liberase TH® + 0.14 mg/ml Trypsin

2.6 Medien

Medium

5% FCS (V/V), 1% (V/V) Penicillin / Streptomycin in Medium199

Plating Medium

5 % (V/V) FCS, 10 mM BDM in Minimum Essential Medium Eagle

2.7 Kits

In Tabelle 8 sind alle Kits aufgeführt, die zur Durchführung der Experimente verwendet wurden.

Tabelle 8: Kits

Name	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit 250	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAxcel DNA Fast Analysis Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 enthält die eingesetzten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
7,5% Mini-Protean TGX 50 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels 15 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Any kD Mini-Protean TGX Precast 50 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Biosphere® Filter Tips (10 µl, 100 µl 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Cryotubes; 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cutafix stainless Einmalskalpell	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Deckgläser 22 x 40 mm	VWR, International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Deckgläser Square #1 (25 x 25)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Dispomed® Einmalspritzen TBC	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Durapore™ Medizinisches Pflaster	3 M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Einbettkassetten 40 x 28 x 7 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Einmalkanüle BD Microlane™ 3, 26 G x 3/8"; 0,45 x 10 mm	Becton, Dickinson and Company Limited, Louth, Irland
Einmalkanüle Neobject® 20 G x 1 1/2"; 0,9 x 40 mm	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Einmalkanüle Neobject® 23 G x 1 1/4"; 0,6 x 30 mm	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Einmalkanüle Neobject® 26 G x 7/8"; TW; 0,45 x 23 mm	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland

Material

Bezeichnung	Hersteller
Einmalkanüle Neobject® 27 G x 3/4"; 0,42 x 19 mm	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Gazin® Mullkompresse 10 x 10 cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Gazin® Mullkompresse 10 x 20 cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Gel-Loadertips (1-200 µl)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
ImmEdge-Pen	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
Immobilon®-P Transfermembran, PVDF, 0,45 µM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Marienfeld Superior High Precision Deckgläser 24 x 50 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Menzel-Gläser Super Frost (Objektträger)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Menzel-Gläser Super Frost PLUS(Objektträger)	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Mikrotomklingen Leica DB80LX	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mikrotomklingen Leica DB810LS	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mini Trans-Blot® Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen, 1,8 ml Stehrand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Kryoröhrchen, 1,8 ml rund	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten aus Glas 150 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten, Polyethylen, 3 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
PCR TW 8 Tube Strip 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Perma-Hand™ Seide 5-0	ETHICON, San Lorenzo, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Raucodrape® PRO OP-Abdecksystem	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Tissue homogenizing CKMix (2 ml Gefäße)	Bertin Technologies SAS, Montigny-le- Bretonneux, Frankreich
Tissue Tek® Cryomold® 15 mm x 15 mm x 5mm	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Zellkulturplatten, Cellstar® 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.9 Geräte

Tabelle 10 enthält die verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Tabelle 10: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage ALJ-A	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Analysenwaage ABS	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
CO ₂ Inkubator HERA Cell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CO ₂ Inkubator MIDI 40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Easycell Basic Cardiomyocyte Isolation System (umgebaut)	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Entwässerungsmaschine	Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Deutschland
Fluovac Anesthetic Mask, size 2	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Gelsystem Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Harvard Apparatus Isoflurane Key-Fill Vaporizer	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
IKA™ RCT Basic Heiz- und Magnetrührer	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
IMS Fluosorber Filter Canister	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Keller Steri250 (Glasperlensterilisator)	Fine Science Tool (FST), Heidelberg, Deutschland
Keyence BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence Corporation, Osaka, Japan

Bezeichnung	Hersteller
Kryotom Leica CM 1850	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Lauda Ecoline 003 Staredition E-100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Magnetrührer mit Glaskeramik - Heizplatte Sunlab SU1350	Sustainable Lab Instruments, Mannheim, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette® S-8 20-200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Microplate reader Sunrise™	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Microprocessor pH-Meter pH537	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Mikrotom Leica RM2245	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mikrowelle MS23F301EAS	Samsung, Yateley, UK
Mini-PROTEAN® Tetra, Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-Rotator RS24	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Myocyte and Contractility System	IonOptix Limited, Dublin, Irland
Nikon SMZ645 Stereomikroskop	Nikon, Minato, Japan
Nitrous Oxide Flowmeter, 0.2 to 2.0 l/min for Small Anesthesia Bracket	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Orbi-Blotter™ BT30	Benchmark Scientific, Inc., Edison, USA
PEQlab PCR Cycler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
pH Elektrode ORION STAR A111	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Hudson, USA
Pipetten Research® Plus (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage PLJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Präzisionswaage 440-45 N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Scantainer	Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark
SDS-PAGE Gelkammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Shaker DRS-12	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Small Anesthesia Bracket for 1 to 2 gases	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Thermal Cycler T100™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermal Cycler C1000 Touch TM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer® C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Trockenschrank Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultraschall-Homogenisator mini20	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
VentElite Small Animal Ventilator	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Veterinärnästhesie-Induktionskammer	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Vevo 1100 high-resolution imaging system	FUJIFILM VisualSonics Inc., Totonto, Kanada
Vortexer MS1, mini	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Vortexer MS3, basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Vortexer RS-VA-10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Wasserbad WNE14	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach
Zentrifuge, Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

2.10 Operations- bzw. Präparierbesteck

In Tabelle 11 sind das verwendete Operations- bzw. Präparierbesteck und deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 11: Operations- bzw. Präparierbesteck

Bezeichnung	Hersteller
Dumont #5 Forceps	FST, Heidelberg, Deutschland
Durotip-Präparierschere, gerade	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Fine Scissors, gerade Spitze	FST, Heidelberg, Deutschland
Microschere 120 mm – 4 $\frac{3}{4}$ ′′, spitz-spitz	Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, Deutschland
Nadelhalter Castroviejo, gebogen mit Sperre, 145 mm, 5 $\frac{3}{4}$ ′′	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Splitterpinzette gebogen, 105 mm 4 $\frac{1}{8}$ ′′	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

2.11 Mäuse mit einer kardialen Überexpression der NKA α 2-Isoform

Die Tiere wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jeffrey D. Molkenin (Cincinnati Children's Hospital Medical Center) bereitgestellt. Die Zucht und Haltung erfolgte am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM, Würzburg), die Experimentalhaltung am Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz (DZHI, Würzburg). Die transgenen Mäuse besitzen einen FVB/N Hintergrund und weisen eine herzspezifische Überexpression der NKA- α 2 auf (NKA- α 2 Versuchstiere). Für die Generierung dieser Linie wurde cDNA verwendet, die eine Ouabain-resistente Ratten NKA- α 2 codiert. Die cDNA wurde in einen Vektor kloniert, der den murinen α -Myosin heavy chain (MHC) Promotor enthielt. Dieser wurden anschließend in fertilisierte Eizellen injiziert, um die transgene Linie zu generieren.⁹⁸ WT Mäuse besitzen für gewöhnlich eine Ouabain-resistente NKA- α 1 und eine Ouabain-sensitive NKA- α 2.⁶⁷ In der vorliegenden Linie weisen beide NKA-Isoformen hingegen eine natürliche Resistenz gegenüber dem Digitalisglykosid Ouabain auf.

2.12 Software und Datenbanken

In Tabelle 12 sind verwendete Software und Datenbanken mit dem jeweiligen Hersteller zusammengefasst.

Tabelle 12: Software

Name	Hersteller
Adobe Photoshop Elements 10	Adobe, San José, USA
BZ Image Analysis application	Keyence Corporation, Osaka, Japan
ChemDraw 19.0	PerkinElmer, Waltham, USA
FBI.lab-animal.net	FBI Science GmbH, Mönchengladbach, Deutschland
GraphpadPrism 7	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
IonWizard 6.3	IonOptixLimited, Dublin, Irland
Magellan 7.2 SP1	Tecan Austria GmbH, Gröden, Österreich
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
QIAxcel ScreenGel®	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SigmaPlot 14.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
Vevo Lab	FUJIFILM VisualSonics Inc., Totonto, Kanada

3. METHODEN

3.1 Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR

Für die Genotypisierungen wurden Ohrstanzen verwendet, die bei der Markierung der Tiere gewonnen wurden. Die Probenahme erfolgte durch das ZEMM. Die Ohrstanzen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C gelagert.

3.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Reaktionsgefäße mit den Ohrstanzen wurden kurz abzentrifugiert, sodass sich das Gewebe am Boden befand. Pro Reaktionsgefäß wurden 30 µl Base Solution hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95 °C für 1 h auf einem Thermoblock unter kontinuierlichem Schütteln bei 700-750 RPM verdaut. Alle 10 min wurden die Ohrstanze und der Puffer durch händisches Schütteln wieder auf den Boden des Reaktionsgefäß gebracht, um einen vollständigen Verdau zu garantieren. Anschließend wurde pro Reaktionsgefäß 30 µl Neutralization Solution hinzugegeben.

Später erfolgte eine Optimierung des Aufreinigungsprozesses mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen.

3.1.2 Präparation genomischer DNA unter Zuhilfenahme des DNeasy Blood and Tissue Kits

Für die Präparation wurde eine Ohrstanze verwendet. Die Aufreinigung wurde nach Angaben des Herstellers (Fa. Qiagen) durchgeführt.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.3.1 PCR für die Detektion mittels Agarosegelelektrophorese

Die aufgearbeiteten Proben wurden für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

Es wurden pro Genotypisierung jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine bereits als NKA- α 2 genotypisierte Probe, als Negativkontrollen dienten Ohrstanzen anderer transgener Linien, die ebenfalls einen FVB/N Hintergrund hatten. Als Kontrolle für die erfolgreiche DNA-Präparation wurde ebenfalls die GAPDH amplifiziert. Die Primer wurden 1:10 mit dH₂O verdünnt. Die MangoTaq™ DNA-Polymerase wurde als letztes Reagenz hinzugegeben und während des gesamten Prozesses gekühlt.

Der Ansatz für die Genotypisierung sowie das Temperaturprotokoll können aus Tabelle 13 bzw. 14 entnommen werden.

Tabelle 13: Pipettierschema für die Detektion mittels Agarosegelelektrophorese

	Reagenzien	Volumen [µl]
	Aufgereinigte DNA-Probe	3
MangoTaq™-Polymerase Kit	5x Reaction Buffer Coloured	10
	MgCl ₂ 50 mM	1,5
	MangoTaq™ DNA Polymerase	0,25
	dNTPs 25 mM	2
	Primer fw (1:10)	1
	Primer rev (1:10)	1
	Wasser für Injektionszwecke	31,25

Tabelle 14: Temperaturprotokoll für die Detektion mittels Agarosegelelektrophorese

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	94	6	
2	94	1	Zyklus 2 bis 4 35x wiederholen
3	54	1:20	
4	72	1:45	
5	72	10	
6	4	∞	
Amplifikationsbedingungen			
1 Initiale Denaturierung			
2 Denaturierung			
3 Annealing			
4 Polymerisation/Elongation			
5 Finale Polymerisation			

3.1.3.2 PCR für die Detektion mittels QIAxcel® System

Der Einsatz des QIAxcel® System ermöglicht eine Auswertung der PCR ohne Gelelektrophorese. Für diese Anwendung wurde das PCR Protokoll entsprechend angepasst.

Es wurden hier ebenfalls aufgearbeitete Proben für die PCR verwendet. Allerdings erfolgte die DNA-Gewinnung mittels DNeasy Blood and Tissue Kit. Das modifizierte Pipettierschema und Temperaturprotokoll können aus Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 15: Pipettierschema die Detektion mittels QIAxcel® System

	Reagenzien	Volumen [µl]
	Aufgereinigte DNA-Probe	1
	10x PCR Buffer E	2,5
	Taq DNA Polymerase	0,4
	dNTPs 25 mM	0,5
	Primer fw	0,3
	Primer rev	0,3
	dH ₂ O	20

Tabelle 16: Temperaturprotokoll für die Detektion mittels QIAxcel® System

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	94	5	
2	94	0:30	Zyklus 2 bis 4 35x wiederholen
3	60	1	
4	72	1:20	
5	72	5	
6	4	∞	
Amplifikationsbedingungen			
1 Initiale Denaturierung			
2 Denaturierung			
3 Annealing			
4 Polymerisation/Elongation			
5 Finale Polymerisation			

3.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Es wurde 1 % Agarose in TBE-Puffer gegeben und mit Hilfe eines Mikrowellenherds aufgelöst. Hierbei wurde der Erhitzungsprozess mehrmals unterbrochen, um die Lösung zu schwenken und ein Überlaufen zu verhindern. Dies wurde solange wiederholt bis die Gellösung klar wurde. Für das Gießen eines Gels waren 300 ml Ansatz erforderlich. Es wurden 17,5 µl Gel Green pro 300 ml Gellösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde in eine Gelkammer überführt.

Es wurden 20 µl Probe und 3 µl Größenstandard aufgetragen. Hierbei wurde der GeneRuler 1 kb als Größenstandard verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 mV für 45 min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht am Chemidoc™ Touch Fotodokumentationsgerät.

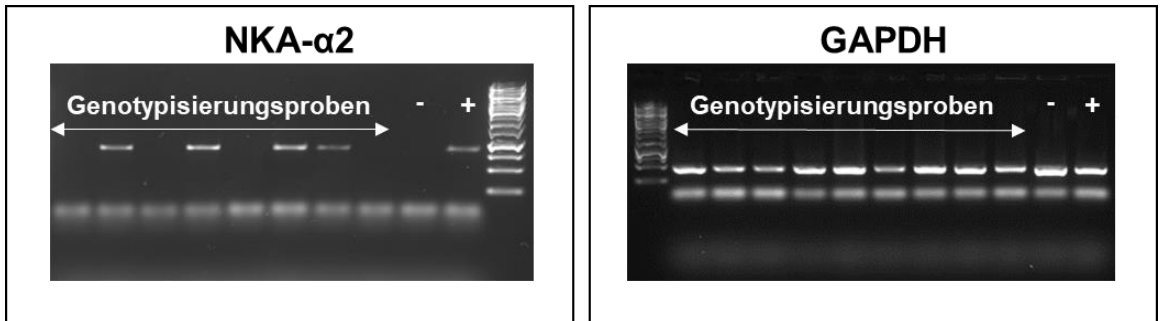


Abbildung 5: Detektion eines Agarosegels nach erfolgter Gelelektrophorese verschiedener Genotypisierungsproben.

Die Detektion der amplifizierten NKA- α 2 DNA bzw. GAPDH DNA erfolgte mittels UV-Licht. Links: Vorhandene Banden zeigen das Vorliegen des NKA- α 2 Überexpressionsgens auf. Diese Tiere sind somit NKA- α 2 transgen. Das Fehlen von Banden bei gleichzeitig intakter GAPDH Detektion tritt bei Wildtyp (WT) Tieren auf. Rechts: Die Detektion der GAPDH dient als Kontrolle für die erfolgreiche DNA-Präparation.

3.1.5 Detektion mit dem QIAxcel® System

Das QIAxcel® System ermöglicht eine automatisierte Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten mittels Multikapillar-Elektrophorese. Hierbei werden die Analyten in einem Gel durch ein elektrisches Feld anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Das Puffer-Tray wurde vorsichtig mit warmem Wasser und einem mildem Detergens gereinigt und schließlich mit dH₂O gespült. Die WP und WI Position des Puffer-Trays wurden mit 8 ml QX DNA Wash Buffer gefüllt. In die BUF Position wurden 18 ml QX DNA Separation Buffer gegeben. Alle drei Positionen des Puffer-Trays wurden mit QX Mineralöl überschichtet, sodass keine Verdunstung stattfinden konnte (2. ml in Position WP und WI; 4 ml in Position BUF). Es wurden 15 μ l des QX Alignment Marker (15 bp/3 kb) und im Anschluss ein Tropfen QX Mineralöl in jedes Gefäß eines 0,2 ml 12er-Gefäßstreifens pipettiert. Der QX Alignment Marker ermöglicht eine Kalibrierung der Migrationszeiten der unterschiedlichen Kapillaren. Hierdurch wird die Varianz in den gemessenen Migrationszeiten mitberücksichtigt. Die Gefäßstreifen wurde in die MARKER1 Position des Puffer-Trays eingesetzt. In jedes Gefäß des QX Colored 0,2 ml 12er-Gefäßstreifens wurden 15 μ l QX Intensity Calibration Marker hinzugegeben. Jedes Gefäß wurde mit einem Tropfen QX Mineralöl überschichtet und an die Position MARKER2 des Puffer-Trays angebracht. Das Puffer-Tray wurde in die Halterung des QIAxcel® Systems platziert. Die Proben (mind. 10 μ l mit einer DNA-Konzentration von 1 ng/10 μ l) wurden ebenfalls in ein 12er-Gefäßstreifen pipettiert, in das Proben-Tray eingesetzt und in die vorgesehene Halteinrichtung gelegt. Für die Analyse wurde die QIAxcel DNA Gelkartusche verwendet. Als Größenstandard wurde der QX DNA Size

Marker 50 bp – 1.5 kb verwendet. Die Proben wurden in die jeweilige Gelkapillare geladen und mit Hilfe des elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software QIAxcel ScreenGel®.

3.2 Chronischer Myokardinfarkt

Im Tiermodell des chronischen MI erfolgt eine Ligatur der linken absteigenden Koronararterie (LAD=Left anterior descending artery), wodurch eine Gewebsschädigung entsteht, die zu einer HFrEF führt. Eine Herzinsuffizienz kann sich schon nach 4 Wochen post MI entwickeln.⁹⁹ Dieses Modell ist geeignet um die Auswirkungen ischämischer Prozesse im Herzen zu untersuchen und entsprechende Zielproteine zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die Operation wurde von Dr. Anahi-Paula Arias-Loza durchgeführt.

Für den Eingriff wurden 11 Wochen alte NKA- $\alpha 2$ und WT Versuchstiere verwendet.

Zu Beginn erfolgte eine intraperitoneale (i.p.) Buprenorphin-Gabe (0,05–0,1mg/kg) und eine kurze Isofluran-Inhalation in einer Vornarkosebox (5 Vol% Isofluran mit O₂). Sobald die Versuchstiere sediert waren, wurden sie intubiert und mit einem Beatmungsgerät mit Isofluranzufuhr beatmet (1,5 vol% Isofluran und 0,5 l O₂/min). Die Tiere wurden während des gesamten Eingriffs auf einer Wärmeplatte gelagert. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Bepanthen® Augen- und Nasensalbe appliziert. Unter Vollnarkose erfolgte schließlich die Thorakotomie und Ligatur der linken Koronararterie. Das Bindegewebe wurde durchtrennt, um Platz zu schaffen zwischen Pektoral- und Serratus-Muskel. Hierbei ist zu beachten, dass die Muskelfasern nicht verletzt werden. Es erfolgte eine Inzision in den Interkostal-Muskel. Um das Herz gut sichtbar zu machen, wurde ohne Verletzung der Rippen ein Gewebespanner platziert. Die Ligatur wurde um die linke Koronararterie gelegt und verschlossen. Die Gewebespanner wurden anschließend entfernt und der Interkostalraum wurde mit einer Naht verschlossen. Die Muskeln wurden an ihre ursprüngliche Position gelegt und ebenfalls durch eine Naht fixiert. Es erfolgte ein Wundverschluss der Haut mit anschließender Extubation. Die Operation der Sham-Tiere erfolgte analog, allerdings wurde keine Ligatur der Koronararterie vorgenommen. Als Endpunkt wurden 3 bzw. 8 Wochen post-MI festgelegt. Für die vollständige Wundheilung und Ausbildung der Infarkt Narbe sind 3 Wochen erforderlich. Hierbei können die funktionalen und strukturellen Veränderungen im Anfangsstadium einer ischämisch-bedingten Herzinsuffizienz zwischen den verschiedenen Genotypen ermittelt werden. Nach 8 Wochen ist der kardiale Remodeling-Prozess bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, in dem eine chronische

Aktivierung der Adaptionsmechanismen vorliegt. Somit können etwaige unterschiedliche Reaktionen der beiden Genotypen auf die Adaptionsmechanismen identifiziert werden. Das Gewebe lässt sich nach einem Myokardinfarkt in drei Kategorien klassifizieren: gesundes Myokard, Borderzone und Infarkt. Im gesunden Myokard ist nur im geringen Maße Kollagen zu finden. Die Borderzone bildet den Übergang zwischen gesundem und infarziertem Gewebe. Charakteristisch hierfür ist die vermehrte Kollageneinlagerung in Verbindung mit zahlreichen überlebenden Kardiomyozyten. Sie stellt eine Mischform zwischen gesundem Gewebe und Infarkt dar. Der Infarkt besteht fast ausschließlich aus Bindegewebe. Überlebende Kardiomyozyten können nur noch vereinzelt vorgefunden werden. Eine exemplarische Darstellung der jeweiligen Bereiche nach einer HE- bzw. PSR-Färbung ist in Abbildung 6 zu sehen.

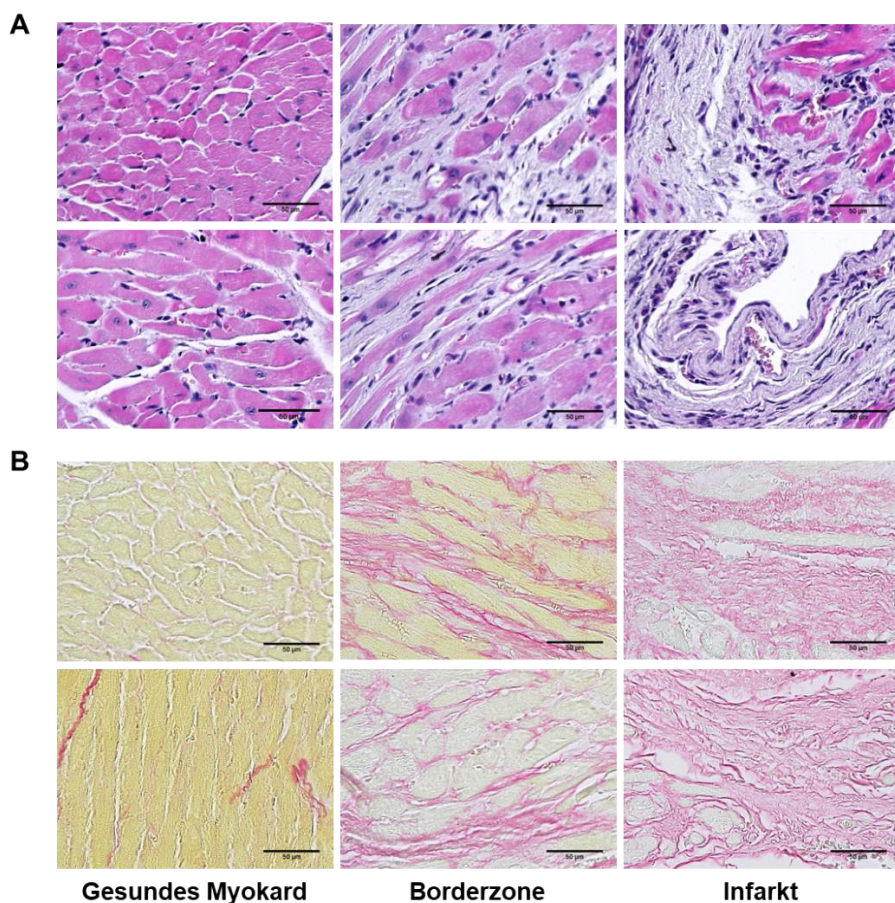


Abbildung 6: Klassifizierung der unterschiedlichen Bereiche im einem infarziertem murinen Herzgewebeschnitt.

Exemplarische Darstellung der durch chronische Ischämie entstandenen Bereiche im murinen Myokard. Es wird hierbei zwischen gesundem Myokard, Borderzone und Infarkt unterschieden. Zu sehen sind die unterschiedlichen Gewebebereiche nach einer (A) Hämatoxylin-Eosin (HE)- bzw. (B) Pikro-Siriusrot (PSR)-Färbung. Das Cytoplasma ist in lila (HE) bzw. gelb (PSR) und das Kollagen in weiß (HE) bzw. rot (PSR) dargestellt. In der HE-Färbung sind die Zellkerne noch zusätzlich blau angefärbt. Die Balken entsprechen 50 µm.

3.3 Euthanasie und Gewebeentnahme

Zunächst wurden die Mäuse mittels Genickbruch abgetötet und gewogen. Es wurde eine Thorakotomie durchgeführt. Die Bauchorta wurde durchtrennt und das Blut mit Hilfe einer Tbc-Spritze aufgesogen. Das Aufziehen der Spritze soll hierbei langsam erfolgen, um das Auftreten einer Hämolyse zu verringern. Ebenso sollen keine Organe eingesaugt werden. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zum Ende der Organentnahme auf Eis gelagert, sodass eine Koagulation stattfinden konnte. Anschließend wurde das Blut bei 2000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pellet wurde verworfen.

Die Lunge und das Herz wurden vorsichtig entnommen und in einer mit PBS gefüllten Wägeschale auf Eis gelagert. Beide Gewebe wurden freipräpariert und durch kontinuierliches Tunken in PBS feucht gehalten. Vor jedem Wiegen wurde das Gewebe durch Abtupfen an Zellstofftüchern abgetrocknet. Es wurden das Herzgewicht und das Nassgewicht der Lunge bestimmt. Die Wägeschalen, welche die Lungen enthielten, wurden mit einer Aluminiumfolie verdeckt und für mindestens 24 h bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Anschließend wurde das Trockengewicht der Lunge bestimmt. Nach Entfernung der Atrien wurde das ventrikuläre Gewicht ermittelt. Das Herz wurde wieder in PBS überführt und wie in Abbildung 7 dargestellt in drei Teile geteilt: Apex, mittlerer Teil und Basis. Der mittlere Teil enthält die Ligatur der linken absteigenden Koronararterie.

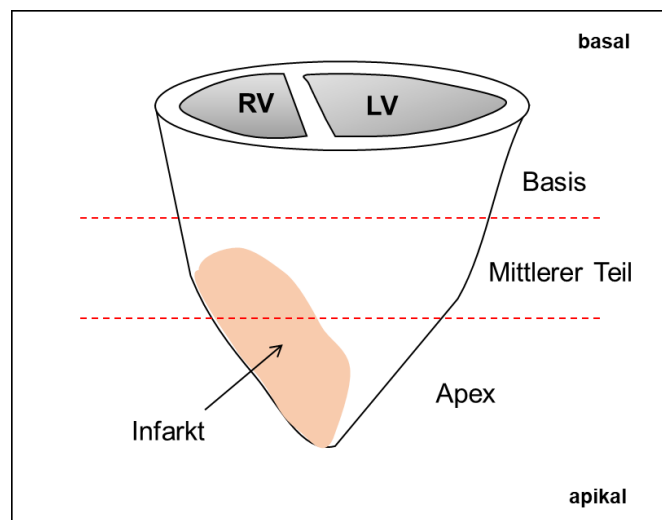


Abbildung 7: Darstellung des präparierten Herzens nach erfolgter Organentnahme.

Die Atrien wurden entfernt und die Ventrikel in drei Teile geteilt: Apex, mittlerer Teil und Basis. Der mittlere Teil wurde für histologische Untersuchungen verwendet. Die Basis und der Apex dienten hingegen, nach Entfernung des rechten Ventrikels, für Western Blot Analysen.

Das infarzierte Gewebe des Apex wurde, falls vorhanden, vom gesunden Myokard entfernt. Beides wurde in zwei separaten Kryoröhrchen mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der mittlere Teil wurde für 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelagert. Nach Ablauf wurde das Gewebe in eine mit 1 M KCl gefüllten Wägeschale überführt. Durch Schwenken wurde das Gewebe von überschüssigem PFA befreit und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt, welches ebenfalls 1 M KCl enthielt. Dort wurde es bis zur Entwässerung gelagert.

Die Basis wurde ebenfalls in linker und rechter Ventrikel aufgeteilt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der basale Bereich sowie der nicht-infarzierte Apex wurden für Western Blot Analysen verwendet. Der mittlere Teil diente für histologische Untersuchungen.

3.4 Gravimetrische Untersuchungen

Da schwerer und größere Tiere ein höheres Organgewicht aufweisen können, wurden die ermittelten Werte auf das Gesamtgewicht des Tieres bezogen. Hierdurch wird eine gewichts- und größenunabhängige Vergleichbarkeit der einzelnen Proben erzielt.

3.5 Echokardiographische Untersuchungen

Die Echokardiographischen Untersuchungen wurden 3 bzw. 8 Wochen post MI von Sandra Umbenhauer und Dr. Anahi-Paula Arias-Loza durchgeführt.

Zunächst wurde die Narkose in einer Einleitungsbox mit 4 – 5 Vol% Isofluran-O₂-Gasgemisch bis zur vollständigen Sedierung eingeleitet. Die weitere Anästhesie wurde über eine Maske mit 2 Vol% Isofluran mit zusätzlicher O₂-Beatmung fortgesetzt. Es wurde ein Kontaktgel auf den Elektroden des Echokardiographie-Tisches angebracht. Die Pfoten der Versuchstiere wurden auf den Elektroden mit Hilfe von chirurgischem Klebeband befestigt. Der Oberkörper zeigte dabei nach oben. Für die Temperaturüberwachung wurde eine Analsonde rektal eingeführt. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Bepanthen® Augen- und Nasensalbe auf die Augen appliziert. Der Echokardiographie-Tisch ermöglicht eine genaue Kontrolle sowohl der Körpertemperatur als auch der Herzfrequenz. Eine automatische Temperaturregulation ermöglicht es die Körpertemperatur des Versuchstieres konstant zu halten. Die Herzfrequenz ist notwendig für die Feinabstimmung der Narkose. Während der Messung sollte die Herzfrequenz zwischen 450 – 600 bpm liegen. Die Tiere wurden für die Untersuchung rasiert. Auf dem Thorax wurde ein Sonographie-Gel aufgetragen. Die Echokardiographie erfolgte nicht-invasiv bei einer Ultraschallfrequenz von 15 – 55 MHz. Das Fractional Shortening (FS) und der Enddiastolischer Diameter (EDD) wurden im

M-Mode gemessen. Der EDD wurde verwendet, um eine etwaige Dilatation nachzuweisen. Das FS wurde für die Charakterisierung der Herzfunktion herangezogen und ermöglichte die Identifizierung einer systolischen Dysfunktion. Es stellt ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens dar und wird aus systolischen und diastolischen Diameter berechnet. Die Messdauer betrug zwischen 20 und 45 min je Tier. Die Messungen erfolgten auf Höhe des Apex bzw. Papillarmuskels.

3.6 Histologie

3.6.1 Paraffinschnitte

3.6.1.1 Fixierung

Die Fixierung ist erforderlich, um das Gewebe vor Zersetzungs- und Fäulnisprozessen zu schützen. Gleichzeitig wird die Morphologie und Struktur der Präparate weitestgehend konserviert und eröffnet somit zahlreiche Untersuchungsmöglichkeiten. Formaldehyd gehört zu der Stoffklasse der Aldehyde und ist ein Elektrophil, welches durch zahlreiche Nucleophile angegriffen werden kann. Zudem ist Formaldehyd an der inter- und intramolekularen Vernetzung verschiedener Moleküle beteiligt.¹⁰⁰

In verdünnten wässrigen Lösungen (< 4% Formaldehyd) ist kein bzw. kaum freies Formaldehyd vorhanden. Es liegt hier als Methandiol vor.¹⁰¹ Das Methandiol weist die gleiche chemische Reaktivität wie das Formaldehyd auf und reagiert in wässriger Lösung mit weiteren Methandiol-Molekülen zu Polymeren. Formalin enthält 37 - 40 % Formaldehyd und 60 - 63 % Wasser. Der größte Teil des Formaldehyds liegt hier als niedermolekulares Polymer vor. Formaldehyd ist in der Lage Gewebe schnell zu durchdringen. Dennoch nehmen die chemischen Reaktionen, insbesondere die Quervernetzung, längere Zeit in Anspruch.¹⁰²

Die Fixierung erfolgte, wie in 3.3 beschrieben, für 24 h in 4 %-igem PFA. Anschließend wurde das Gewebe bis zur Entwässerung in 1 M KCl gelagert.

3.6.1.2 Entwässerung des Gewebes im Entwässerungsautomaten

Für die Einbettung des Gewebes wird Paraffin verwendet. Da dies allerdings nicht wasserlöslich ist, ist eine Entwässerung des Gewebes erforderlich. Dies geschieht über eine aufsteigende Alkoholreihe. Letztere beginnt mit hydrophileren Lösungsmitteln, wie beispielsweise Ethanol (EtOH), und nimmt in ihrer Lipophilie zu. Hierdurch wird schrittweise das Wasser, sowie das polare EtOH durch unpolare Lösungsmittel wie dem Xylol verdrängt, bis schließlich das Gewebe eine ausreichende Lipophilie aufweist, um in Paraffin eingebettet werden zu können.

Die Entwässerung erfolgt im Entwässerungsautomaten und dauert 16,5 h. Sie lief nach dem in Tabelle 17 aufgeführtem Schema ab.

Tabelle 17: Die für die Entwässerung im Entwässerungsautomaten verwendeten Lösungsmittel sowie die entsprechende Verweildauer des Gewebes

Lösungsmittel	Dauer [h]
70 % EtOH	1
90 % EtOH	1
99 % EtOH	1
99 % EtOH	1
99 % EtOH	1
Xylol/EtOH (1:1)	1
Xylol 100 %	1,5
Xylol 100 %	1,5
Xylol/Paraffin (1:1)	1
Paraffin 100 %	1,5
Paraffin 100 %	3

Nach der Entwässerung kann schließlich die Einbettung in Paraffin erfolgen. Dies sollte möglichst zügig nach Beendigung des Prozesses stattfinden und ist in 3.6.1.3 beschrieben.

3.6.1.3 Einbettung

Um sicherzustellen, dass das Paraffin im Bedarfsfall flüssig vorliegt, wurde es bei ca. 65 °C im Trockenschrank gelagert. Für die Einbettung wurden Metallschälchen und Einbettkassetten verwendet. Die Metallschälchen wurden auf einer Heizplatte vorgewärmt, um ein sofortiges stellenweises Erstarren des Paraffins zu verhindern. Das Metallschälchen wurde zunächst erst zu einem Drittel mit Paraffin gefüllt. Das Herzgewebe wurde vorsichtig auf die Paraffinschicht gelegt. Hierbei zeigte die apikale Seite in Richtung Metallschälchen (s. Abbildung 8). Das Metallschälchen wurde schließlich mit weiterem Paraffin gefüllt, bis das Gewebe vollständig umhüllt war. Anschließend wurde die Einbettkassette vorsichtig auf das Metallschälchen gelegt und zum Aushärten über Nacht auf einer ebenen Fläche gelagert.

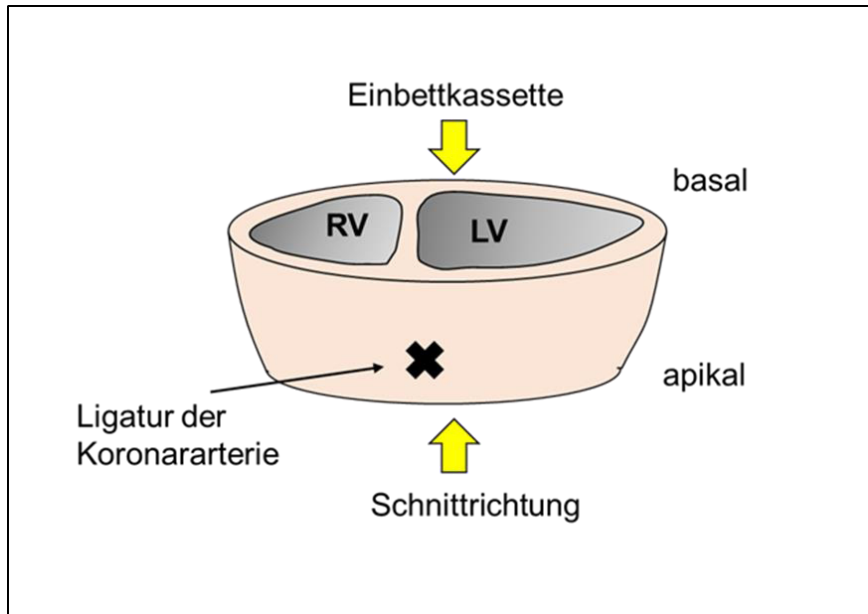


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Gewebeeinbettung in Paraffin.

Die basale Seite zeigte in Richtung der Einbettkassette, sodass die Anfertigung der Gewebeschnitte an der apikalen Seite begonnen und von apikal nach basal fortgeführt wurde. Die Einbettung erfolgte auf diese Weise, da sich das infarzierte Gewebe hauptsächlich entlang des Apex ausbreitet. Im Bereich der Basis ist hingegen kaum Infarkt anzutreffen. So kann eine möglichst genaue und vergleichbare Infarktgrößenbestimmung erzielt werden.

3.6.1.4 Anfertigung der Gewebeschnitte am Mikrotom

Die Anfertigung der Schnitte erfolgte an einem Mikrotom von Leica, Modell RM2245. Die Schnittdicke betrug 7 μm . Die Einbettkassetten wurden in das Mikrotom eingespannt und das Gewebe wurde durch langsames und gleichmäßiges Betätigen des Handrades geschnitten. Die so erhaltenen Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig in eine mit dH_2O gefüllte Küvette überführt und mit einem Objektträger aufgenommen. Je Objektträger wurden zwei Paraffinschnitte platziert. Sobald sich der zweite Schnitt auf dem Objektträger befand wurden die Schnitte mit der glänzenden Seite nach unten in ein Wasserbad (42 °C) zum Aufschwimmen überführt. Hierbei soll sich der Schnitt wieder auf die ursprüngliche Länge ausdehnen. Sobald dies erfolgte, wurden die Schnitte wieder mit dem Objektträger aufgenommen. Diese wurden anschließend bei Raumtemperatur auf einem Zellstofftuch getrocknet. Größere Tropfen wurden mit einem Zellstofftuch vorsichtig entfernt.

3.6.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

3.6.2.1 Durchführung der Färbung

Für die Pikro-Siriusrot (PSR)-Färbung wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt. Diese wurden für mindestens 2 h im Trockenschrank bei 65 °C getrocknet. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (s. Tabelle 18) entparaffiniert. Dies erfolgte indem die Schnitte in einen Schlitten überführt und für 5 min in eine Küvette mit dem entsprechenden Lösungsmittel gestellt wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 bis 3 Mal in dH₂O eingetaucht. Die Färbung erfolgte in einer PSR-Lösung für 20 min. Anschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (s. Tabelle 19).

Tabelle 18: Absteigende Alkoholreihe

Lösungsmittel	Zeit
Roti®-Histol	5 min
Roti®-Histol	5 min
Xylol	5 min
Xylol/EtOH 1:1	5 min
EtOH 100 %	5 min
EtOH 75 %	5 min
EtOH 50 %	5 min

Tabelle 19: Aufsteigende Alkoholreihe

Lösungsmittel	Zeit
dH ₂ O	2-3x Eintauchen
dH ₂ O	2-3x Eintauchen
dH ₂ O	2-3x Eintauchen
EtOH 50 %	2 min
EtOH 75 %	2 min
EtOH 100 %	2 min
Xylol/EtOH 1:1	5 min
Xylol	5 min
Roti®-Histol	5 min
Roti®-Histol	5 min

Nach der Entwässerung wurden die Schnitte mit einer Pinzette aus dem Roti®-Histol genommen und mit einem Zellstofftuch abgetrocknet und von überschüssigem Lösungsmittel befreit. Die Schnitte wurden hierbei nicht berührt. Pro Schnitt wurde ein Tropfen Entellan aufgetragen. Das Deckglas wurde schräg über dem Objektträger angesetzt und langsam abgelassen. Die Einbettung sollte möglichst luftblasenfrei erfolgen. Störende Luftblasen wurden durch vorsichtiges Verschieben oder Drücken des Deckglases entfernt. Die eingebetteten Schnitte wurden über Nacht in einer Objektträgermappe unter dem Abzug getrocknet.

Die Aufnahme der histologischen Bilder erfolgte am Keyence BZ-8000 Fluoreszenz-Mikroskop mit 4-facher und 20-facher Vergrößerung. Die Bilder mit 4-facher

Vergrößerung wurden mit Hilfe des Programms BZ Image Analysis application zu einer vollständigen Übersichtsaufnahme zusammengefügt und für die Ermittlung der Infarktgröße verwendet.

3.6.2.2 Ermittlung der Infarktgröße

Es wurden 4-15 Gewebeschnitte gefärbt und am Keyence BZ-8000 Fluoreszenz-Mikroskop mikroskopiert. Die Anzahl der Schnitte richtete sich hierbei nach Umfang des vorhandenen Gewebes, der Schwankungsbreite der ermittelten Infarkte, der Schnittqualität sowie den funktionalen Daten aus den echokardiographischen Messungen. Durch Abgleich mit den funktionalen Parametern aus den echokardiographischen Untersuchungen wurde ausgeschlossen, dass Infarkte aufgrund einer falschen Einbettung (basale Seite in Schnittrichtung) nicht identifiziert bzw. falsch ausgemessen wurden. Bei echokardiographischen Daten, die eindeutig auf eine funktionale Beeinträchtigung des Myokards hinwiesen und gleichzeitig nicht vorhandenen bzw. sehr geringen Infarkten, wurden Schnitte aus tieferen Ebenen des Gewebes verwendet und erneut analysiert. Widersprüche zwischen funktionalen Parametern und Infarktgrößen waren in der Regel auf Fehler in der Einbettung zurückzuführen. Im Falle einer Messung konnten aufgrund einer geringen Probemenge lediglich 4 Schnitte ausgemessen werden. In diesem Fall wurde die ermittelte Infarktgröße mit der kardialen Funktion abgeglichen. Da hier kein Widerspruch bestand, wurde die Messung ebenfalls mitberücksichtigt.

Bei Gewebe aus früheren Operationen, die nachträglich quantifiziert werden mussten, wurden 2-6 Schnitte ausgewertet, da die Probemenge nicht ausreichend war.

Die Infarktgröße wurde mit Hilfe von ImageJ bestimmt. Es wurde der endokardiale bzw. epikardiale Umfang des infarzierten (rot) bzw. gesunden linken Ventrikels (gelb) in mm ausgemessen (s. Abbildung 9). Als infarziert gilt ein Bereich sobald der Infarkt endo- bzw. epikardial auftritt. Infarzierte Bereiche, die nicht bis zu den äußeren bzw. inneren Schichten vorgedrungen waren, wurden nicht als Infarkt gewertet. Wenn ein Infarkt durch gesundes Gewebe unterbrochen wurde, wurde die Unterbrechung ebenfalls als infarziert klassifiziert. Dies tritt v.a. in basal liegenden Schichten auf, die im späteren Schneideprozess am Mikrotom abgetragen werden. Schnitte aus apikalen Bereichen des mittleren Ringes wiesen in der Regel keine bzw. kaum Unterbrechungen auf. Wenn apikalere Bereiche von Schnitten betrachtet wurden, die Unterbrechungen im infarzierten Gewebe auswiesen, konnte häufig ein vollständiges Fehlen von gesundem Myokard innerhalb des Infarktes festgestellt werden.

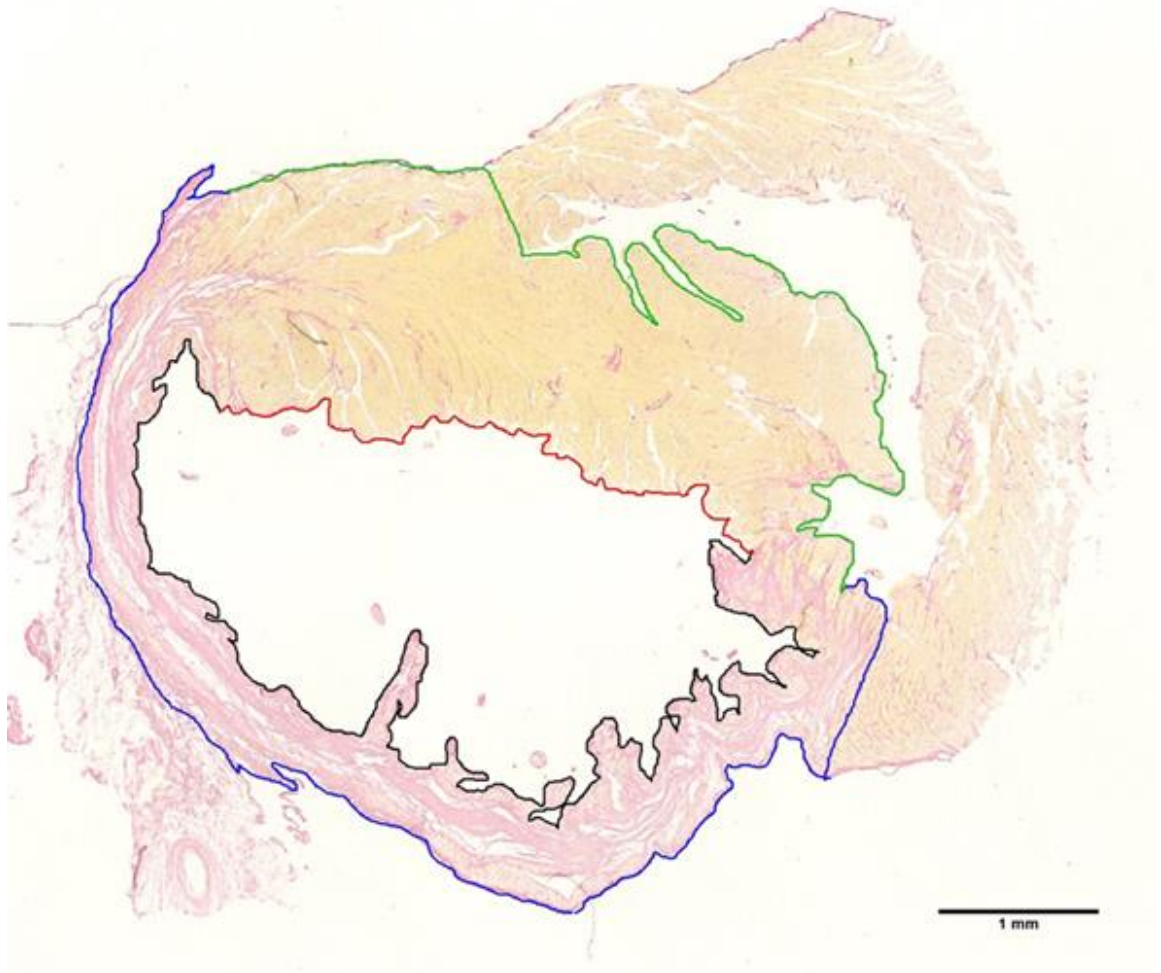


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines infarzierten Herzgewebes, das mittels Picro-Siriusrot (PSR)-Technik angefärbt wurde.

Der histologische Schnitt wurde mit einer 4x Vergrößerung mikroskopiert. Die erhaltenen Bilder wurden zu einer Übersichtsaufnahme zusammengesetzt. Für die Infarktgrößenermittlung wurden der Umfang des endokardialen und epikardialen Infarktareals sowie die gesunden Areale ausgemessen. Der Umfang der infarzierten Bereiche wurden mit dem entsprechenden Gesamtumfang des Endo- bzw. Epikards ins Verhältnis gesetzt. Schließlich wurde durch Bildung des Mittelwerts aus dem prozentualen Anteil des epikardialen Infarktes und prozentualen Anteil des endokardialen Infarktes die durchschnittliche Infarktgröße ermittelt. Grün: gesundes Epikard, blau: infarziertes Epikard, rot: gesundes Endokard, schwarz: infarziertes Endokard

Die durchschnittliche Infarktgröße wurde rechnerisch unter Zuhilfenahme der nachfolgenden Formeln berechnet:

Formel 1: Rechnerische Bestimmung des prozentualen Anteils des infarzierten Endokards am Gesamtendokard

$$\text{Infarziertes Endokard [\%]} = \frac{\text{Infarktareal Endokard [mm]}}{\text{Infarktareal Endokard [mm]} + \text{gesundes Gewebe Endokard [mm]}} \times 100$$

Formel 2: Rechnerische Ermittlung des prozentualen Anteils des infarzierten Epikards am Gesamtepi kard

$$\text{Infarziertes Epikard [\%]} = \frac{\text{Infarktareal Epikard [mm]}}{\text{Infarktareal Epikard [mm]} + \text{gesundes Gewebe Epikard [mm]}} \times 100$$

Formel 3: Bestimmung der durchschnittlichen prozentualen Infarktgröße durch Mittelwertbildung

$$\text{Durschnittliche Infarktgröße [\%]} = \frac{\text{Infarziertes Endokard [\%]} + \text{Infarziertes Epikard [\%]}}{2}$$

3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 7 µm verwendet. Die Paraffinschnitte wurden in einen Schlitten gesetzt und für mindestens 2 Stunden im Trockenschrank bei 65 °C getrocknet. Es erfolgte eine Entparaffinierung über eine absteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 20). Dies erfolgte indem die Schnitte in einen Schlitten überführt und für 5 min in eine Küvette mit dem entsprechenden Lösungsmittel gestellt wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 bis 3 Mal in dH₂O eingetaucht.

Tabelle 20. Absteigende Alkoholreihe

Lösungsmittel	Zeit
Roti®-Histol	5 min
Roti®-Histol	5 min
Xylol	5 min
Xylol/EtOH 1:1	5 min
EtOH 100 %	5 min
EtOH 75 %	5 min
EtOH 50 %	5 min

Tabelle 21: Färbung

Lösungsmittel	Zeit
Hämalaun	10 min
Einbläuen mit Leitungswasser	10 min
dH ₂ O	2x Eintauchen
Eosin 0,2 %	12 min
dH ₂ O	2x Eintauchen
dH ₂ O	2x Eintauchen
EtOH 100 %	2x Eintauchen
EtOH 100 %	2x Eintauchen
EtOH 100 %	2x Eintauchen
Xylol/EtOH 1:1	5 min
Xylol	5 min
Roti®-Histol	5 min
Roti®-Histol	5 min

Die Schnitte wurden für 10 min in Hämalaun inkubiert. Die Schnitte wurden in eine frische Küvette überführt, die wiederum in eine mit Leitungswasser gefüllte Schale gestellt wurde. Dann erfolgte das 10-minütige Einbläuen. Hierbei wurde sichergestellt, dass der Schale kontinuierlich frisches Leitungswasser zugeführt wurde. Durch zweimaliges Eintauchen in dH₂O wurden die Schnitte von überschüssigem Leitungswasser befreit. Die Schnitte wurden mit einer 0,2 %-igen Eosin-Lösung für 12 min gefärbt. Anschließend wurden sie jeweils zweimal in zwei unterschiedliche Küvetten getaucht, die dH₂O enthielten. Danach erfolgte ebenfalls ein zweimaliges Eintauchen in drei unterschiedliche EtOH 100 % Küvetten. Die Schnitte wurden für jeweils 5 min zunächst in ein Xylol-EtOH-Gemisch, dann in Xylol und abschließend in 2 unterschiedliche Roti®-Histol Küvetten gegeben (s. Tabelle 21). Die Objektträger wurden mit Hilfe einer Pinzette aus dem Roti®-Histol entnommen. Mit einem Zellstofftuch wurden die Objektträger abgetupft und vom überschüssigen Lösungsmittel befreit. Hierbei durften die Schnitte allerdings nicht berührt werden. Es wurden pro Schnitt ein Tropfen Entellan auf den Objektträger getropft. Das Deckglas wurde schräg angesetzt und vorsichtig auf den Objektträger abgerollt. Hierbei sollten möglichst keine Luftblasen eingeschlossen werden. Störende Luftblasen wurden durch vorsichtiges Verschieben und Drücken des Deckglases entfernt. Die eingebetteten Schnitte wurden über Nacht in einer Objektträgermappe unter dem Abzug getrocknet.

Die Aufnahme der histologischen Bilder erfolgte am Keyence BZ-8000 Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. Hierbei wurde eine 4-fache und 20-fache Vergrößerung verwendet. Die Bilder, die mit einer 4-fachen Vergrößerung aufgenommen wurden, wurden mit Hilfe des Programms BZ Image Analysis application zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt.

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Herstellung der Gesamtproteinlysate

Ein Teil des Herzgewebes wurde in ein Reaktionsgefäß mit Keramik Beads (Tissue Homogenizing Mixed Bead Kit) überführt. Pro Reaktionsgefäß wurden 500 µl Lysepuffer hinzugegeben. Die Proben wurden mit Hilfe des Precellys® 24 Homogenisators in 2 Zyklen bei 4 °C und 1817 g (5000 RPM) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenisate 2 Mal für 10 sec mit Ultraschall bei 4 °C behandelt. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 15113 g (13000 RPM) und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben.

3.7.2 Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration der Herz-Lysate wurde durch einen Bradford-Assay bestimmt. Dies ist notwendig, um später eine gleiche Beladung der Gele und damit Vergleichbarkeit der Proben zu erzielen. Für die Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz verwendet. Es enthält eine saure Lösung des Farbstoffes Coomassie® Brilliant Blue G-250. Bei Bindung eines Proteins verschiebt sich: das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Coomassie® blau bindet dabei hauptsächlich an basischen und aromatischen Aminosäureresten, wie beispielsweise Arginin.

Zu Beginn wurden die Proben mit Wasser für Injektionszwecke so verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich des Photometers (0,0 bis 2,0) erfolgte. Es wurde ein BSA-Standard mit den Konzentrationen 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5mg/ml und 0,9 mg/ml verwendet. 10 µl der verdünnten Probe bzw. des Standards wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und es wurden 200 µl Bradford-Reagenz pro Well hinzugegeben. Die Lösung wurde möglichst luftblasenfrei durchmischt und 5 min inkubiert. Vorhandene Luftblasen wurden entfernt, da es hierdurch zu einer Beeinträchtigung der Messung kommen kann. Sowohl bei den Proben als auch beim BSA-Standard wurden Duplikate pipettiert. Es erfolgte eine Messung der Absorption im Absorptionsmaximum von 595 nm. Durch die BSA-Standardreihe wurde eine Kalibriergerade erstellt mit deren Hilfe man die jeweilige Proteinkonzentration extrapolieren konnte.

3.7.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Je nach Proteingröße variierte der Anteil an Polyacrylamid im Trenngel. Für Proteine mit einem Molekulargewicht < 50 kDa wurde ein Gel mit 15% Polyacrylamid-Gehalt verwendet. Für Proteine mit einem Molekulargewicht > 50 kDa betrug der Polyacrylamid-Anteil 8%.

Für die MI-Experimente wurden 8 bzw. 15% Gele verwendet, für die Immunpräzipitation hingegen kommerziell erworbene Gele der Firma BioRad. Es wurde zunächst das Trenngel in der benötigten Polyacrylamid-Konzentration gegossen und mit 70 % igem Isopropanol beschichtet. Sobald die Polymerisation abgeschlossen war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde ein Kamm eingesetzt, um die Probestaschen zu bilden. Die Zusammensetzung der jeweiligen Gele befinden sich in Tabelle 22 und Tabelle 23.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Sammelgels

Zusammensetzung 1 ml Sammelgel (5 % Acrylamid)	
30 % Acrylamid	0,17 ml
Tris 1,0 M (pH 6,8)	0,13 ml
10 % SDS	0,01 ml
10 % APS	0,01 ml
TEMED	0,001 ml
dH ₂ O	0,68 ml

Tabelle 23: Zusammensetzung von Trenngelen mit unterschiedlichem Acrylamid-Anteil

Zusammensetzung 5 ml Trenngel (8 bzw 15 % Acrylamid)			
8 % Acrylamid		15 % Acrylamid	
30 % Acrylamidlösung	1,3 ml	30 % Acrylamidlösung	2,5 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,3 ml	Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,3 ml
10 % SDS	0,05 ml	10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml	10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,003 ml	TEMED	0,002 ml
dH ₂ O	2,3 ml	dH ₂ O	1,2 ml

Für die SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse wurden 20 – 30 µg Protein verwendet. Zunächst wurden die Proteinlysaten mit SDS Ladepuffer (5x) versetzt und in die Geltaschen überführt. Anschließend wurde die Gelelektrophorese gestartet. Um die Proteingrößen später bestimmen zu können, wurde ebenfalls 10 µl Größenstandard

aufgetragen. Es wurde ein SDS Laufpuffer verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst für 20 min bei 80 V damit sich die Proteine im Gel ordnen und sammeln konnten. Im Anschluss wurde die Gelelektrophorese bis zur vollständigen Auftrennung der Proteine bei 130 V fortgeführt. Im Anschluss erfolgte der Proteintransfer mittels Wetblot-Verfahren.

3.7.4 Western Blot

Um einen Nachweis der Proteine zu ermöglichen, wurden diese nach erfolgter SDS-PAGE auf eine Trägermembran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert. Zunächst wurde die Membran für 1 min mit Methanol aktiviert. Danach wurde sie für 2 min in dH₂O gelegt und anschließend bis zur Verwendung in Transferpuffer gelagert. Die Schwämme und das Whatman-Filterpapier wurden bis zum Transfer in Transferpuffer eingeweicht. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 4 °C für 2 h. Um eine unspezifische Bindung der Primär- und Sekundärantikörper und einen damit einhergehenden hohen Hintergrund vorzubeugen, wurde die Trägermembran für 1 h in Blocking-Puffer inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einen Schüttler. Die eingesetzten Verdünnungen der Primärantikörper können aus 2.3.1 entnommen werden. Nach dreimaligem Waschen auf einem Schüttler mit TBS-T für je 10 min, wurde der horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (1:3000) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend wurde die Trägermembran erneut dreimal mit TBS-T für 10 min gewaschen. Zur Entwicklung wurde Amersham ECL Western Blotting Analysis System (1:1 Verhältnis beider Substrate) bzw. Immobilon Forte Western HRP substrate verwendet. Die Detektion erfolgte am Chemidoc™ Touch Fotodokumentationsgerät mittels Chemilumineszenz.

3.7.5 Co-Immunpräzipitation

Die Co-IP ermöglicht es Protein-Interaktionen nachzuweisen. Hierbei wird ein Protein zusammen mit seinem Interaktionspartner durch einen Antikörper präzipitiert und kann anschließend mit Hilfe eines Western Blots detektiert werden.

Für die Co-IP wurden Lysate mit einer Gesamtproteinmenge von 1000 µg und einem Volumen von 400 µl eingesetzt. Für den Ansatz wurde ein Lysepuffer ohne Phosphataseinhibitorcocktail verwendet. Zu Beginn wurden 1 µg Kaninchen IgG in jede Probe gegeben. Die Spezies des IgG richtet sich hierbei nach dem Antikörper, der für die Präzipitation verwendet wird. Die Proben wurden 1 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Je Reaktionsgefäß wurden 20 µl Protein A Agarose-Beads hinzugegeben und es

erfolgte ein erneutes Über-Kopfschütteln für 1 h bei 4°C. Die Proben wurden im Anschluss für 5 min bei 358 g (2000 RPM) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, das Pellet mit den unspezifischen Proteinbindungen hingegen verworfen. Dieser Vorgang wird als Pre-Clearing bezeichnet und beugt einer unspezifischen Antikörperbindung und einem hohen Hintergrundsignal vor. In die zu analysierenden Proben (3 WT, 3 NKA- α 2) wurden 2 μ l des Antikörpers gegen den β 1-AR hinzugegeben. Die Kontrollen (Input) wurden mit demselben Volumen an Kaninchen-IgG behandelt. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 4 °C erneut über Kopf geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 30 μ l Protein A Agarose-Beads je Analyt hinzugegeben und diese wurden für 2 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 358 g (2000 RPM) und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit einem Lysepuffer, der weder Protease- noch Phosphataseinhibitoren enthielt, drei Mal gewaschen. Hierfür wurden zunächst 500 μ l des entsprechenden Lysepuffers hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Es wurde erneut bei 358 g (2000 RPM) und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde während des Waschvorgangs jedes Mal verworfen. Zu jeder Probe wurden 30 μ l SDS Ladepuffer (2x) auf das Pellet pipettiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 95 °C für 2 min inkubiert und für weitere 2 min auf Eis zum Abkühlen gestellt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 385 g (2000 RPM) und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für eine Western Blot Analyse verwendet.

3.7.6 Strippen der Membran

Beim Strippen werden die Antikörper von der Trägermembran entfernt, sodass die Zugabe eines anderen Antikörpers und damit die Detektion eines weiteren Proteins ermöglicht wird.

Die Reblot-Strong Solution 10x wurde 1:10 in dH₂O verdünnt. Der Western Blot wurde unter Schütteln für 40 min in dieser Lösung inkubiert. Es erfolgte ein viermaliges Waschen mit TBS-T für 10 min auf einem Schüttler. Anschließend wurde ein neuer Primärantikörper zugegeben und wie in 3.7.4 beschrieben fortgefahren.

3.8 Isolation adulter Kardiomyozyten

Der Maus wurden zunächst eine Lösung aus Buprenorphin (2,4 µg) und Heparin (20 i.U.) ca. 20 min vor der Isolation i.p. verabreicht. Danach wurde das Versuchstier mit 5 Vol% Isofluran-O₂-Gemisch in einer Narkosebox vorsiediert und anschließend über eine Maske mit 2 Vol% Isofluran mit O₂ weiterbeatmet. Es erfolgte eine Thorakotomie und eine vorsichtige Entnahme des Herzens. Das Herz wurde freipräpariert und über die Aorta ascendens auf einer Kanüle befestigt. Die Kanüle wurde schließlich an der Langendorff-Apparatur angebracht und retrograd, d.h. über die Koronararterien, 4 min mit Perfusionspuffer durchspült, um vorhandene Blutreste zu entfernen. Gleichzeitig dient dieser Schritt der Entfernung von Ca²⁺, wodurch eine weitere Kontraktion des Herzens verhindert wird. Der durch den Perfusionspuffer entstehende hydrostatische Druck schließt die Aortenklappe, sodass der Puffer über die Koronargefäße ausweicht und das Herz hierüber durchspült. Danach erfolgte ein vollständiger enzymatischer Verdau mittels Liberasepuffer. Bei ausreichendem Verdau wurde das Herz klarer und quoll auf. Dies benötigte in der Regel zwischen 6 bis 10 min. Im Anschluss wurden die Ventrikel von den Atrien entfernt und in eine mit Perfusionspuffer gefüllte Petrischale überführt. Das Herz wurde sternenförmig aufgeschnitten und in eine weitere Schale mit 5 ml Perfusionspuffer gelegt. Es wurden 5 ml Stop Puffer 1 hinzugegeben, um den enzymatischen Verdau zu beenden. Dies ist erforderlich, da ansonsten die Zellmembran angegriffen wird und es hierdurch zum Zelltod kommen kann. Das aufgeschnittene Herz wurde vorsichtig für 5 min in der Lösung geschwenkt, damit sich der Zellverband lösen konnte. Anschließend wurde das restliche Gewebe entfernt und die Zellsuspension wurde in ein frisches 15 ml Röhrchen zum Sedimentieren überführt. Die Sedimentation benötigte 5 – 10 min. Der Überstand wurde verworfen und durch 10 ml Stop Puffer 2 ersetzt. Die Zellsuspension wurde für den Ca²⁺-Aufbau vorsichtig in eine Petrischale überführt. Anschließend erfolgte ein schrittweiser Ca²⁺-Aufbau mit einer 10 mM und einer 100 mM CaCl₂-Lösung nach folgendem Schema:

- 50 µl 10 mM CaCl₂-Lösung (finale Konzentration: 0,0625 mM)
- 50 µl 10 mM CaCl₂-Lösung (finale Konzentration: 0,1125 mM)
- 100 µl 10mM CaCl₂-Lösung (finale Konzentration: 0,2125 mM)
- 30 µl 100 mM CaCl₂-Lösung (finale Konzentration: 0,5125 mM)
- 50 µl 100 mM CaCl₂-Lösung (finale Konzentration: 1,0125 mM)

Alle 4 min wurde eine neue CaCl₂-Lösung in die Zellsuspension gegeben und die Petrischale vorsichtig geschwenkt. Zum Schluss wurde die Lösung erneut in ein 15 ml

Röhrchen gegeben und 5 – 10 min sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde erneut verworfen und je nach Experiment durch vorgewärmtes Medium (NADH/FAD-Messungen) oder Plating Medium (Na^+ und Ca^{2+} - Messungen) ersetzt.

3.9 Intrazelluläre Calcium-Messungen

Die Ca^{2+} -Messungen der MI-behandelten Versuchstiere wurden von PD Dr. Petra Eder-Negrin durchgeführt.

Bei Fura-2 AM handelt es sich um einen ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff, der eine Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch eine Chelat-Komplexbildung ermöglicht. In der Ca^{2+} -freien Form liegt sein Anregungsmaximum bei 380 nm. Eine Bindung von Ca^{2+} führt zu einem hypsochromen Effekt. Das Anregungsmaximum wird hierbei in den kurzwelligeren Bereich verschoben und liegt nun bei 340 nm. Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei 340 nm bzw. 380 nm und anschließender Bildung der Ratio aus der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm (F_{340}/F_{380}) kann auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geschlossen werden. Das Emissionsmaximum (E_m) liegt bei 510 nm (Abbildung 10). Während der intrazellulären Ca^{2+} -Messungen wurde der Farbstoff alternierend mit 340 nm und 380 nm angeregt. Es wurde die entsprechende Emission bei 510 nm gemessen. Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]$ erhöht die Emission durch Anregung bei einer Wellenlänge von 340 nm. Gleichzeitig treten nur geringe Veränderungen der Emission bei Anregung durch 380 nm auf. Daraus resultiert ein Anstieg des F_{340}/F_{380} Verhältnisses.

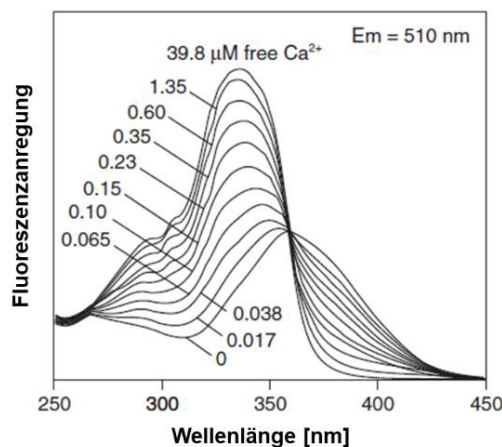


Abbildung 10: Anregungsspektrum von Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2 AM) in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]$.

In der Ca^{2+} -freien Form liegt das Anregungsmaximum bei 380 nm. Eine Ca^{2+} -Bindung führt zu einer Verschiebung des Anregungsmaximums auf 340 nm. Dies wird als hypsochromer Effekt bezeichnet. Das Verhältnis zwischen der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und der Fluoreszenzintensität bei 380 nm (F_{340}/F_{380}) erlaubt einen Rückschluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Modifiziert nach Produktinformation ThermoFisher Scientific*¹⁰³

Fura-2 AM enthält eine Acetoxymethylgruppe, welche die Lipophilie und damit die Membranpermeabilität des Farbstoffes erhöht. In der Zelle kann die endständige Ester-Gruppe schließlich durch unspezifische Esterasen hydrolysiert werden, wodurch es zu einer Erhöhung der Hydrophilie kommt. Dies wiederum bewirkt, dass die Substanz nur noch in verminderten Ausmaß aus der Zelle austreten kann. Hierdurch akkumuliert der Farbstoff letztlich in der Zelle und bildet einen Chelat-Komplex mit Ca^{2+} (s. Abbildung 11).

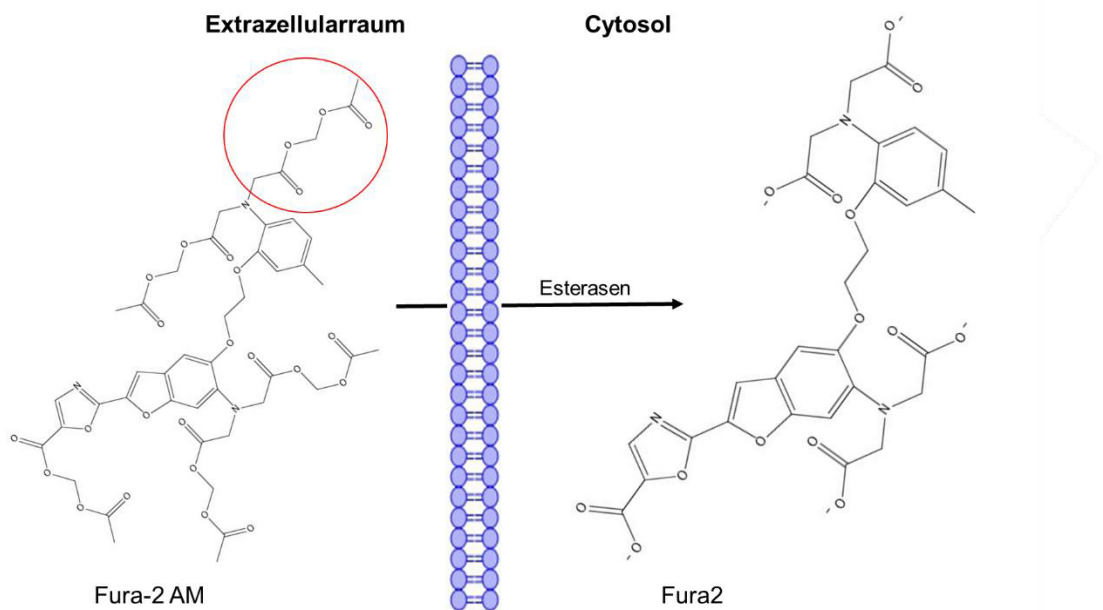


Abbildung 11: Umsetzung von Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2 AM) zu Fura-2 durch unspezifische Esterasen innerhalb der Zelle.

Die Acetoxymethylgruppe (eine Gruppe ist exemplarisch in Rot umrandet) von Fura-2 AM erhöht die Lipophilie und damit die Membrangängigkeit der Substanz. Sobald Fura-2 AM die Zellmembran passiert hat können die Ester der Acetoxymethylgruppen von unspezifischen Esterasen umgesetzt werden. Fura-2 wird schließlich freigesetzt und akkumuliert in der Zelle.

Die Kardiomyozyten wurden wie in 3.8 beschrieben isoliert.

Nach dem letzten Schritt des Ca^{2+} -Aufbaus wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt und bis zur Sedimentation stehengelassen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es wurden 2 ml Plating Medium auf das Pellet gegeben. 4 μl Fura-2 AM und 4 μl Probenecid wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß gemischt und anschließend in die Zellsuspension pipettiert (Endkonzentration Fura-2 AM: 2 μM , Endkonzentration Probenecid: 0,5 mM). Das 15 ml Röhrchen wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um den Fluoreszenzfarbstoff vor Licht zu schützen. Es erfolgte eine 13-minütige Inkubation der Zellen auf dem Schüttler. Die Zellsuspension wurde im

Anschluss 5 min zum Sedimentieren stehengelassen. Der Überstand wurde verworfen und durch 5 ml Normaltyrode 1 ersetzt. Die Kardiomyozyten wurden auf ein unbeschichtetes Plättchen pipettiert und 5 min adhären gelassen. Die Messung erfolgte an der Ionoptix der AG Eder-Negrin bei Raumtemperatur und 0,5 Hz in Normaltyrode 1. Um die β -adrenerge Ansprechbarkeit zu prüfen, wurden die Kardiomyozyten nach einer Messperiode in Normaltyrode 1 bei stabilen Numerator noch zusätzlich mit Isoprenalin-Lösung 1 stimuliert. Für die Bestimmung der sarkoplasmatischen $[Ca^{2+}]$ sowie der Geschwindigkeit des NCX- und SERA-vermittelten Ca^{2+} -Efflux während der Diastole wurde die Stimulation mit Normaltyrode 1 und 0,5 Hz für 10 sec unterbrochen und anschließend eine Coffein-Lösung zugegeben.

3.10 Intrazelluläre Natrium-Messungen

Sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxy-methylesters (SBFI AM) ist ein ratiometrischer Fluoreszenzfarbstoff, der wie Fura-2 AM, Acetoxymethylester-Gruppen enthält (Abbildung 12). Diese Gruppen werden ebenfalls durch Esterasen analog dem in 3.9 beschriebenen Reaktionsprinzips umgesetzt. Hierbei entsteht aus dem SBFI AM das SBFI.

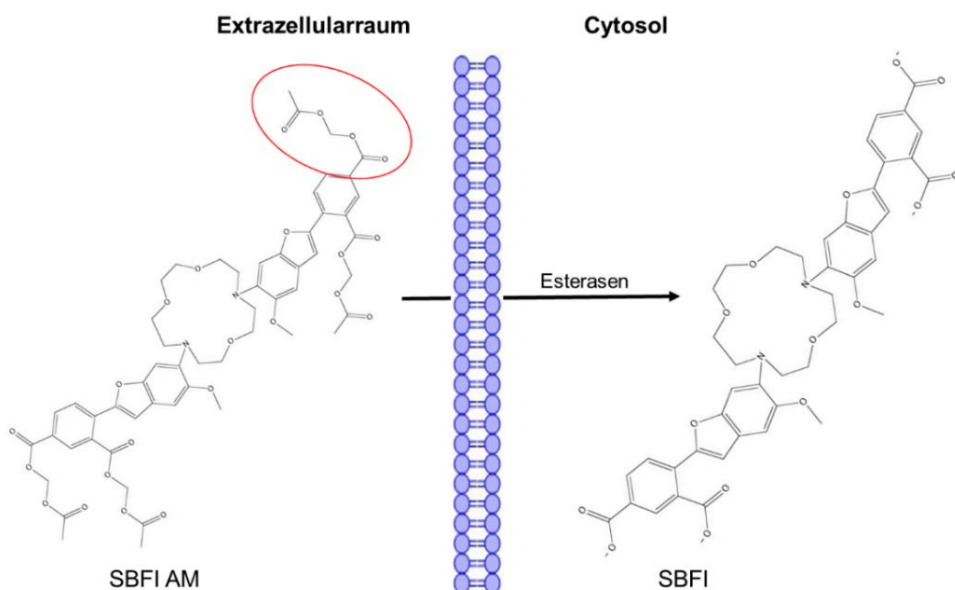


Abbildung 12 Umwandlung von Sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxy-methylesters (SBFI AM) zu SBFI durch unspezifische Esterasen im Cytosol.

Durch die Acetoxymethylgruppe (eine Gruppe ist exemplarisch in Rot umrandet) von SBFI AM wird die Lipophilie und damit Membrangängigkeit der Substanz erhöht. Sobald SBFI AM die Zellmembran passiert hat, können die Ester der Acetoxymethylgruppen von unspezifischen Esterasen, die sich im Cytosol befinden, umgesetzt werden.

SBFI bildet mit den cytosolischen Na^+ -Ionen Chelatkomplexe aus. Die Na^+ -Bindung bewirkt eine Verschiebung des Anregungsmaximums in Richtung kürzerer Wellenlängen. Zudem verschmälert die Bindung von Na^+ den Peak des Anregungsmaximums. Der isosbestische Punkt, also die Wellenlänge bei der das Fluoreszenzsignal unabhängig von der $[\text{Na}^+]$ konstant bleibt, liegt bei ca. 360 nm. Gemessen wurde jeweils die Emission bei 505 nm, die durch die unterschiedlichen Anregungswellenlängen erzeugt wurde. Während der Messung wurde der Farbstoff alternierend bei 340 nm und 380 nm angeregt und die F_{340}/F_{380} bestimmt. Eine Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ führt bei Anregung durch 340 nm zu einem Anstieg der Emissionsintensität, wohingegen die Emission bei der Anregungswellenlänge von 380 nm kaum von der $[\text{Na}^+]$ beeinflusst wird (Abbildung 13). Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der F_{340}/F_{380} .

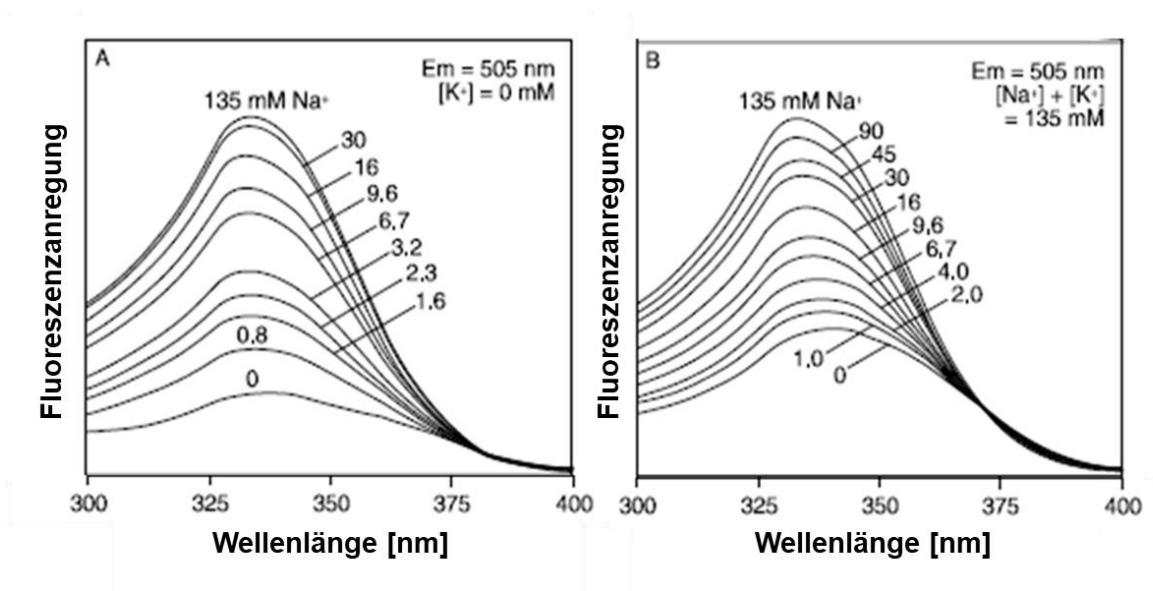


Abbildung 13: Anregungsspektrum des ratiometrischen Farbstoffes Sodium binding benzofuran isophthalate acetoxy-methylesters (SBFI AM) in Abhängigkeit der $[\text{Na}^+]$

Anregungsspektrum bei Verwendung einer A reinen 135 mM Na^+ -Lösung und B einer Lösung aus Na^+ und K^+ , die einer Konzentration von 135 mM entspricht. (modifiziert nach ThermoFisher Produktinformation¹⁰⁴)

Die Kardiomyozyten wurden wie in 3.8 beschrieben isoliert.

Die Deckgläser wurden zunächst mit einem Fettstift (ImmEdge-Pen) umrandet, mit Laminin beschichtet und an der Luft getrocknet. Die isolierten adulten Kardiomyozyten wurden auf die beschichteten Deckgläser ausgesät und für 15 min zum Absetzen im Inkubator ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) gelagert. Die Zellen wurden für 90 min mit $10 \text{ } \mu\text{M}$ SBFI AM und 2 mM Probenecid inkubiert.

Es wurde die basale $[\text{Na}^+]_i$, sowie die Na^+ -Spiegel nach elektrischer Stimulation bei $0,5 \text{ Hz}$ in Normaltyrode 1 und elektrische Stimulation bei $0,5 \text{ Hz}$ mit zusätzlicher

β -adrenerger Aktivierung durch Isoprenalin (Isoprenalin-Lösung 1) gemessen. Die Messung erfolgte an der Ionoptix der AG Eder-Negrin. Da sich die Zellen der WT und NKA- α 2 Versuchstiere nur sehr schwierig isolieren ließen und diese Zellen zudem besonders empfindlich auf den Isolationsprozess reagierten, wurden die Stimulationszeiten an den Allgemeinzustand der Zellen angepasst. Nach jeder Messung wurde mit einer 0,10 und 20 mM Na⁺-Kalibrierlösung kalibriert. Mit der erhaltenen Ratio aus F₃₄₀/F₃₈₀ wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe die [Na⁺]_i extrapoliert wurde.

3.11 NADH/FAD-Messungen zur Ermittlung des mitochondrialen Redoxstatus

Die ATP Synthese findet in den Mitochondrien statt.⁵⁶ Als Ausgangstoff für den Zellstoffwechsel dient hier hauptsächlich Glucose, die mit Hilfe der Glycolyse, des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung zur ATP Gewinnung genutzt wird. Zuerst wird Glucose im Rahmen der Glycolyse in Pyruvat umgewandelt. Bereits hier findet die Gewinnung geringer Mengen an ATP statt. Das Pyruvat wird zu Acetyl-CoA oxidiert und schließlich in den Citratzyklus eingeschleust, wo es über verschiedene Intermediate zu CO₂ oxidiert wird. Während dieser Prozesse werden die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂, sowie geringe Mengen an ATP gebildet. Auf der Inneren Mitochondrienmembran (IMM) befinden sich die vier Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase. NADH/Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) überträgt Elektronen von NADH auf das Ubichinon. Letzteres ist ein Cofaktor, der sich innerhalb der Phospholipiddoppelschicht der IMM befindet. Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) oxidiert FADH₂ zu FAD, wobei die Elektronen ebenfalls an das Ubichinon weitergeleitet werden. Sobald Ubichinon reduziert wurde überträgt es Elektronen an die Ubichinon/Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), welche schließlich die Elektronen an die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) weitergibt. Diese reduziert dann O₂ zu H₂O. Der Elektronentransfer über Komplex I, III und IV führt zu einem Transport von H⁺ aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum (IMS)¹⁰⁵ Die H⁺ akkumulieren im IMS, sodass der pH Wert hier um 1,4 Einheiten niedriger ist als in der Matrix.⁵⁶ Der aufgebaute Gradient führt zu einem Rückstrom von H⁺ vom IMS in die Matrix. Dieser Rückfluss wird von der ATP-Synthase genutzt um ATP zu bilden.¹⁰⁵ Diese Bildung von ATP aus ADP und Phosphat wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.⁵⁶

Abweichungen im NAD/NADH- bzw. FAD/FADH₂-Haushalt haben somit direkten Einfluss auf die ATP-Synthese und erlauben zudem einen Rückschluss auf den Redox-Status und damit einen möglichen oxidativen Stress.

Bei dieser Messmethode macht man sich die Autofluoreszenz des NADH und FAD zu Nutze, sodass kein Farbstoff notwendig ist. Die Kardiomyozyten wurden alternierend mit einer Wellenlänge von 340 nm und 485 nm angeregt und es wurde die Emission bei 450 nm und 525 nm gemessen. Die Kardiomyozyten wurden wie in 3.8 beschrieben isoliert.

Die Objektträger wurden mit Laminin beschichtet und an der Luft getrocknet. Nach der Isolation wurden die adulten Kardiomyozyten auf die beschichteten Objektträger pipettiert und für 5 min zum Absetzen stehengelassen. Die Messung erfolgte an der Ionoptix der AG Maack. Es wurde zunächst für 120 sec mit 0,5 Hz in Normaltyrode 2 stimuliert. Danach wurde für 85 sec Isoprenalin-Lösung 2 bei 0,5 Hz eingeleitet. Anschließend erfolgte eine 180-sekündige Stimulation mit 5 Hz unter Isoprenalin-Einleitung. Der Washout wurde für 60 sec mit Normaltyrode 2 bei 0,5 Hz durchgeführt. Es erfolgte eine Kalibrierung mit 5 μ M FCCP und 4 mM NaCN.

FCCP führt zu einer vollständigen Oxidation des NADH und FADH₂, NaCN hingegen zur vollständigen Reduktion von NAD und FAD. Es wurde das Verhältnis von NADH/FAD, der prozentuale Anteil an NADH bzw. FAD und die Sarkomerverkürzung bestimmt. In den letzten 20 sec des washouts wurde der arrhythmische Index ermittelt. Hierfür wurde die Anzahl der Kontraktionen ins Verhältnis zur Anzahl der Stimuli gesetzt.

3.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind in den jeweiligen Diagrammen als Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.M) dargestellt. Die Daten wurden auf Normalverteilung untersucht. Normalverteilte Daten, bei denen ein Vergleich zwischen zwei Stichproben erfolgte, wurden einem gepaarten bzw. ungepaarten *t*-Test unterzogen. Der gepaarte *t*-Test kam zum Einsatz, wenn dieselbe Gruppe zu unterschiedlichen Messzeitpunkten auf die gleiche Variable hin untersucht wurde. Dies ist beispielsweise in Abbildung 23 A zu sehen, in der die Ca²⁺-Transienten vor und nach ISO Applikation miteinander verglichen wurden. Bei einem Vergleich zweier Gruppen hinsichtlich einer nicht-abhängigen Variablen, wurde der ungepaarte *t*-Test verwendet. Dies ist ebenfalls in der Abbildung 23 A der Fall. Hier wurden lediglich zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die Messdaten stehen in keinerlei Abhängigkeit zueinander. Wenn hingegen zwei nicht-normalverteilte Gruppen mit ungepaarten Daten analysiert wurden, fand hingegen der Mann-Whitney-Test Anwendung. Dies ist beispielsweise in Abbildung 24 B der Fall.

Wurden vier unabhängige Gruppen mit normalverteilten Datensätzen in Hinblick auf zwei Faktoren untersucht (Genotyp, Behandlung) erfolgte eine Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test. Dies ist beispielsweise im Abbildung 16 A zu sehen. Bei fehlender Normalverteilung und einem Vergleich von vier unabhängigen Gruppen wurde der Kruskal Wallis mit Dunn Post-hoc-Test durchgeführt (s. Abbildung 18 A).

4. VORARBEITEN

Im Rahmen von Vorarbeiten wurde festgestellt, dass ein achtwöchiger permanenter MI eine signifikante Downregulation der NKA- α 1 und einen Anstieg der NKA- α 2 Isoform in Herzen von WT Tieren verursacht (unveröffentlichte Ergebnisse). Um die Auswirkung dieser Änderung im Expressionsmuster der einzelnen NKA-Isoformen zu untersuchen, wurden sowohl WT als auch NKA- α 2 Versuchstiere einem chronischen MI unterzogen. Die NKA- α 2 Tiere besitzen ein ähnliches Expressionsprofil der einzelnen NKA Isoformen wie WT Mäuse, die eine MI-Behandlung erfahren haben. NKA- α 2 Versuchstiere weisen bei gleicher NKA-Gesamtexpression eine Verschiebung im Expressionsmuster der jeweiligen NKA-Isoformen auf: die NKA- α 2 Isoform ist signifikant hochreguliert, wohingegen die NKA- α 1 signifikant downreguliert ist.¹⁰⁶ Es handelt sich hierbei um einen kompensatorischen Prozess, der bereits von anderen Forschungsgruppen beschrieben wurde. So zeigten auch *Correll et al.*, dass die Hochregulation der einen Isoform automatisch zu einer Downregulation der anderen Isoform führt.⁹⁸

Eine achtwöchige MI Behandlung von WT und NKA- α 2 Versuchstieren wies auf einen protektiven Effekt der NKA- α 2 Isoform hin. So zeigten MI-behandelte NKA- α 2 Mäuse eine verminderte Fibrose und eine geringere Zellvergrößerung im Vergleich zur entsprechenden WT Versuchsgruppe.¹⁰⁶ Um eine bessere Vergleichbarkeit beider Kohorten zu erzielen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen einer NKA- α 2 Überexpression weiter charakterisiert. Hierbei wurden bei den echokardiographischen (8 Wochen post MI), gravimetrischen und WB-Analysen nur Tiere miteinbezogen, die eine Infarktgröße ≥ 40 % aufwiesen. Letztere wurde echokardiographisch, gravimetrisch sowie histologisch ermittelt und ermöglichte den Einschluss von Tieren, die keine Kompensation der myokardialen Schädigung aufwiesen und bereits an einer fortgeschrittenem Herzinsuffizienz erkrankt waren.

5. ERGEBNISSE

5.1 WT und NKA- α 2 Tiere weisen vergleichbare Infarktgrößen auf

Es wurden lediglich Versuchstiere in die entsprechenden MI Kohorten eingeschlossen, deren Infarktgrößen $\geq 40\%$ betrug. Nur ca. Hierbei besaßen die untersuchten Versuchstiere Infarktgrößen zwischen 44 und 67%. Um sicherzustellen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den MI Kohorten bestanden, wurden die zusätzlich Infarktgrößen statistisch untersucht. Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen den eingeschlossenen WT und NKA- α 2 Versuchsgruppen identifiziert werden (Abbildung 14 A).

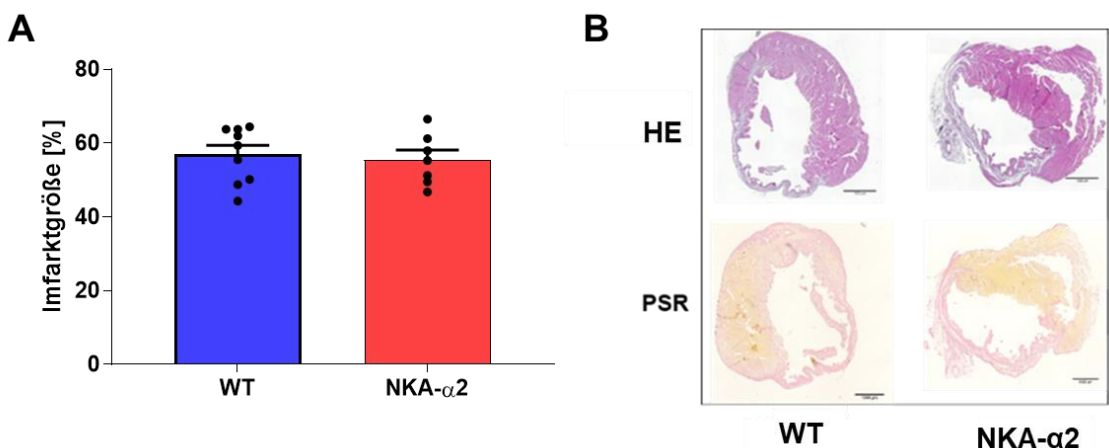


Abbildung 14: Die eingeschlossenen WT und NKA- α 2 Kohorten besitzen vergleichbare Infarktgrößen.

(A) Quantifizierung der Infarktgrößen mittels einer Piko-Siriusrot- (PSR) Färbung. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Infarktgrößen der beiden untersuchten Kohorten ($N = 9/\text{WT}$, $N = 7/\text{NKA-}\alpha 2$) $P = 0,7124$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test) (B) Exemplarische Darstellung eines infarzierten WT und NKA- α 2 Herzens nach einer Hämatoxylin-Eosin- (HE; oben) und einer Piko-Siriusrot (PSR)-Färbung (unten). Das infarzierte Gewebe ist weiß (HE) bzw. rot (PSR) und das gesunde Myokard lila (HE) bzw. gelb (PSR) gefärbt. Die dargestellten Balken entsprechen 1 mm. *Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶*

5.2 Überlebenszeitanalyse

40 % der Versuchstiere starben innerhalb der ersten 14 Tagen post MI. Zwischen Tag 14 und 56 blieb die Überlebensrate konstant. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen WT und NKA- α 2 Versuchstieren nach MI identifiziert werden. (Abbildung 15).

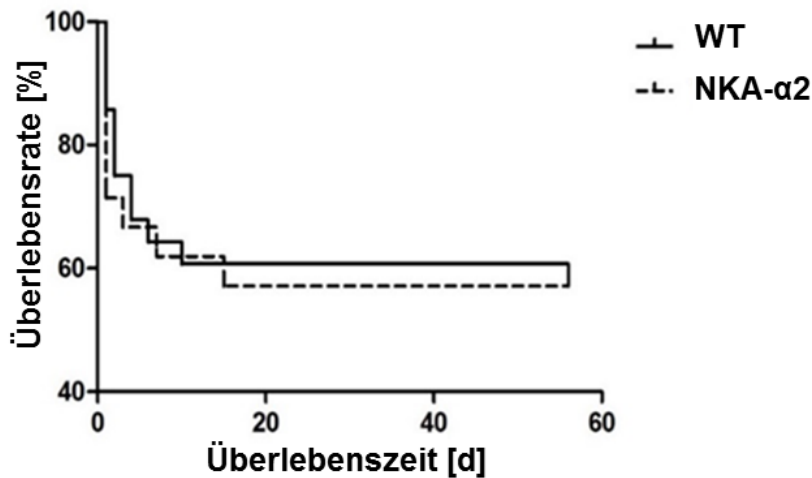


Abbildung 15: Überlebenszeitanalyse der beiden Kohorten nach einem chronischem MI.

Die Überlebensrate wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Kurve untersucht. Ein Großteil der MI-behandelten Versuchstiere verstarb innerhalb von 14 Tagen (40%). Zwischen Tag 14 und 56 stabilisierte sich die Mortalität und blieb konstant. Die NKA- α 2 und WT Versuchskohorten wiesen nach MI eine vergleichbare Sterblichkeit auf. *Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶*

5.3 Kardiales Remodeling nach MI

5.3.1 NKA- α 2 Tiere sind 3 Wochen post MI vor Funktionsverlust und Dilatation geschützt

Zur Charakterisierung der kardialen Funktion sowie einer möglichen post-ischämischen Dilatation wurden echokardiographische Parameter 3 Wochen nach MI untersucht. Hierbei wurden die Messungen auf Höhe des Papillarmuskels durchgeführt, da sich die Infarzierung über den Apex erstreckte und sich hauptsächlich im Bereich des Papillarmuskels überlebendes Gewebe befand. Besonderes Interesse galt dem nicht infarzierten Gewebe, da genau innerhalb dieser Strukturen ein Remodeling Prozess stattfindet, der je nach Genotyp evtl. unterschiedlich ausfallen kann.

Als funktionaler Parameter wurde das FS herangezogen, welches ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens ist und damit einen Rückschluß auf die systolische Funktion erlaubt. Der EDD dient zur Identifizierung einer möglichen Dilatation und hilft somit Remodeling-Prozesse zu erkennen.

Ein dreiwöchiger MI induzierte sowohl in der WT als auch NKA- α 2 Kohorte eine Verringerung des FS. Allerdings wies die MI NKA- α 2 Subgruppe eine signifikant bessere Funktion auf als die entsprechende WT Vergleichsgruppe (Abbildung 16 A). Unabhängig vom Genotyp zeigten die MI Versuchsgruppen einen Anstieg des EDD im Vergleich zu den jeweiligen Sham Kohorten. Allerdings konnte auch hier ein protektiver Effekt der NKA- α 2 Überexpression festgestellt werden. NKA- α 2 MI Herzen waren gekennzeichnet durch eine niedrigere EDD als die WT Vergleichsgruppe (Abbildung 16 B).

Zusammenfassend weisen diese Resultate auf einen protektiven Effekt einer kardialen NKA- α 2 Überexpression hinsichtlich Dilatation und Funktionsverlust 3 Wochen nach MI hin. Somit kann eine Aktivierung der NKA- α 2 einer Dilatation und einer funktionalen Beeinträchtigung in frühen Herzinsuffizienzstadien entgegenwirken.

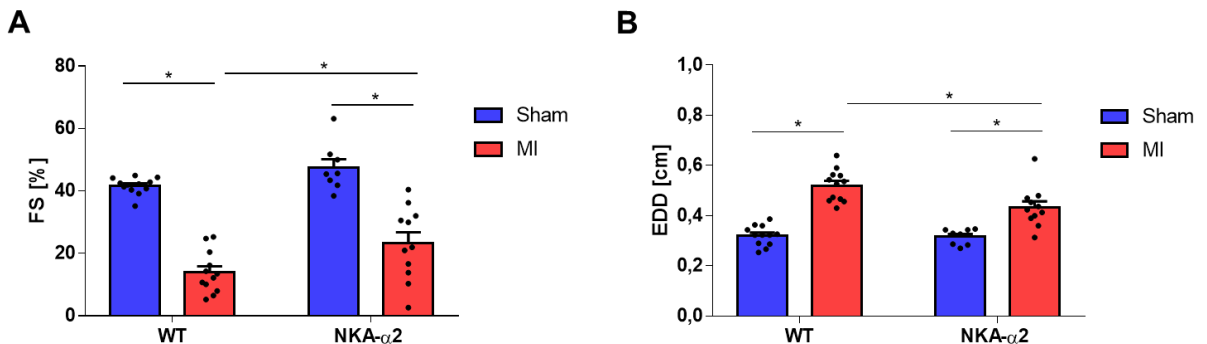


Abbildung 16: Echokardiographische Untersuchung nach drei Wochen chronischem MI.

(A) Die Aufnahme des Fractional Shortening (FS) erfolgte im M-Mode und auf Höhe des Papillarmuskels. NKA- α 2 MI Versuchstiere wiesen ein höheres FS und damit eine bessere Funktion als die WT Vergleichsgruppe auf. (B) Der Enddiastolische Diameter (EDD) wurde als Parameter für eine Dilatation herangezogen. Die NKA- α 2 MI Subgruppe zeigte eine geringere post-ischämische Dilatation als die entsprechende WT Kohorte. (A,B) $N = 12$ /WT Sham, $N = 12$ /WT MI, $N = 8$ /NKA- α 2 Sham, $N = 11$ /NKA- α 2 MI; $^*P < 0.05$ (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test). *Unveröffentlichte Ergebnisse*

5.3.2 NKA- α 2 Tiere sind auch nach 8 Wochen MI vor Funktionsverlust und Dilatation geschützt

Um den Effekt einer NKA- α 2 Überexpression auch in fortgeschrittenen Herzinsuffizienz-Stadien zu analysieren, wurden 8 Wochen nach MI erneut echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Auch hier zeigte sich erneut der protektive Charakter der NKA- α 2. So zeigten beide Gruppen eine MI-induzierte Verringerung des FS. Allerdings fiel dieser Funktionsverlust in der NKA- α 2 MI Kohorte geringer aus (Abbildung 17 A). Somit führt eine NKA- α 2 Überexpression auch in einem fortgeschrittenen Herzinsuffizienzstadium zu einer Stabilisierung der kardialen Funktion. Der MI verursachte bei beiden Genotypen zudem eine Erhöhung des EDD, wobei dieser in der NKA- α 2 Kohorte geringer ausgeprägt war, sodass davon einer Protektion gegenüber dilatativen Prozessen auszugehen ist (Abbildung 17 B).

Insgesamt zeigen die echokardiographischen Untersuchungen, dass NKA- α 2 Versuchstiere selbst im fortgeschrittenem Herzinsuffizienzstadium vor Funktionsverlust und dilatativem Remodeling geschützt sind.

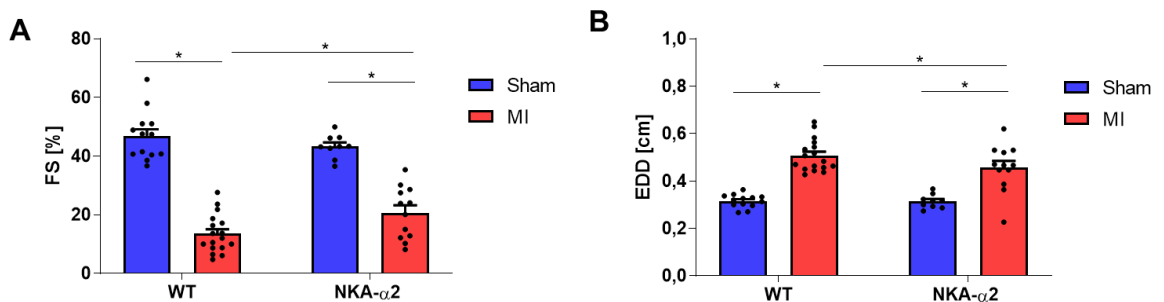


Abbildung 17: Echokardiographische Untersuchungen nach 8 Wochen MI.

(A) NKA- α 2 Versuchstiere zeigten selbst nach achtwöchigem MI ein verbessertes Fractional Shortening (FS) als die WT Vergleichsgruppe. (B) Der EDD der NKA- α 2 MI Kohorte ist nach chronischem MI geringer als in der entsprechenden WT MI Subgruppe. (A,B) $N = 13$ /WT Sham, $N = 17$ /WT MI, $N = 9$ /NKA- α 2 Sham, $N = 12$ /NKA- α 2 MI; * $P < 0.05$ (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test). Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

5.3.3 NKA- α 2 Tiere zeigen nach 8 Wochen MI eine leicht verzögerte kardiale Hypertrophie und einer Lungenstauung

Gravimetrische Untersuchungen des Herzgewichtes zeigten, dass ein chronischer MI in WT Versuchstieren ein hypertrophes Wachstum erzeugte. So wies die WT MI Kohorte ein signifikant höheres relatives Herzgewicht als die korrespondierenden Sham Gruppe auf. Zwischen der NKA- α 2 MI und NKA- α 2 Sham Gruppe konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass eine MI-Behandlung von WT Versuchstieren mit einer kardialen Hypertrophie einhergeht. Trotz dieser Beobachtung konnte dennoch kein Unterschied zwischen MI-behandelten NKA- α 2 und WT Tieren nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz scheint eine vergleichbare myokardiale Schädigung in der WT Gruppe eine hypertrophe Reaktion zu verursachen, die in transgenen NKA- α 2 Versuchstieren unterbleibt (Abbildung 18 A). Dies lässt den Schluss zu, dass eine kardiale NKA- α 2 Überexpression die Entstehung einer pathologischen Hypertrophie nach ischämischer Myokardschädigung verzögert.

Eine Linksherzinsuffizienz kann einen Blutrückstau in den Lungengefäßen bewirken, was die Entstehung von Lungenödemem begünstigt. Die Flüssigkeitsansammlung bewirkt einen Anstieg des Lungengewichtes, welcher durch Wiegen erfasst werden kann. Die gravimetrische Analyse der Lungengewichte erlaubt daher einen Rückschluss auf das Ausmaß des Blutrückstaus und der damit verbundenen Lungenstauung bzw. Lungenödeme. Interessanterweise konnte nur in der WT MI Kohorte ein Anstieg im relativen Lungengewicht beobachtet werden. MI-behandelte WT Tiere zeigten ein bis zu 55 % höheres relatives Lungengewicht als die Sham Gruppe. In der NKA- α 2 Kohorte konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen Sham- und MI-Behandlung identifiziert werden (Abbildung 18 B). Demnach wirkt sich eine Überexpression der NKA- α 2 positiv auf die Progression einer Herzinsuffizienz aus, indem sie die Entstehung einer Hypertrophie und eines Lungenödems abmildert.

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass eine kardiale NKA- α 2 Überexpression die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie nach ischämischer Schädigung verlangsamt. Des Weiteren steht eine Überexpression der NKA- α 2 im Zusammenhang mit leichteren Herzinsuffizienzschweregraden und geringeren Funktionsverlusten.

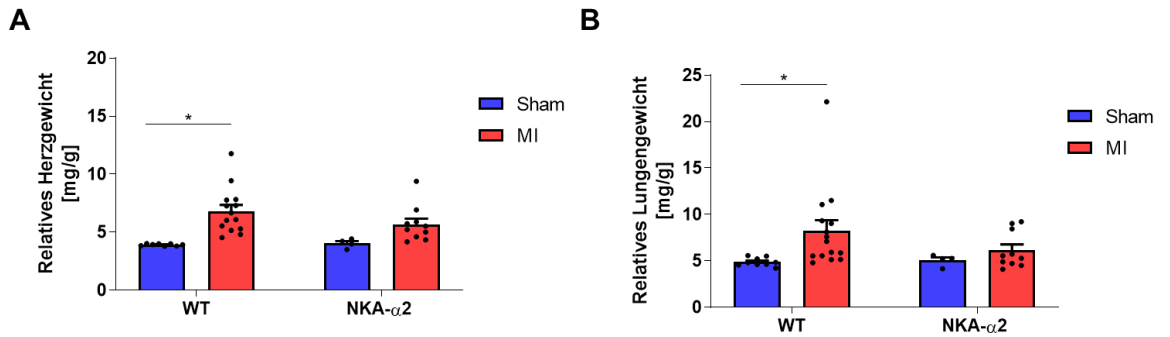


Abbildung 18: Gravimetrische Untersuchung der Herz- und Lungengewichte.

(A) Dargestellt ist das relative Herzgewicht von WT und NKA-α2 Versuchstieren, die einer achtwöchigen Sham- bzw. MI-Behandlung unterzogen wurden. Der MI induzierte ein hypertrophes Wachstum des Myokards in WT Tieren, welches in der NKA-α2 Kohorte ausblieb. $N = 8/\text{WT Sham}$, $N = 14/\text{WT MI}$, $N = 4/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ Sham}$, $N = 10/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ MI}$; $*P < 0.05$ (Kruskal Wallis mit Dunn Post-hoc-Test) (B) Nur die WT MI Versuchstiere zeigten eine Zunahme des relativen Lungengewichts. Dies deutet auf einen stärkeren Schweregrad der Herzinsuffizienz und eine schwerere Funktionseinschränkung hin. $N = 9/\text{WT Sham}$, $N = 15/\text{WT MI}$, $N = 4/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ Sham}$, $N = 10/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ MI}$; $*P < 0.05$ (Kruskal Wallis mit Dunn Post-hoc-Test). Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

5.4 Ca^{2+} -Handling und funktionale Veränderungen nach MI

5.4.1 Ein chronischer MI induziert eine Verringerung der Kontraktilität und des systolischen Ca^{2+} -Spiegels in NKA- α 2 Kardiomyozyten

Im weiteren Vorgehen wurden Untersuchungen auf zellulärer Ebene durchgeführt, um etwaige funktionale Unterschiede zwischen den Genotypen ausfindig zu machen. Die Bestimmung der Sarkomerlängen ermöglicht es die Sarkomerverkürzung während der Kontraktion in der Systole zu ermitteln. Sham-behandelte NKA- α 2 und WT Kardiomyozyten unterschieden sich nicht in ihrem Kontraktionsverhalten. Sie wiesen beide eine ähnliche Sarkomerverkürzung auf. Erst durch die MI-Behandlung offenbarten sich funktionale Veränderungen. So zeigten NKA- α 2 MI Kardiomyozyten eine niedrigere Sarkomerverkürzung als die korrespondierende WT Kohorte. Die Kontraktionen waren hierbei bis zu 60 % niedriger als in WT MI Kardiomyozyten. Zwischen den Sham und MI Gruppen beider Studienkohorten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden (Abbildung 19 A).

Aufgrund des unterschiedlichen kontraktiven Verhaltens wurden ebenfalls die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel untersucht. So konnten Unterschiede in den Ca^{2+} -Transienten – der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – zwischen NKA- α 2 MI und der entsprechenden Sham Gruppe ermittelt werden. Ein MI induzierte hier eine Verringerung der systolischen Ca^{2+} -Spiegel. Aber auch im Vergleich mit der korrespondierenden WT Vergleichsgruppe zeigten Kardiomyozyten von NKA- α 2 Versuchstieren nach MI niedrigere Ca^{2+} -Transienten (Abbildung 19 B).

Die NKA- α 2 Überexpression begünstigt nach MI eine erniedrigte systolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die mit einer verringerten Verkürzung der Sarkomere einhergeht.

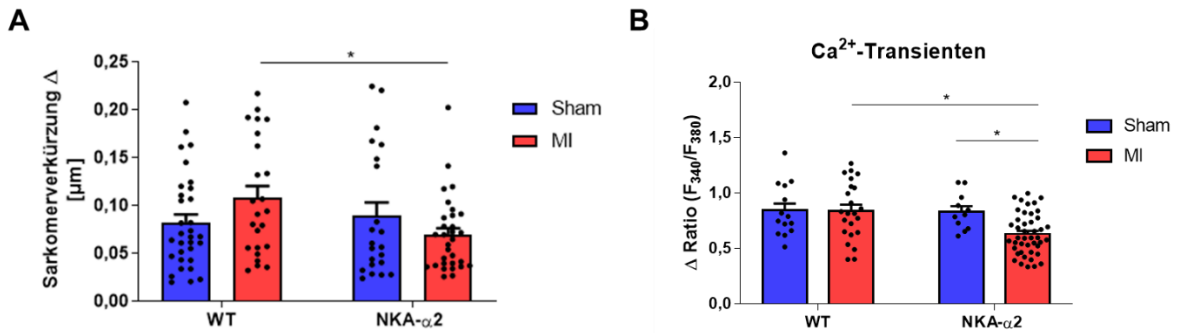


Abbildung 19: Eine NKA-α2 Überexpression begünstigt nach chronischer MI-Behandlung eine verringerte Kontraktilität sowie ein niedriges systolisches Ca²⁺-Profil.

(A) Messung der Sarkomerverkürzung in Sham- bzw. MI-behandelten WT und NKA-α2 Versuchstieren. Die Sarkomerverkürzung ergab sich durch Subtraktion der systolischen Sarkomerlänge von der Diastolischen und ist ein Maß für die Kontraktilität der Zellen. NKA-α2 Kardiomyozyten wiesen nach MI-Behandlung eine geringere Kontraktilität als die WT MI Kohorte auf. (*N*-Zahl der verwendeten Zellen von 4-8 Versuchstieren: *N* = 32/WT Sham, *N* = 24/WT MI, *N* = 22/NKA-α2 Sham, *N* = 31/NKA-α2 MI); **P*<0.05 (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test) (B) Untersuchung der Ca²⁺-Transienten (systolische [Ca²⁺]_i) in Sham-bzw. MI-behandelten WT und NKA-α2 Kardiomyozyten. Eine NKA-α2 Überexpression führt post MI zu niedrigeren Ca²⁺-Transienten. (*N*-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 Versuchstieren: *N* = 14/WT Sham, *N* = 23/WT MI, *N* = 11/NKA-α2 Sham, *N* = 44/NKA-α2 MI); **P*<0.05 (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test) (A,B) Die Messungen erfolgten in Normaltyrode (NT) und mit einer elektrischen Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. Es wurde der ratiometrischen Farbstoff Fura-2 AM verwendet und die Ratio der Fluoreszenzintensität bei 340 und 380 nm (F₃₄₀/F₃₈₀) gebildet. *Modifiziert nach Cellini et al.*¹⁰⁶

5.4.2 NKA-α2 Kardiomyozyten sind nach achtwöchigem MI vor einer Ca²⁺-Desensibilisierung geschützt

Die veränderte systolische [Ca²⁺]_i in Verbindung mit der reduzierten Sarkomerverkürzung in den NKA-α2 Kardiomyozyten führten zu der Annahme, dass hier Desensibilisierungsprozesse vermehrt stattgefunden haben könnten. Um dies genauer untersuchen zu können, wurden die systolischen bzw. diastolischen Sarkomerlängen gegen die mittlere systolische bzw. diastolische [Ca²⁺]_i aufgetragen. Hierbei wurde eine lineare Regression durchgeführt und sowohl die Steigung als auch der Y-Achsenabschnitt aller Subgruppen analysiert. Interessanterweise wiesen die NKA-α2 Sarkomere nach MI keine Desensibilisierung gegenüber Ca²⁺ auf. So zeigten sie einen signifikant geringeren Y-Achsenabschnitt im Vergleich zur WT MI Kohorte.

Dementsprechend benötigten NKA- α 2 MI Kardiomyozyten für eine vergleichbare Sarkomerverkürzung eine wesentlich geringere $[Ca^{2+}]_i$ als die WT MI Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die Steigung der unterschiedlichen Geraden analysiert. Letztere kann entsprechend als Surrogatparameter für die Funktionskinetik betrachtet werden. Die Geschwindigkeit der Sarkomerverkürzung hängt davon ab welcher Unterschied in der $[Ca^{2+}]_i$ hierfür erforderlich ist. Je steiler eine Gerade, desto schneller läuft eine Sarkomerverkürzung ab, da letztlich für den gesamten Prozess weniger Ca^{2+} erforderlich ist und darüber hinaus eine niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ auch schneller erreicht werden kann. In Hinblick auf die Steigung konnte allerdings kein Unterschied zwischen den beiden MI Kohorten identifiziert werden. Dementsprechend ist die Reaktion der Sarkomere gegenüber Ca^{2+} in den MI-behandelten Versuchstieren vergleichbar. Letztere läuft bei NKA- α 2 allerdings bei einer niedrigeren $[Ca^{2+}]_i$ ab. Zwischen den Sham- und MI-behandelten Kardiomyozyten beider Genotypen konnte hingegen kein Unterschied identifiziert werden (Abbildung 20 A,B).

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass eine NKA- α 2 Überexpression während eines chronischen MI einer Ca^{2+} -Desensitivisierung entgegenwirkt.

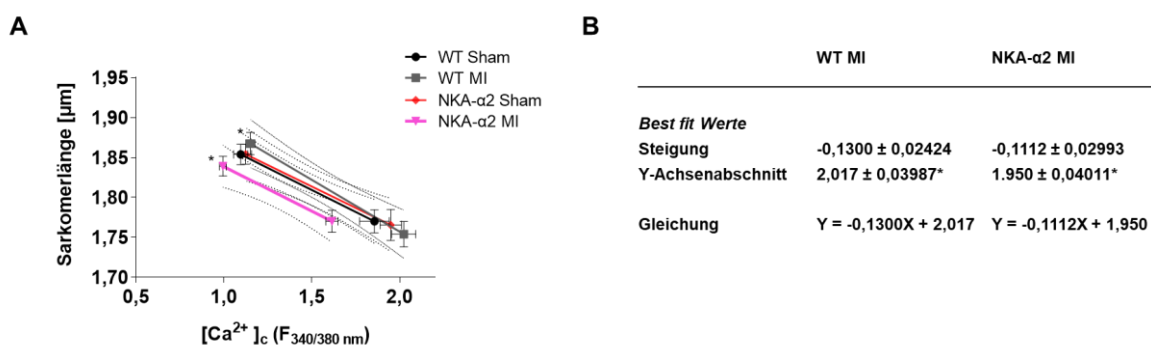


Abbildung 20: MI-behandelte NKA- α 2 Kardiomyozyten sind vor einer Ca^{2+} -Desensitivisierung geschützt.

(A) Die systolischen bzw. diastolischen Sarkomerlängen wurden gegen die entsprechende systolische bzw. diastolische $[Ca^{2+}]_i$ aufgetragen. Es wurde eine lineare Regression durchgeführt und sowohl die Steigung als auch der Y-Achsenabschnitt aller Subgruppen miteinander verglichen. Die MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten zeigten hierbei eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität als die korrespondierende WT Vergleichsgruppe. (B) Die Tabelle enthält Angaben zur Steigung, zum Y-Achsenabschnitt sowie der Geradengleichung der NKA- α 2 MI und WT MI Zellen. (A,B) Lineare Regression, (N-Zahl der verwendeten Zellen von 8-9 Versuchstieren: $[Ca^{2+}]_c$: $N = 23$ /WT Sham, $N = 33$ /WT MI, $N = 19$ /NKA- α 2 Sham, $N = 53$ /NKA- α 2 MI; Sarkomerlänge: $N = 28$ /WT sham, $N = 22$ /WT MI, $N = 20$ /NKA- α 2 Sham, $N = 31$ /NKA- α 2 MI);

* vs. WT MI. Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

5.4.3 MI-behandelte NKA- α 2 Kardiomyozyten zeichnen sich durch einen schnelleren Ca^{2+} -Efflux und einen verringerten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehalt aus

Die Coffein-Applikation zeigte, dass ein chronischer MI in WT Tieren einen Anstieg im Ca^{2+} -Gehalt des SR verursachte. Dieser Anstieg konnte allerdings nicht in der NKA- α 2 MI Kohorte beobachtet werden. Darüber hinaus wies die NKA- α 2 MI Kohorte eine geringere sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als die korrespondierende WT Vergleichsgruppe auf (Abbildung 21 A). Gleichzeitig konnte in MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten ein verändertes Ca^{2+} -Efflux Verhalten beobachtet werden. So kam es in NKA- α 2 Zellen nach MI zu einem schnelleren Abfall der Coffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten als in WT MI Kardiomyozyten, was auf eine höhere Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Ausstrom schließen lässt (Abbildung 21 B).

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt in murinen Kardiomyozyten der Ca^{2+} -Ausstrom in der Diastole vorrangig über SERCA. Je nach Spezies unterscheiden sich die prozentualen Anteile des Ca^{2+} -Effluxes über SERCA bzw. NCX. In Ratten Kardiomyozyten macht der SERCA-vermittelte Ca^{2+} -Efflux 92 % aus. Über den NCX gelangen lediglich 7 % des cytosolischen Ca^{2+} in das Interstitium. Ähnlich verhält es sich in Mäusen. In Kaninchen ergibt sich jedoch ein unterschiedliches Bild. Hier werden nur 70 % des Ca^{2+} mittels SERCA in das SR gepumpt. Der NCX-Auström macht mit 28 % einen deutlich höheren Anteil am Gesamt- Ca^{2+} -Auström aus. Das humanen Myokard ähnelt im diastolischen Ca^{2+} -Efflux Verhalten dem des Kaninchens.¹⁰⁷ Durch Zugabe von Coffein kommt es zu einer reversiblen Öffnung des RyR. Dies führt dazu, dass Ca^{2+} , welches für gewöhnlich durch die SERCA aktiv in das SR transportiert wird, direkt wieder durch den RyR in das Cytosol diffundiert. Die nun erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert den NCX, wodurch es zu einem Ca^{2+} -Efflux kommt. Unter diesen Versuchsbedingungen wird der Ca^{2+} -Efflux vollständig durch den NCX getragen. Daher kann in Anbetracht dieser Ergebnisse von einer erhöhten Aktivität dieses Transporters ausgegangen werden. Demzufolge sind NKA- α 2 Kardiomyozyten vor einer MI-induzierten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Akkumulation geschützt. Darüber hinaus weisen sie nach einer MI-Behandlung eine erhöhte NCX Aktivität auf, was zu einem schnelleren Ca^{2+} -Efflux in der Diastole führt.

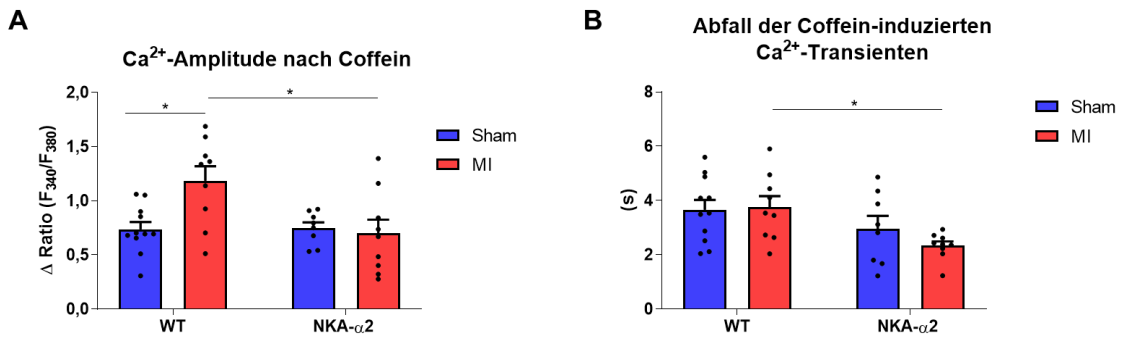


Abbildung 21: Sarkoplasmatischer Ca²⁺-Gehalt und Ca²⁺-Efflux.

(A) Der sarkoplasmatische Ca²⁺-Gehalt wird durch Messung der Ca²⁺-Amplitude nach Applikation einer 10 mM Coffein Lösung gemessen. Hierbei kam es in WT MI Versuchstieren zu einem Anstieg in der [Ca²⁺] des SR. NKA-α2 Kardiomyozyten zeigten hingegen nach MI geringere Ca²⁺-Spiegel und damit eine geringere Ca²⁺-Akkumulation als die korrespondierende WT Kohorte. (B) Dargestellt ist der Abfall der Coffein-induzierten Ca²⁺-Transienten als Parameter für die Schnelligkeit des Ca²⁺-Efflux in der Diastole. Kennzeichnend für NKA-α2 MI Kardiomyozyten ist der schnellere Ca²⁺-Ausstrom im Vergleich zu WT MI Zellen. (A,B) (*N*-Zahl der verwendeten Zellen von 3-6 Versuchstieren: *N* = 11/WT Sham, *N* = 9/WT MI, *N* = 8/NKA-α2 Sham, *N* = 9/NKA-α2 MI); **P* < 0.05 (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm-Sidak Post-hoc-Test).
 Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

5.4.4 Reduktion der SERCA Aktivität in MI-behandelten WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten

Die Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ in der Diastole wird durch SERCA und dem NCX bewirkt.¹⁰⁷ Um festzustellen, ob auch im SERCA-vermittelten Ca^{2+} -Efflux Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vorliegen, wurde die time to baseline 10 % ausgewertet. Hierbei wird bestimmt, wieviel Zeit benötigt wird um auf 10 % der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ zurückzukehren. Da die Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ in der Diastole primär durch SERCA vermittelt wird¹⁰⁷, ermöglicht die Bestimmung der time to baseline 10 % daher einen Rückschluss auf dessen Aktivität.

Sowohl in WT als auch NKA- α 2 Kardiomyozyten verursachte der chronische MI eine Erhöhung der time to baseline 10% im Vergleich zur entsprechenden Sham Kohorte. Zwischen WT und NKA- α 2 Versuchstieren konnten allerdings sowohl unter Sham- als auch MI-Bedingungen keine Unterschiede identifiziert werden (Abbildung 22).

Demzufolge induziert ein chronischer MI eine Verringerung der SERCA Aktivität, die jedoch unabhängig von der NKA- α 2 Überexpression auftritt.

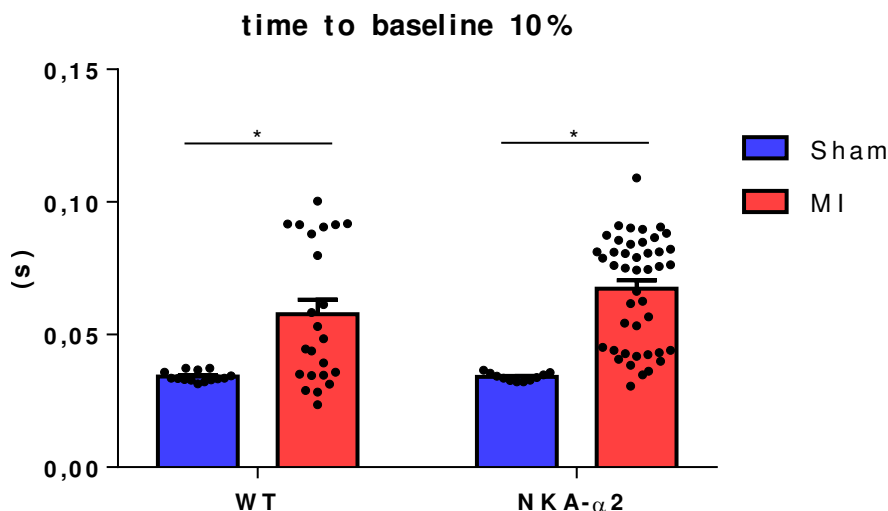


Abbildung 22: Ein chronischer MI induziert eine Verringerung der SERCA Aktivität.

Die time to baseline 10% gibt Auskunft wie schnell 10% der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ erreicht wird und erlaubt einen Rückschluss auf die SERCA Aktivität. Sowohl WT als auch NKA- α 2 Kardiomyozyten zeigten nach chronischem MI eine Erhöhung der time to baseline 10%. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen nachgewiesen werden. (N-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 Versuchstieren: $N = 14$ /WT Sham, $N = 23$ /WT MI, $N = 11$ /NKA- α 2 Sham, $N = 44$ /NKA- α 2 MI); * $P < 0.05$ (Kruskal Wallis mit Dunn Post-hoc-Test).

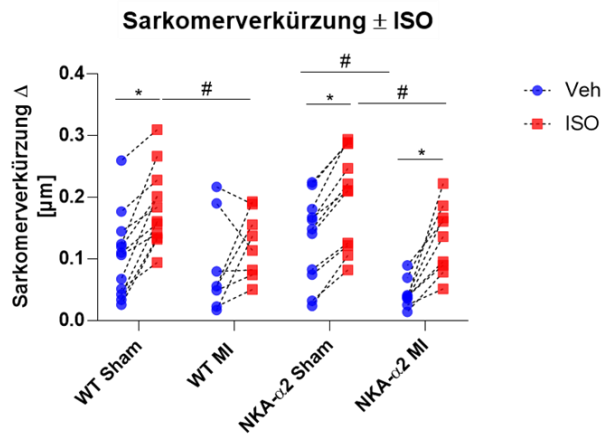
Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

5.5 β -adrenerges Signaling und die NKA- α 2

5.5.1 Auch nach chronischem MI bewirkt eine akute β -adrenerge Stimulation von NKA- α 2 Kardiomyozyten positiv inotrope Effekte

Eine charakteristische maladaptive Veränderung, die im Rahmen einer Herzinsuffizienz stattfindet, ist die Downregulation β 1AR^{28,29}, welche die Ansprechbarkeit gegenüber Agonisten wie Adrenalin und Noradrenalin reduziert²⁸ und die Auswurfleistung mindert.¹¹ Zur Analyse der Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Stimuli wurden die Kardiomyozyten sowohl mit Normaltyrode (Veh) als auch mit 1 μ M ISO behandelt. Es wurden anschließend die Sarkomerlängen vor und nach β -adrenerger Simulation verglichen. Hierbei fiel auf, dass alle Sham-behandelten Tiere mit einer erhöhten Kontraktilität auf den β -adrenergen Stimulus reagierten. Dies blieb allerdings nur in der NKA- α 2 Kohorte nach MI-Intervention bestehen. Die WT MI Subgruppe wies hingegen nach ISO-Stimulation keinen Anstieg in der Sarkomerverkürzung auf, was auf eine Desensibilisierung hindeutet. Die NKA- α 2 Kardiomyozyten zeigten zudem sowohl unter Veh- als auch ISO-Bedingungen eine verringerte Sarkomerverkürzung im Vergleich zur korrespondierenden Sham Gruppe. WT MI Kardiomyozyten wiesen hingegen lediglich während einer β -adrenergen Stimulierung eine geringere Sarkomerverkürzung als die entsprechende Sham Kohorte auf (Abbildung 23 A).

A



B

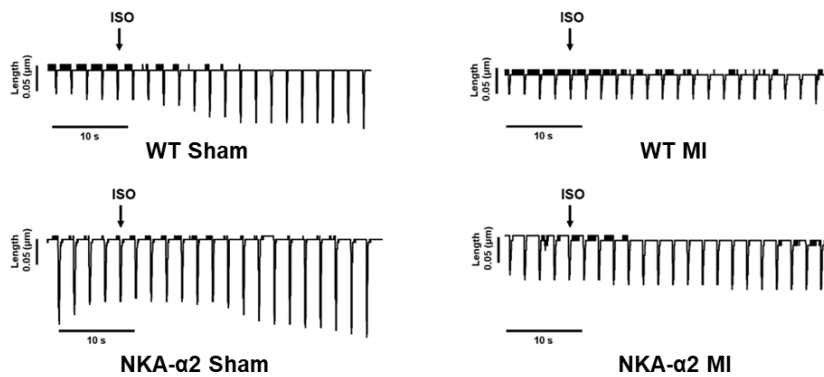


Abbildung 23: Sarkomerverkürzung vor und nach Isoprenalin (ISO) -Applikation.

(A) Die Sarkomerverkürzung vor und nach β -adrenerger Stimulation wurde in WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten nach achtwöchiger Sham- bzw. MI-Intervention ermittelt. Die Sham-behandelten Versuchstiere reagierten auf die ISO-Applikation mit einer verstärkten Kontraktilität. Dies war in den MI-behandelten Tieren nur noch in der NKA- α 2 Kohorte zu beobachten. WT MI Versuchstiere zeigten eine Desensitisierung und reagierten nicht mit einer wesentlichen Sarkomerverkürzung auf die β -adrenerge Stimulation. NKA- α 2 MI Kardiomyozyten zeigten während einer Behandlung mit Normaltyrode (Veh) bzw. ISO eine geringere Sarkomerverkürzung als die entsprechende Sham Gruppe. Bei WT Versuchstieren zeigten nur die ISO-behandelten MI Kardiomyozyten eine geringere Sarkomerverkürzung als die korrespondierende Sham Gruppe. (B) Repräsentative Messung der Sarkomerlängen in WT bzw. NKA- α 2 Kardiomyozyten nach Sham- bzw. MI-Behandlung. Die ISO-Applikation ist mittels eines Pfeiles dargestellt. Erkennbar ist der Anstieg der Kontraktilität in den Sham-behandelten Versuchstieren, sowie in der NKA- α 2 MI Zelle. Dies findet jedoch nicht in der repräsentativen WT MI Kardiomyozyte statt. (A,B) Die Messung erfolgte bei elektrischer Stimulation mit 0,5 Hz und in Anwesenheit von Veh und ISO (1 μ M). (N-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 Sham-behandelten Versuchstieren: $N = 12$ /WT Veh, $N = 12$ /WT ISO, $N = 11$ /NKA- α 2 Veh, $N = 11$ /NKA- α 2 ISO; N-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 MI-behandelten Versuchstieren $N = 8$ /WT Veh, $N = 8$ /WT ISO, $N = 9$ /NKA- α 2 Veh, $N = 9$ /NKA- α 2 ISO); * $P < 0.05$ (zweiseitiger, gepaarter t -Test), # $P < 0.05$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test) Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

Im weiteren Vorgehen wurde das Ca^{2+} -Profil der Tiere genauer untersucht. Zunächst wurden die Ca^{2+} -Transienten vor und nach ISO-Stimulation analysiert. Eine ISO-Applikation führte in beiden Sham Kohorten zu einem signifikanten Anstieg der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ähnliches wurde in NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten nach chronischer MI-Behandlung beobachtet. Auch hier führte eine β -adrenerge Stimulierung zu einem signifikanten Anstieg der Ca^{2+} -Transienten. In der WT MI Kohorte konnte in diesem Fall allerdings erneut eine Desensibilisierung festgestellt werden. So führte die Behandlung mit ISO zu keiner nennenswerten Erhöhung der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. MI-behandelte NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten zeigten darüber hinaus niedrigere Ca^{2+} -Transienten als die entsprechende WT Vergleichsgruppe. Dies traf sowohl für die Veh-Bedingung als auch die ISO-Applikation zu. Ebenso war die systolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ISO-stimulierter NKA- $\alpha 2$ MI Kardiomyozyten niedriger als die der entsprechenden Sham Gruppe. In den WT Zellen konnte hingegen ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Hier wiesen MI-behandelte Kardiomyozyten, welche einer β -adrenergen Stimulierung unterzogen wurden, höhere Ca^{2+} -Transienten als die korrespondierende Sham Gruppe auf. (Abbildung 24 A). Demzufolge kann auch bei Beobachtung der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein MI-induzierter Desensibilisierungsprozess in den WT Kardiomyozyten nachgewiesen werden, der in den NKA- $\alpha 2$ Zellen ausbleibt. Die MI-behandelten NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere zeichnen sich im Vergleich zu den entsprechenden WT Tieren durch niedrigere Ca^{2+} -Transienten aus. Dies trifft sowohl für die Basalbedingung als auch die β -adrenerge Stimulation zu.

Bei Betrachtung der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte ein vergleichbarer Effekt identifiziert werden. So zeigten auch hier die NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten nach MI niedrigere Ca^{2+} -Spiegel als die korrespondierende WT Kohorte. Dies konnte erneut sowohl in der Veh als auch der ISO Gruppe beobachtet werden. Ein chronischer MI induzierte in den WT Kardiomyozyten einen Anstieg der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. So wiesen WT Sham Zellen unter Veh-Bedingungen einen niedrigeren diastolischen Ca^{2+} -Spiegel als die entsprechende MI Kohorte auf. Interessanterweise führte eine ISO-Applikation in NKA- $\alpha 2$ MI Zellen zu einer Erhöhung der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – ein Effekt der ansonsten nur noch in der WT Sham Kohorte identifiziert werden konnte. (Abbildung 24 B). Somit induziert ein chronischer MI in NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren nicht nur eine Reduktion der systolischen, sondern auch der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dieser Effekt kann in der Veh Gruppe sowie bei ISO-Stimulierung nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass in NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren die Ansprechbarkeit gegenüber β -adrenergen Stimuli nach MI erhalten bleibt. Dies manifestiert sich sowohl in Form einer verstärkten Kontraktilität als auch einer erhöhten systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach ISO-Stimulation. Zudem zeichnen sich MI-behandelte NKA- $\alpha 2$

Versuchstieren durch eine reduzierte diastolische und systolische $[Ca^{2+}]_i$ aus, welche unter Basalbedingung und während einer β -adrenergen Stimulierung nachgewiesen werden kann. In WT Versuchstieren kommt es nach einem chronischen MI zu einer Steigerung der diastolischen Ca^{2+} -Spiegel, ein Effekt der in der NKA- α 2 MI Versuchsgruppe unterbleibt. Somit besitzen die NKA- α 2 Versuchstiere ein verändertes Ca^{2+} -Handling, welches sich auch während einer β -adrenergen Stimulierung manifestiert.

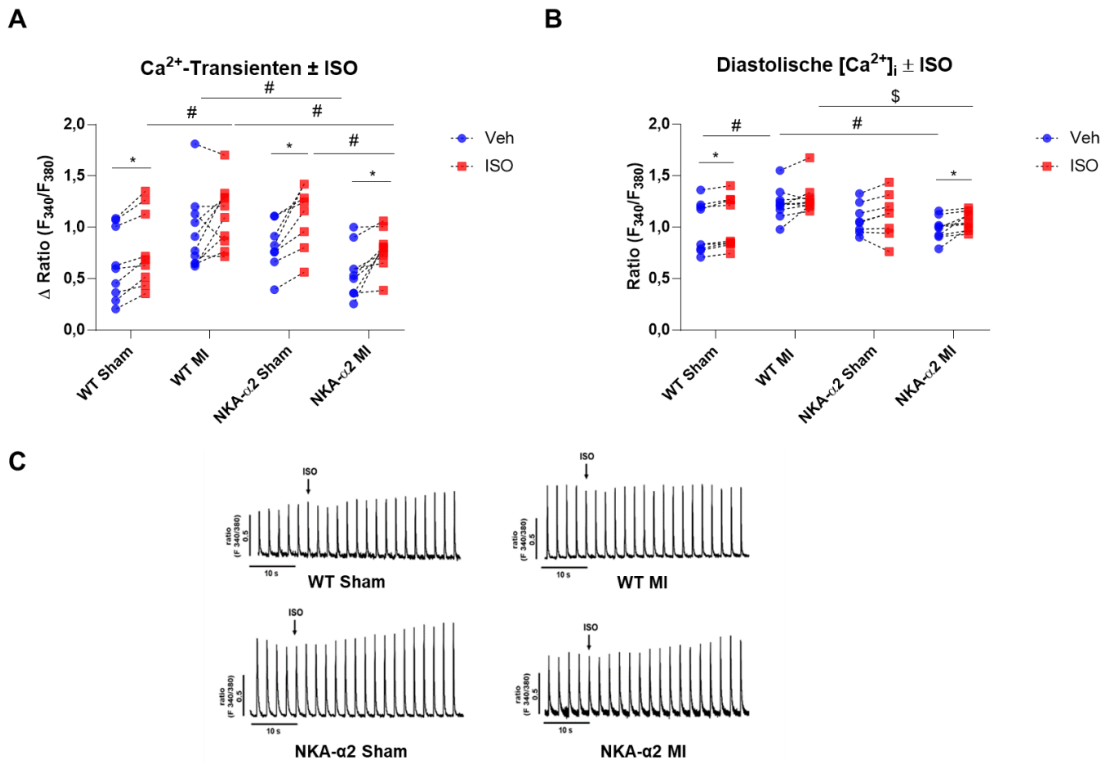


Abbildung 24: Systolische und diastolische Ca^{2+} -Spiegel vor und nach Isoprenalin (ISO)-Applikation.

(A) Ca^{2+} -Transienten von WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten nach 8 Wochen Sham-bzw. MI-Behandlung. Ein chronischer MI verursacht in den WT Kardiomyozyten einen Desensitierungsprozess, welcher sich in Form eines fehlenden Anstiegs der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach β -adrenerger Stimulation manifestiert. Dies findet in MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten nicht statt. Darüber hinaus weisen MI-behandelte NKA- α 2 Zellen niedrigere Ca^{2+} -Transienten als die entsprechende WT Vergleichsgruppe auf. Dies trifft sowohl für die Behandlung mit Normaltyrode (Veh) als auch die ISO-Stimulation zu. $*P < 0.05$ (zweiseitiger, gepaarter t -Test), $\#P < 0.05$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test) (B) Diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der WT und NKA- α 2 Versuchstieren nach achtwöchiger MI- bzw. Sham-Behandlung. NKA- α 2 MI Versuchstiere besitzen eine niedrigere diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als die entsprechende WT Kohorte. Dies trifft sowohl für die Basalbedingung als auch die β -adrenerge Stimulation zu. Darüber hinaus kommt es in WT MI Kardiomyozyten unter Veh-Bedingungen zu einem Anstieg der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. $*P < 0.05$ (zweiseitiger, gepaarter t -Test), $\#P < 0.05$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test), $\$P < 0.05$ (Mann-Whitney-Test) (A,B) Die Messung erfolgte in Veh bzw. ISO-Messlösung. Die Zellen wurden elektrisch mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. (N-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 Sham-behandelten Versuchstieren: $N = 9/\text{WT Veh}$, $N = 9/\text{WT ISO}$, $N = 8/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ Veh}$, $N = 8/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ ISO}$; N-Zahl der verwendeten Zellen von 4-5 MI-behandelten Versuchstieren: $N = 10/\text{WT Veh}$, $N = 10/\text{WT ISO}$, $N = 9/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ Veh}$, $N = 9/\text{NKA-}\alpha 2 \text{ ISO}$). Modifiziert nach Cellini et al.¹⁰⁶

Die bisherigen Untersuchungen zeigten einen desensitisierten Phänotyp in WT MI Tieren, aber nicht in NKA- α 2 Versuchstieren. Grundsätzlich kann ein Verlust an inotroper bzw. β -adrenerger Reserve Folge von Downregulations- oder Desensitierungsprozessen sein.²⁷ Um zu identifizieren, ob eine Downregulation oder ggf. eine Desensitisierung Ursache des Phänotyps ist, wurde der Proteingehalt von β 1ARs und β 2ARs im homogenisierten Ventrikelgewebe bestimmt. Auffallend war eine geringere β 1AR Expression in WT MI Tieren im Vergleich zur entsprechenden NKA- α 2 Gruppe. Der Unterschied zwischen WT Sham und MI erwies sich jedoch als nicht signifikant. Die NKA- α 2 Versuchstiere wiesen auch unter Sham-Bedingungen einen tendentiell höheren β 1AR Proteingehalt als die korrespondierende WT Gruppe auf. Diese Unterschiede waren allerdings ebenfalls nicht signifikant. (Abbildung 25 A,B). Die Untersuchungen des β 2AR Expressionsniveau ergaben keinen Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen (Abbildung 25 C,D).

Insgesamt scheint die Downregulation β -adrenerger Rezeptoren im Kontext einer ischämisch-induzierten Herzinsuffizienz bei einer NKA- α 2 Überexpression weniger ausgeprägt zu sein.

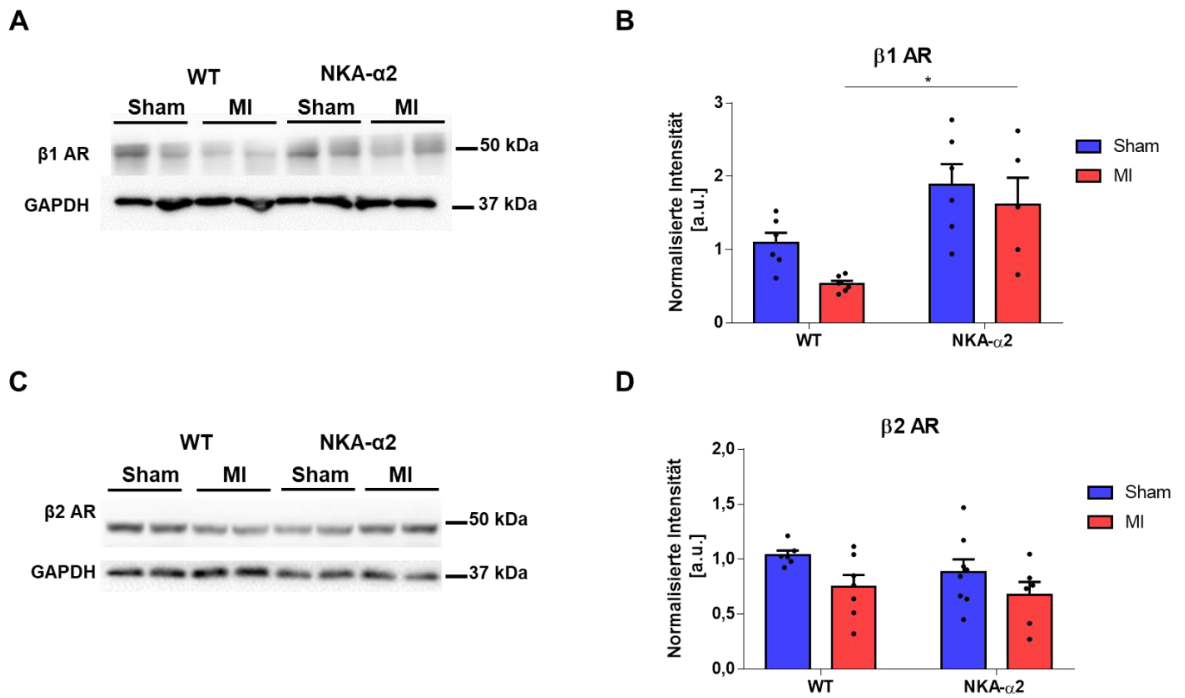


Abbildung 25: Expressionsniveau des β_1 - (β_1 AR) bzw β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) nach chronischem MI.

(A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots und die dazugehörige (B) Quantifizierung des β_1 AR Proteingehaltes in WT und NKA- α_2 Versuchstieren nach Sham- bzw. MI-Intervention. MI-behandelte WT Herzen wiesen hierbei ein geringeres β_1 AR Expressionsniveau als die korrespondierende NKA- α_2 Gruppe auf. (C) Zu sehen sind repräsentative Western Blots und (D) die entsprechender Quantifizierung des β_2 AR Expression nach achtwöchiger Sham- bzw. MI-Behandlung von WT bzw. NKA- α_2 Versuchstieren. In Hinblick auf die β_2 AR Proteinmenge konnte kein Unterschied zwischen den jeweiligen Subgruppen ermittelt werden. (A-D) GAPDH wurde zur Normalisierung des Expressionsniveaus verwendet. Der Proteingehalt der einzelnen Subgruppen ist im Diagramm relativ zu WT Sham dargestellt. ($N = 5-8$ /Gruppe); $*P < 0.05$ (Zwei Wege Varianzanalyse mit Holm- Post hoc Test), a.u.: arbitrary unit. *Modifiziert nach Cellini et al.*¹⁰⁶

5.5.1 Die NKA- α 2 interagiert mit dem β 1-AR

Aufgrund der besseren β -adrenergen Ansprechbarkeit entstand die Hypothese einer möglichen Interaktion zwischen dem β 1AR und der NKA- α 2. Um dies bestätigen zu können, wurde eine Co-IP durchgeführt. Dabei wurde der β 1AR präzipitiert und die NKA- α 2 in einem Western Blot detektiert. Der β 1AR und die verwendeten Kontroll-IgGs besitzen dasselbe Molekulargewicht. Erschwerend kommt hinzu, dass die Kontroll-IgGs eine sehr ausgeprägte Bande bilden, die eine sichere Identifizierung der β 1AR im Western Blot verhindert. Aus diesem Grund konnte die Co-IP nicht durch Präzipitation der NKA- α 2 und Detektion des β 1AR bestätigt werden und erfolgte daher nur in eine Richtung. Trotz dieser methodischen Limitationen ergab diese Untersuchung ein interessantes Ergebnis. So konnte eine Interaktion zwischen dem β 1AR und der NKA- α 2 sowohl in WT als auch in NKA- α 2 Herzen nachgewiesen werden (Abbildung 26 A). Die Quantifizierung der Co-IP zeigte jedoch ein unerwartetes Ergebnis: die NKA- α 2 Versuchstiere wiesen eine geringere Interaktion zwischen der NKA- α 2 und dem β 1AR auf als die WT Gruppe (Abbildung 26 B).

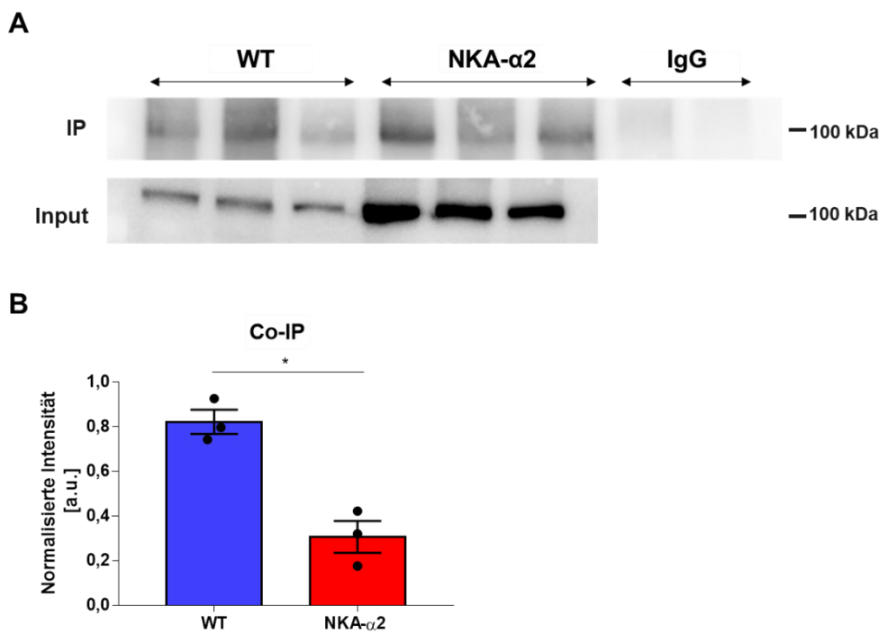


Abbildung 26: Die NKA- α 2 interagiert mit dem β 1-adrenergen Rezeptor (β 1AR).

(A) Repräsentativer Western Blot und die entsprechende (B) Quantifizierung der Co-Immünpräzipitation (Co-IP). (A,B) Der β 1AR wurde präzipitiert und die NKA- α 2 (100 kDa) detektiert. Als Kontrolle wurden Kaninchen-IgGs verwendet. Als Input dienten dieselben Herzlysate, die in der Co-IP verwendet wurden. Die Co-IP wurde auf den Input bezogen und ist relativ zum WT dargestellt. (N = 3 je Gruppe); * P <0.05 (zweiseitiger, ungepaarter t -Test), a.u.: arbitrary unit. *Unveröffentlichte Ergebnisse*

5.5.2 Eine β -adrenerge Stimulation führt zu einer Erhöhung der $[Na^+]_i$ in NKA- α 2, aber nicht in WT Tieren

Im weiteren Verlauf wurden die $[Na^+]_i$ in den Kardiomyozyten unbehandelter WT und NKA- α 2 Versuchstiere gemessen. Hierbei sollte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorliegen. Zunächst wurden die basalen Na^+ -Spiegel ohne elektrische Stimulation untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ermittelt werden (Abbildung 27 A). Im nächsten Schritt wurde die $[Na^+]_i$ während einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz mit und ohne ISO Applikation gemessen. Bei einer alleinigen elektrischen Stimulation in Normaltyrode (Veh) konnte kein Unterschied zwischen den beiden Kohorten identifiziert werden. Während der β -adrenergen Stimulation fiel allerdings auf, dass NKA- α 2 Kardiomyozyten mit einem signifikanten Anstieg in den Na^+ -Spiegeln reagierten. Dies konnte in der WT Gruppe nicht beobachtet werden (Abbildung 27 B). Somit führt eine NKA- α 2 Überexpression während einer β -adrenergen Stimulation zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$.

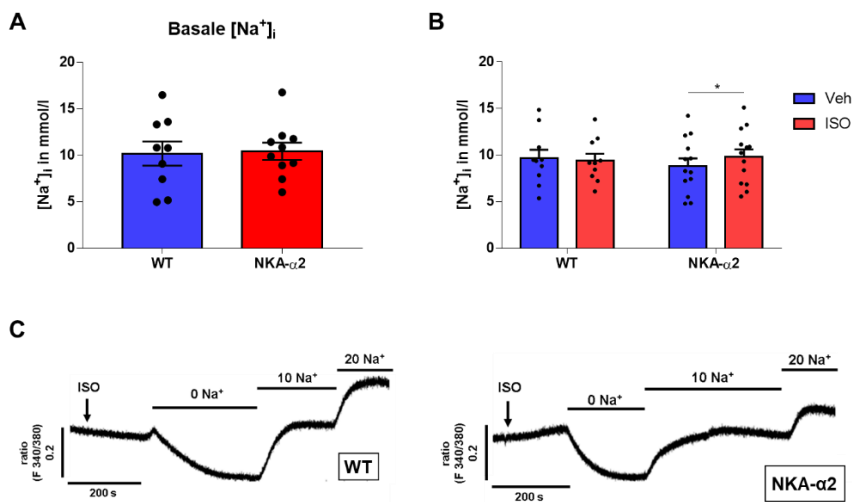


Abbildung 27 $[Na^+]_i$ in den Kardiomyozyten von WT und NKA- α 2 Versuchstieren.

(A) Dargestellt ist die cytosolische $[Na^+]_i$ ohne elektrische Stimulation. Es konnte kein Unterschied zwischen WT und NKA- α 2 Versuchstieren identifiziert werden. (N -Zahl der verwendeten Zellen von 5-6 Versuchstieren: $N = 9/WT$, $N = 10/NKA-\alpha 2$) $P = 0,8743$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test)
 (B) $[Na^+]_i$ während einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz mit und ohne ISO (1 μ M) Applikation. In NKA- α 2 Kardiomyozyten kam es nach β -adrenerger Stimulation zu einem Anstieg des cytosolischen Na^+ -Spiegel. In WT Tieren konnte dies hingegen nicht beobachtet werden. (N -Zahl der verwendeten Zellen von 5-8 Versuchstieren $N = 10/WT$ Veh, $N = 10/WT$ ISO, $N = 13/NKA-\alpha 2$ Veh, $N = 13/NKA-\alpha 2$ ISO); $*P < 0.05$ (zweiseitiger, gepaarter t -Test)
 (C) Repräsentative Messung der $[Na^+]_i$ in WT bzw. NKA- α 2 Kardiomyozyten. Dargestellt ist sowohl die Messung mit und ohne ISO-Stimulation sowie die Kalibrierung mit einer 0, 10 und 20 mM Na^+ -Kalibrierlösung. *Unveröffentlichte Ergebnisse*

5.5.3 Eine NKA- α 2 Überexpression fördert während einer β -adrenergen Stimulation die Kontraktilität bei gleichbleibendem Redox-Status

Die NKA ist als ATPase für die korrekte Funktion auf die Anwesenheit einer ausreichenden Menge an ATP angewiesen. Die ATP-Synthese hängt u.a. von ausreichend FADH_2 und NADH ab (s. 3.11). Abweichungen im FAD/FADH_2 und NAD/NADH Haushalt können die Bildung von ATP und dadurch die Aktivität der NKA beeinflussen. Gleichzeitig ermöglicht die Bestimmung von FAD und NADH einen Rückschluss auf den Redox-Status der Zelle und gibt hierdurch Auskunft über einen möglichen oxidativen Stress, der wiederum Einfluss auf die Funktion der NKA nehmen kann. Die Messung der NADH und FAD Autofluoreszenz ermöglicht es mitochondriale Dysfunktionen und eine Beeinträchtigung des Redox-Status zu ermitteln. Um Unterschiede auf basaler Ebene festzustellen, wurden die Untersuchungen mit Kardiomyozyten von unbehandelten Versuchstieren durchgeführt. Die Messung des prozentualen Anteils an NADH und FAD ergab unabhängig von der Stimulationsbedingung keinen Unterschied zwischen WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten (Abbildung 28 A). Vergleichbares wurde für das Verhältnis zwischen NADH und FAD beobachtet (Abbildung 28 B). Folglich besitzen sowohl NKA- α 2 als auch WT Versuchstiere einen ähnlichen Redoxstatus.

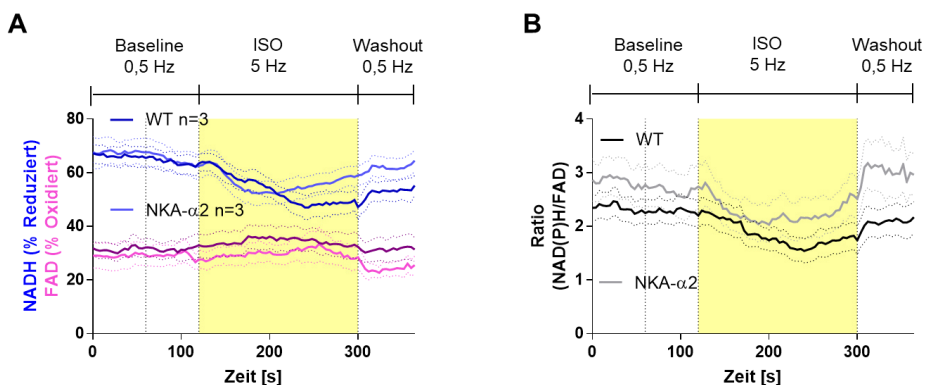


Abbildung 28: Redox-Status in WT und NKA- α 2 Kardiomyozyten während unterschiedlicher Stimulationsbedingungen.

(A) Prozentualer Anteil des NADH bzw. FAD sowie (B) das Verhältnis aus NADH und FAD in WT und NKA- α 2 Versuchstieren. Es konnte hier unabhängig von den Stimulationsbedingungen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ausgemacht werden. (A,B) Die Messung der Autofluoreszenz von NADH und FAD erfolgte unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Zunächst wurde für 120 sec mit 0,5 Hz in Normaltyrode (Baseline) gemessen. Danach erfolgte eine 180-sekündige β -adrenerge Stimulation mit ISO (30 nM) bei 5 Hz. Zum Schluss wurde der Washout mit Normaltyrode und einer Stimulation bei 0,5 Hz durchgeführt. (N-Zahl der verwendeten Zellen von 3 Versuchstieren: $N = 15/\text{WT}$, $N = 11/\text{NKA-}\alpha$ 2). *Unveröffentlichte Ergebnisse*

Aufgrund der der besseren β -adrenergen Ansprechbarkeit von MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten erfolgte eine zusätzliche Analyse der Sarkomerverkürzung während der NADH/FAD Messungen. Hierbei wurden die unterschiedlichen Stimulationsbedingungen genauer untersucht. Die Versuchstiere wiesen unter Baseline-Bedingungen (0,5 Hz; Normaltyrode; 120 sec) keine Unterschiede im Ausmaß der Sarkomerverkürzung auf (Abbildung 29 A). Selbst bei einer zusätzlichen Applikation von ISO konnten bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden (Abbildung 29 B). Wurde die Frequenz hingegen auf 5 Hz erhöht kristallisierten sich Unterschiede zwischen den beiden Kohorten heraus. NKA- α 2 Kardiomyozyten wiesen hierbei insgesamt eine höhere Kontraktilität als WT Zellen auf (Abbildung 29 C). Diese Charakteristik blieb selbst während des Washouts (0,5 Hz; Normaltyrode; 60 sec) und damit der Entfernung von ISO erhalten (Abbildung 29 D). Somit sind die Kontraktilitätsunterschiede, die zwischen beiden Kohorten während einer β -adrenergen Stimulation auftreten, von der elektrischen Stimulationsfrequenz abhängig. Eine höhere Frequenz führt zu einer stärkeren Kontraktionsfähigkeit der NKA- α 2 Kardiomyozyten, die selbst bei Entfernung des Agonisten erhalten bleibt.

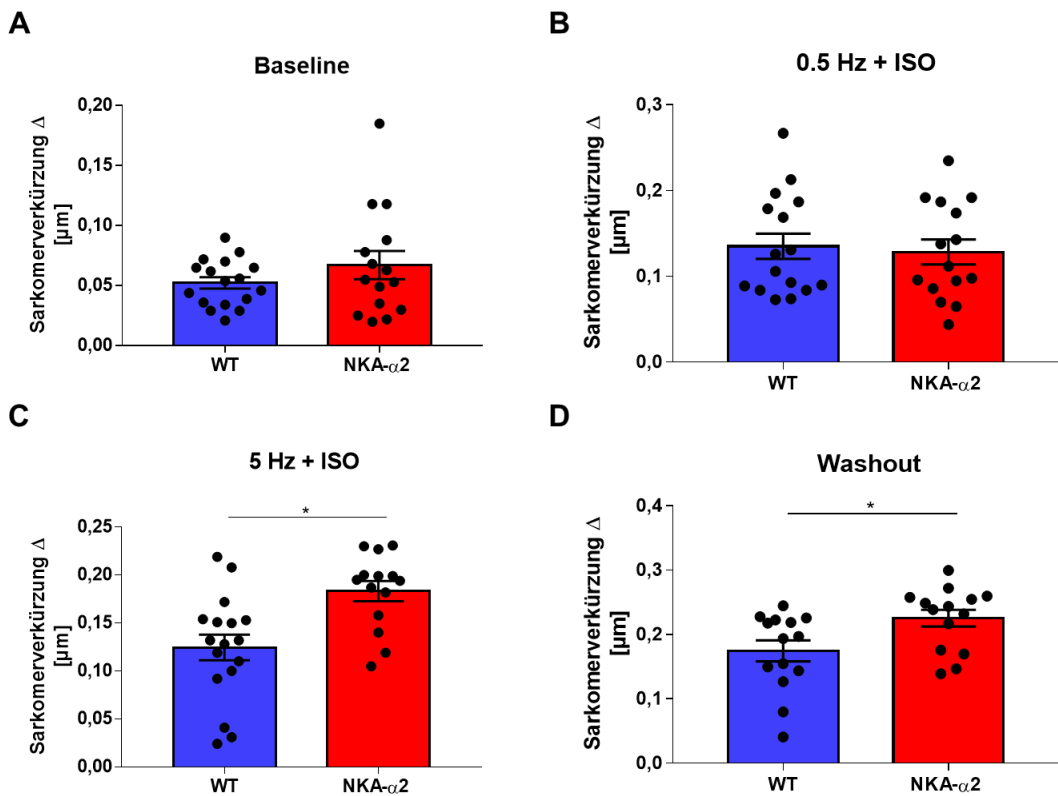


Abbildung 29: Messung der Sarkomerverkürzung während unterschiedlicher Stimulationsbedingungen.

Messung der Kontraktilität (A) in Normaltyrode bei Stimulation mit 0,5 Hz für 120 sec (Baseline), (B) bei 0,5 Hz mit zusätzlicher β -adrenerger Stimulation mit ISO (30 nM) für 85 sec, (C) während einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz und ISO-Applikation für 180 sec und (D) bei einer 60-sekündigen Stimulation mit 0,5 Hz in Normaltyrode (Washout). (A-D) Während einer β -adrenergen Stimulation bei 0,5 Hz konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Wurde die Stimulationsfrequenz bei Anwesenheit von ISO allerdings auf 5 Hz erhöht, zeigten NKA- α 2 Kardiomyozyten eine erhöhte Kontraktilität. Diese blieb selbst während dem Washout weiter bestehen. (N-Zahl der verwendeten Zellen von 3 Versuchstieren: $N = 14-17$ /WT, $N = 14-15$ Zellen/ NKA- α 2) * $P < 0.05$ (zweiseitiger, ungepaarter t -Test). *Unveröffentlichte Ergebnisse*

Um auszuschließen, dass die erhöhte Kontraktilität mit einer verstärkten Arrhythmie neigung assoziiert und daher pathologisch sein könnte, wurde der arrhythmische Index während der ersten 20 sec des Washouts bestimmt. Hierfür wurde die Anzahl der Kontraktionen ins Verhältnis zu den tatsächlich erfolgten elektrischen Stimuli gesetzt. Ein arrhythmischer Index von 1 bedeutet, dass keine Arrhythmien stattfanden. Bei einem arrhythmischen Index von 2 kam es zu doppelt so vielen Kontraktionen wie Stimuli, bei 3 hingegen zu dreimal so häufigen. Die Auswertung ergab

hierbei keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 30). Folglich hat die höhere Kontraktilität in den NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren keinen Einfluss auf die Arrhythmieneigung und wirkt dementsprechend nicht arrhythmogen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der ionotrope Effekt, welcher über β ARs vermittelt wird, in NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren frequenzabhängig ist und selbst bei Entfernung des Agonisten und Reduktion der Stimulationsfrequenz erhalten bleibt. Gleichzeitig bestätigen diese Ergebnisse die bessere β -adrenerge Ansprechbarkeit der NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere, welche hierbei nicht mit arrhythmogenen Prozessen assoziiert ist. Trotz erhöhter Kontraktilität und damit erhöhter Arbeitsleistung zeigen NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten keinen veränderten Redox-Status, was auf eine höhere Toleranz gegenüber β -adrenergen Stress hinweist.

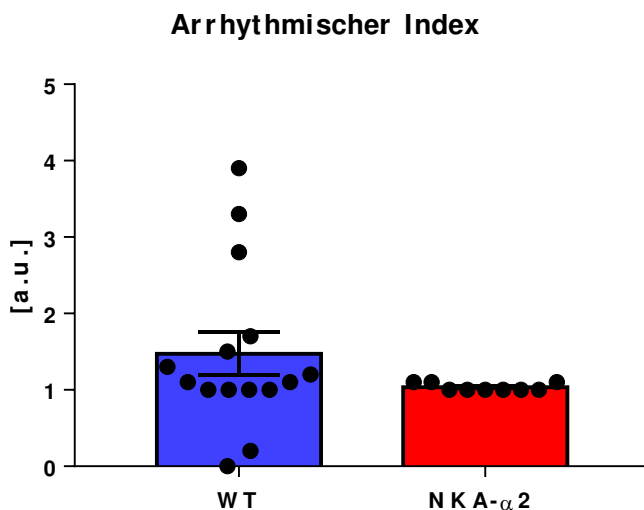


Abbildung 30 Arrhythmischer Index.

Die ersten 20 sec des Washouts wurden für die Bestimmung des arrhythmischen Index herangezogen. Die Anzahl der Kontraktionen wurde hierbei mit der Anzahl der Stimuli ins Verhältnis gesetzt. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen WT und NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten. (*N*-Zahl der verwendeten Zellen von je 3 Versuchstieren: *N* = 15/WT, *N* = 9/NKA- $\alpha 2$). *Unveröffentlichte Ergebnisse*

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer kardialen NKA- α 2 Überexpression im Kontext einer MI-induzierten chronischen Herzinsuffizienz untersucht. Hierbei konnte ein protektiver Effekt gegenüber kardialen Dysfunktionen und pathologischem Remodeling nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen werden in den kommenden Abschnitten genauer erörtert. Ebenso erfolgt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse mit der Fachliteratur und die Erläuterung möglicher weiterer Forschungsansätze, die zur Entschlüsselung funktionaler Mechanismen beitragen können.

6.1 Eine NKA- α 2 Überexpression schützt vor pathologischem Remodeling und funktionaler Beeinträchtigung nach MI

Insgesamt waren die NKA- α 2 Mäuse vor einer kardialen Funktionsbeeinträchtigung im Rahmen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz geschützt. Gleichzeitig milderte eine NKA- α 2 Überexpression hypertrophe Veränderungen des Myokards sowie die Entstehung von Lungenödemen ab. Nichtsdestotrotz konnten zwischen WT und NKA- α 2 Versuchstieren keine Unterschiede in der Mortalität festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass beide Versuchsgruppen einer ähnlichen myokardialen Schädigung unterzogen wurden. Bestätigt wurde dies durch die Ermittlung der Infarktgrößen. So zeigten beide Versuchsgruppen keine Unterschiede in den ermittelten Infarktgrößen. Etwaige strukturelle und funktionale Veränderungen sind somit nicht auf unterschiedliche ischämische Schädigungen zurückzuführen. Ebenso kann davon ausgegangen werden, dass eine NKA- α 2 Überexpression Wundheilungsprozesse nicht positiv begünstigt, da es zu keiner Begrenzung oder Verringerung der ischämischen Schädigung kam. Bereits nach Abschluss der Wundheilung und Ausbildung des Infarktareals drei Wochen post MI kristallisierten sich morphologische und funktionale Unterschiede zwischen den beiden MI Kohorten heraus. NKA- α 2 Versuchstiere zeigten in echokardiographischen Untersuchungen zwar eine verschlechterte kardiale Funktion im Vergleich zur Sham Kohorte, dennoch fiel diese Beeinträchtigung geringer aus als in der WT Versuchsgruppe. NKA- α 2 Herzen wiesen nach MI zudem auch eine geringere Dilatation auf. Dies konnte in Form eines geringeren EDD gezeigt werden. Auch nach acht Wochen chronischem MI waren NKA- α 2 Versuchstiere vor Beeinträchtigungen der kardialen Funktion sowie dilatativen Veränderungen geschützt. EDD und FS zeigten dieselbe Tendenz wie in den Untersuchungen drei Wochen post MI. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich bereits zu Beginn des Remodeling ein protektiver Effekt der NKA- α 2

Expression manifestiert und dass dieser selbst im fortgeschrittenem Krankheitsstadium erhalten bleibt. Da in den Untersuchungen lediglich Tiere mit einer Infarktgröße > 40 % eingeschlossen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die kardioprotektive Wirkung keine Bias-Effekte durch kleine Infarkten waren. In diesen Untersuchungen wurden Tiere mit ähnlichem Schädigungsmuster untersucht, weswegen angenommen werden kann, dass günstige Effekte auf die NKA- α 2 Überexpression zurückzuführen sind. Zwar kann eine Überexpression der NKA- α 2 auf langfristige Sicht die kardiale Funktion erhalten und ein pathologisches Remodeling verhindern, dennoch manifestiert sich keine Reduktion der Mortalität. Die ersten zwei Wochen nach MI-Induktion können als kritische Phase für das Überleben der Studienpopulation erachtet werden. Die NKA- α 2 Überexpression hat in dieser Phase zunächst keinen protektiven Effekt. Erst im späteren Verlauf entwickelt sich ein Vorteil für die NKA- α 2 Versuchstiere. Dies ist zum Teil auf den fehlenden protektiven Effekt auf die Wundheilung zurückzuführen. Zudem führt die chronische Ligatur zunächst in beiden Kohorten zu einer Minderversorgung des Herzens mit Sauerstoff und Substraten wie ATP. Letzteres bewirkt eine Isoform-unabhängige Inhibition der NKA, da sie auf ATP angewiesen ist. NKA- α 2 und WT Versuchstiere weisen eine ähnliche Gesamtexpression der NKA auf, sodass von einer ähnlichen Inhibition und hierdurch entsprechend ähnlichen negativen Konsequenzen ausgegangen werden kann. Die protektiven Effekte der NKA- α 2 manifestieren sich erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf. Dies deutet darauf hin, dass Prozesse beeinflusst werden, die sich erst im fortgeschrittenen Herzinsuffizienz-Stadium entwickeln und die in der Akutphase zunächst eine untergeordnete Rolle spielen. Dies könnte beispielsweise auf eine Beeinflussung der Adaptionsmechanismen hinweisen und die fehlenden Effekte der NKA- α 2 Überexpression auf die Mortalität erklären. Wenn die NKA- α 2 keine Komponenten der kritischen Phase ansteuert, kann auch keine Senkung der Mortalität erzielt werden. Durch Beeinflussung der Adaptionsmechanismen kann allerdings ein positiver Effekt auf Funktion und Remodeling realisiert werden, ohne dabei die Überlebenswahrscheinlichkeit zu beeinflussen. Um dies jedoch bestätigen zu können, wären weitere echokardiographische und gravimetrische Untersuchungen ein bzw. zwei Wochen post MI hilfreich. Bei Vorliegen einer vergleichbaren Funktion bzw. Morphologie von WT und NKA- α 2 Versuchstieren kann eine Einflussnahme auf die Adaptionsmechanismen als sicher angenommen werden.

Die positiven Effekte beschränken sich allerdings nicht nur auf dilatative und funktionale Veränderungen. So führte eine NKA- α 2 Überexpression zu einer Abmilderung von hypertrophen Veränderungen. Ebenso zeigte die NKA- α 2 Gruppe, im Vergleich zu den WT Versuchstieren, keine Erhöhung des relativen Lungengewichtes nach MI. Eine Erhöhung des Lungengewichtes steht mit einer erhöhten Lungenstauung in Verbindung.

Letztere tritt im Rahmen einer Herzinsuffizienz auf, wenn es aufgrund der funktionalen Beeinträchtigung des Herzens zu einem Blutrückstau im Lungenkreislauf kommt. Dies deutet ebenfalls auf eine ausgeprägtere Funktionseinschränkung der WT Herzen hin und folglich auf eine protektive Wirkung einer NKA- α 2 Überexpression. Letztere wirkt nicht nur im Kontext eines MI schützend. Es konnte ebenfalls ein protektiver Effekt im Rahmen einer chronischen Ligatur des Aortenbogens (TAC) nachgewiesen werden. So zeigten NKA- α 2 Versuchstiere ein geringeres hypertrophes Wachstum und auch eine bessere Funktion als WT Tiere. Diese Effekte waren nur mit einer kardialen Überexpression der NKA- α 2 verbunden. Bei Versuchstieren, welche die NKA- α 1 überexprimierten, konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden.⁹⁸

6.2 NKA- α 2 Überexpression moduliert $[Ca^{2+}]_i$ Spiegel und begünstigt hierdurch protektive Effekte

Die Analyse der Sarkomerverkürzung in Kardiomyozyten ergab eine interessante Beobachtung. So zeigten die MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten wider Erwarten eine geringere Kontraktilität als die entsprechenden WT Zellen. Dies steht zunächst im Widerspruch mit dem höheren FS, welches in den echokardiographischen Untersuchungen gemessen wurde. Die Untersuchung der diastolischen bzw. systolischen Sarkomerlängen in Abhängigkeit zur diastolischen bzw. systolischen $[Ca^{2+}]_i$ zeigte allerdings eine Desensibilisierung der Myofibrillen in den WT MI Versuchstieren, aber nicht in der NKA- α 2 Kohorte. Demzufolge benötigen NKA- α 2 MI Kardiomyozyten für dieselbe Sarkomerverkürzung eine geringere Menge an Ca^{2+} als die entsprechenden WT Zellen. Dies wiederum untermauert die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen, die auf einen stärker desensibilisierten Phänotyp der WT Tiere hinweisen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass bei den zellulären Messungen der Einfluss der Fibrose nicht zum Tragen kommt. Letztere hat jedoch auf Organebene durch Erhöhung der Steifigkeit einen Einfluss auf die Kontraktion und kann diese erschweren.¹⁰⁸ In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MI-behandelte NKA- α 2 Versuchstiere eine geringere Fibrose aufwiesen als die entsprechende WT Kohorte.¹⁰⁶ Die geringere Fibrosierung in den NKA- α 2 MI Herzen könnte durchaus ein Grund für die bessere kardiale Funktion in den echokardiographischen Untersuchungen sein. Ebenso würde es die widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse zwischen Messungen auf zellulärer Ebene und Organebene erklären.

Die Untersuchung des Ca^{2+} -Haushaltes zeigte eine Verringerung der systolischen $[Ca^{2+}]_i$ in den NKA- α 2 Kardiomyozyten. Dies wiederum steht größtenteils im Einklang mit der dazugehörigen beobachteten Kontraktilitätsveränderung der NKA- α 2 Zellen nach MI. Eine Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ ist mit pathologischen Veränderungen des Herzens assoziiert

und stellt somit zunächst einen Widerspruch zu den protektiven Effekten der NKA- $\alpha 2$ Überexpression dar. So zeigten beispielsweise *Beuckelmann et al.* eine Reduktion der Ca^{2+} -Transienten in humanen insuffizienten Kardiomyozyten.¹⁰⁹ Eine Verringerung der Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten von Herzinsuffizienz-Patienten wurde ebenfalls von *Piacentino et al.* beschrieben. Sie ermittelten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Kontraktionsamplitude zwischen gesunden und insuffizienten Zellen.¹¹⁰ Im Tiermodell konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Linksventrikuläre Kardiomyozyten von druckbelasteten, hypertrophierenden Katzenherzen wiesen ebenfalls niedrigere Ca^{2+} -Transienten auf. In diesem Fall kam es jedoch zu einer Beeinträchtigung der Kontraktion.¹¹¹ Im Rahmen eines chronischen MI konnten *Mørk et al.* allerdings eine gegenteilige Beobachtung machen, die mit dem Grundgedanken der hier vorliegenden Arbeit in Einklang steht. So zeigten die Kardiomyozyten MI-behandelter Mäuse eine stärkere Kontraktion und erhöhte Ca^{2+} -Transienten. Diese Veränderungen waren mit einer pathologischen Hypertrophie und kardialen Dysfunktion sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert.¹¹² Demzufolge können höhere systolische Ca^{2+} -Spiegel und eine verstärkte Kontraktilität im Kontext eines MI durchaus als ein maladaptiver Prozess betrachtet werden. Die Reduktion der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als Folge einer myokardialen Schädigungen wurde für NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere bereits in der Literatur beschrieben. So zeigten NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten auch nach TAC-Intervention niedrigere Ca^{2+} -Transienten als die entsprechenden WT Zellen. Auch in diesem Fall wirkte die NKA- $\alpha 2$ Überexpression protektiv gegenüber einer pathologischen Hypertrophie und Funktionseinbußen.⁹⁸ Somit scheinen eine Reduktion der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Kontraktilität Anpassungsmechanismen zu sein, die maladaptive Prozesse durchaus verhindern können, obwohl sie zunächst als widersprüchlich erachtet werden. Die Verringerung der Ca^{2+} -Transienten kann zudem als ein wesentliches Charakteristikum von NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten betrachtet werden, welches nach myokardialer Schädigung auftritt und unabhängig von der Schädigungsart mit kardioprotektiven Effekten assoziiert ist.

Darüber hinaus konnten auch Unterschiede in den diastolischen Ca^{2+} -Spiegeln zwischen WT und NKA- $\alpha 2$ nach MI ermittelt werden. NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere zeigten hier nicht nur eine geringere systolische, sondern auch eine niedrigere diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Eine erhöhte diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte bereits von verschiedenen Forschungsgruppen mit pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht werden. So konnte in insuffizienten humanen Kardiomyozyten ein Anstieg der basalen Ca^{2+} -Spiegel beobachtet werden.¹⁰⁹ Auch in Kardiomyozyten von Kaninchen, die einer Druck- und Volumenbelastung unterzogen wurden, wiesen *Baartscheer et al.* eine Erhöhung der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach. Dies war bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen zu

beobachten. Sie stellen zudem fest, dass sich bei einer diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ von 100 bis 150 nmol/l vermehrt spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR (sogenannte calcium after-transients) ereigneten, die zu späten Nachdepolarisationen führten. Letztere können an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein.¹¹³ Folglich verhindert eine niedrigere diastolische $[Ca^{2+}]_i$ die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen und schützt daher vor Arrhythmien. Zu beachten ist, dass durch die Fibrosierung vermehrt nicht-leitendes Gewebe (Kollagen) entsteht, welches per se die Entstehung von Arrhythmien begünstigt.⁴⁹ Die höheren diastolischen Ca^{2+} -Spiegel in WT Versuchstieren könnten im Kontext eines MI demzufolge einen weiteren Risikofaktor für lebensbedrohliche Arrhythmien darstellen und die kardiale Funktion entsprechend beeinträchtigen. NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere weisen hingegen eine niedrigere diastolische $[Ca^{2+}]_i$ auf. Diese scheint im Zusammenhang mit einem MI mit einem günstigeren Risikoprofil und einem besseren Outcome assoziiert zu sein. Gegen die erhöhte Arrhythmieeigung spricht allerdings die vergleichbaren Mortalitätsraten beider Gruppen. So ist zu erwarten, dass sich häufiger auftretende Arrhythmien durchaus in einer erhöhten Sterblichkeit der betroffenen Kohorte manifestieren. Um eine vermehrte Arrhythmieeigung nach MI in WT Tieren sicher feststellen bzw. ausschließen zu können, erfordert es einer langfristigen Untersuchung der Herzaktion mittels EKG. Dies könnte über ein Telemetrie-System erzielt werden, welches die Herzfunktion durch eine Sensor-Implantation über den gesamten Beobachtungszeitraum erfasst. Allerdings kann nur die Durchführung weiterer Experimente hierüber Aufschluss bringen.

WT Versuchstiere zeigten nach MI nicht nur eine höhere diastolische $[Ca^{2+}]_i$ als die MI-behandelte NKA- $\alpha 2$ Gruppe, sondern auch als die entsprechende Sham Kohorte, sodass eine diastolische Ca^{2+} -Akkumulation angenommen werden kann. Letztere wird durch eine NKA- $\alpha 2$ Überexpression verhindert. Demzufolge scheinen niedrigere diastolische Ca^{2+} -Spiegel nicht nur einen positiven Einfluss auf die Arrhythmieeigung zu haben, sondern auch auf die Funktion und das pathologische Remodeling.

Ca^{2+} spielt eine wichtige Rolle in der Herzfunktion und wird durch unterschiedliche Proteine engmaschig kontrolliert. Es aktiviert nicht nur die Myofilamente, sondern bestimmt auch die Kontraktionskraft des Herzens. Letzteres wird sowohl durch die Amplitude als auch die Kinetik der Ca^{2+} -Freisetzung beeinflusst. Die Relaxation der Kardiomyozyten wird durch die Entfernung des cytosolischen Ca^{2+} nach der sogenannten Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) unter Beteiligung von SERCA und dem NCX erzielt.¹¹⁴ Die CICR ist Teil der elektromechanischen Kopplung, bei der das ankommende Aktionspotential in eine Muskelkontraktion umgesetzt wird. Eine Depolarisation der Kardiomyozyten löst einen Ca^{2+} -Einstrom aus den Interstitium über den LTCC aus.¹¹ Ca^{2+} bindet an den RyR, der sich in der sarkoplasmatischen Membran

befindet. Dies führt zu einer weiteren Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR mittels RyR, welche als CICR bezeichnet wird.⁶⁰ Nach Diffusion interagiert das freie cytosolische Ca^{2+} schließlich mit dem Troponin C des Kontraktionsapparates. Dies führt schließlich zur Bindung des Myosins an Aktin und zur Verkürzung der Sarkomere, sodass eine Kontraktion entsteht.¹¹ In der Relaxationsphase wird die Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die SERCA, die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA), den NCX und den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) erzielt. Dies bewirkt eine Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C und eine Entspannung der Sarkomere.¹⁰⁷ Das Zusammenspiel zwischen NCX und SERCA bewirkt eine schnelle Relaxation der Myofilamente und ist für die Füllung der Ventrikel mit Blut in der Diastole verantwortlich. Die diastolische Funktion wird durch den Ca^{2+} -Abfall nach Freisetzung aus dem SR und der enddiastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bestimmt. Die Verringerung der Ca^{2+} -Spiegel bestimmt die Geschwindigkeit, mit der sich die Kardiomyozyten nach der Kontraktion wieder entspannen. Die enddiastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert hingegen in welchem Ausmaß die Relaxation stattfindet bzw. wie stark die diastolische Spannung ist. Die Steifigkeit der Kardiomyozyten wird nicht nur durch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sondern auch durch das Cytoskelett festgelegt.¹¹⁴

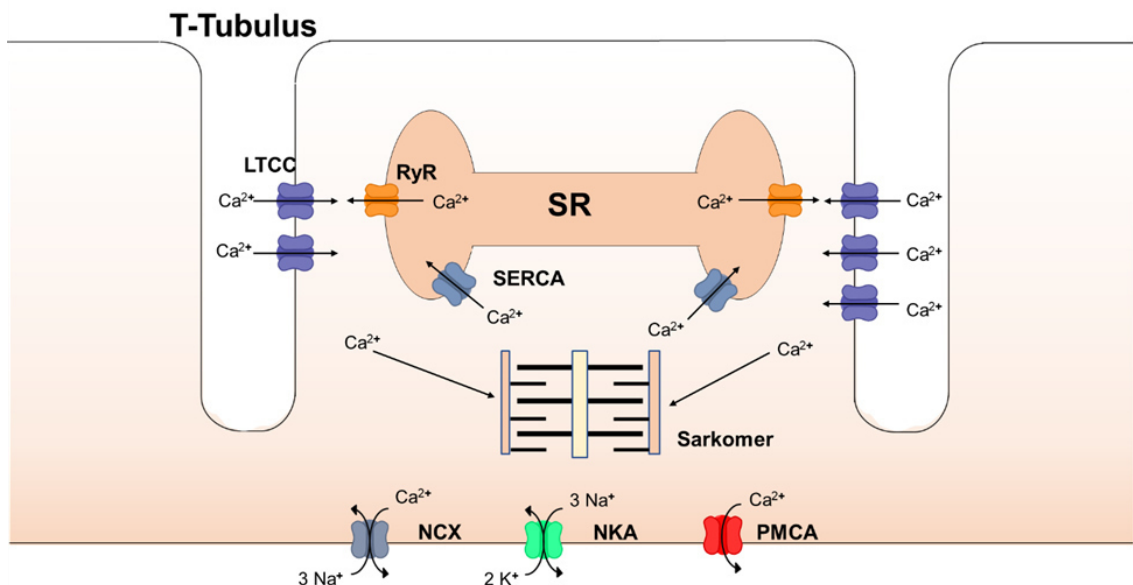


Abbildung 31: Elektromechanische Kopplung.

Das ankommende Aktionspotential löst einen Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) aus. Ca^{2+} bindet an den Ryanodinrezeptor (RyR) und führt hierdurch zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dies wird als sogenannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bezeichnet. Ca^{2+} interagiert schließlich mit dem Troponin C der Myofilamente, wodurch es zur Kontraktion der Sarkomere kommt. Die sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX) sind an einer Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beteiligt und vermitteln hierdurch die Muskelrelaxation. Die Na^+/K^+ -ATPase (NKA) reguliert die zelluläre Na^+ -Homöostase.

Dementsprechend könnten niedrigere diastolische Ca^{2+} -Spiegel, wie sie in NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten nach MI zu finden sind, zu einer schnelleren Inaktivierung und Entspannung der Myofilamente führen, was mit einer geringeren diastolischen Spannung und besseren Funktion einhergeht. Um dies nachzuweisen, könnte die diastolische Spannung gemessen werden. Sollte hier eine Erhöhung festgestellt werden, kann dies auf eine diastolische Dysfunktion hindeuten. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass nicht alle Forschungsgruppen vergleichbare Beobachtungen in Bezug auf die diastolischen Ca^{2+} -Spiegel machten. Beispielsweise konnten *Bailey & Houser* keinen Unterschied in der diastolischen und basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen druckbelasteten hypertrophierenden Katzen-Kardiomyozyten und den entsprechenden gesunden Kontrollen identifizieren.¹¹¹ Diese unterschiedlichen Beobachtungen können durchaus mit der verwendeten Spezies, dem Hypertrophie-Modell und der Methodik zusammenhängen.

Ein weiterer negativer Effekt, der durch eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ begünstigt wird, ist die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II (CaMK II), welche mit kardialen Erkrankungen assoziiert ist. Ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg bewirkt, dass Calmodulin (CaM) bis zu vier Ca^{2+} -Ionen bindet. Dieser Komplex wiederum bindet an der regulatorischen Domäne der CaMK II, die autoinhibitorische und CaM-bindende Bereiche enthält. Hierdurch wird die autoinhibitorische Region von dem aktiven Zentrum der katalytischen Domäne entfernt, wodurch es zur Aktivierung der CaMK II kommt. Anschließend kann eine Autophosphorylierung der CaMK II am Threonin287 des autoinhibitorischen Bereiches stattfinden, was zu einer chronischen Aktivierung führt. Diese bleibt dann selbst nach einem Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bestehen. Die CaMK II phosphoryliert verschiedene Ca^{2+} -regulierende Proteine, u.a. RyR, PLN und den LTCC. Die Phosphorylierung des PLN durch CaMK II findet am PLN-Threonin17 statt und führt zu einer Erhöhung der SERCA Aktivität und einer verstärkten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR.¹¹⁵ Demzufolge kann eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Lage sein die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Spiegel zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurde eine Untersuchung der SR Ca^{2+} -Beladung durchgeführt, die eine sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation in der WT Versuchskohorte nach chronischem MI nachwies. NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere waren hiervon unberührt. Dies wiederum lässt ebenfalls eine vermehrte CaMK II Aktivität im WT MI Myokard vermuten. In weiteren Untersuchungen konnte diese Annahme bestätigt werden. So zeigten WT MI Herzen eine erhöhte Autophosphorylierung am Threonin286 sowohl im Vergleich zur korrespondierenden Sham als auch NKA- $\alpha 2$ Gruppe.¹⁰⁶ Diese Ergebnisse lassen somit eine erhöhte SERCA Aktivität in MI-behandelten WT Kardiomyozyten vermuten, welche eine sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation begünstigt.

Widersprüchlich hierzu erscheint jedoch die in beiden Versuchskohorten erhöhte time to baseline 10 %, v.a. da keinerlei Unterschiede zwischen den MI-behandelten Kardiomyozyten identifiziert wurden. Eine Erklärung hierfür könnte eine Reduktion der SERCA Expression in WT MI Herzen sein. So könnte durch eine Downregulation bei gleichzeitig erhöhter SERCA Aktivität dennoch eine Verringerung der time to baseline 10 % erzielt werden. Weitere Experimente im Rahmen dieses Forschungsvorhabens zeigten in WT MI Versuchstieren eine Downregulation der SERCA Expression. So wurde in WT MI Herzen weniger SERCA exprimiert als in der WT Sham und MI-behandelten NKA- α 2 Gruppe. In NKA- α 2 Tieren fand trotz chronischen MI hingegen keine Verringerung der SERCA Proteinspiegel statt.¹⁰⁶ Die Reduktion der SERCA Expression kann die höhere diastolische $[Ca^{2+}]_i$ MI-behandelter WT Kardiomyozyten erklären. So würde eine downregulierte SERCA weniger Ca^{2+} in das SR pumpen, woraus sich höhere diastolische Ca^{2+} -Spiegel ergeben würden. Von dieser Annahme ausgehend könnte eine Minderung der SERCA Expression durchaus nicht Ursache der höheren diastolischen Ca^{2+} -Spiegel, sondern vielmehr Auswirkung des vermehrten CaMK II-vermittelten SR Ca^{2+} -Gehaltes sein. Dies könnte somit ein Versuch der Kardiomyozyten darstellen, einen weiteren sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Influx mittels SERCA zu beschränken. Demzufolge kann von einer vermehrt aktiven SERCA ausgegangen werden, die aber weniger exprimiert wird, wodurch insgesamt eine SERCA Aktivität zustande kommen könnte, die vergleichbar mit derjenigen der NKA- α 2 MI Gruppe ist. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei Analyse des RyR in einem Kaninchen-Herzinsuffizienzmodell. Insuffiziente Kaninchen wiesen zwar eine niedrigere RyR Expression auf, gleichzeitig fand aber eine verstärkte CaMK II-vermittelte Phosphorylierung statt, welche einen sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Efflux mittels RyR (Ca^{2+} -Leak) begünstigte.¹¹⁶ In Anbetracht dessen könnte in den NKA- α 2 Versuchstieren durch die geringere CaMK II Aktivität auch eine Verringerung des SR Ca^{2+} -Leaks stattfinden. Gleichzeitig könnte es in den WT Versuchstieren durch die verstärkte CaMK II Aktivierung zu einer Erhöhung des SR Ca^{2+} -Leaks kommen, was zu einer Erhöhung der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ führen kann. Dafür spricht, dass in der WT Kohorte ein signifikanter Anstieg der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zur Sham Vergleichsgruppe verzeichnet werden konnte. Gleichzeitig würde ein verstärkter SR Ca^{2+} -Leak eine sarkoplasmatische Ca^{2+} -Verarmung mit sich bringen. Die Ca^{2+} -Akkumulation im SR, welche in den MI-behandelten WT Versuchstieren stattfand, spricht allerdings gegen diese Hypothese. Zudem beobachteten *Ai et al.* eine erhöhte SR Ca^{2+} -Beladung in insuffizienten Kardiomyozyten erst nach CaMK II Inhibition.¹¹⁶ In den hier durchgeführten Experimenten konnte die erhöhte SR Beladung in der WT MI Kohorte aufgezeigt werden, in der allerdings gleichzeitig eine erhöhte CaMK II Aktivität

nachgewiesen wurde.¹⁰⁶ Die NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere zeigten nach MI jedoch keine signifikante Veränderung im SR Ca^{2+} -Gehalt. Da in der WT Kohorte nach MI ein stärkeres pathologisches Remodeling und gravierendere Funktionseinbußen auftraten, kann eine erhöhte sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ ebenso als ein maladaptiver Prozess betrachtet werden, der in den NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten unterbleibt. Zudem ist zu beachten, dass durch Verwendung unterschiedlicher Spezies und Herzinsuffizienz-Modelle durchaus abweichende Beobachtungen gemacht werden können. *Ai et al.* nutzten zur Induktion einer Herzinsuffizienz keine ischämische Schädigung, sondern eine Aorteninsuffizienz mit zusätzlicher Aortenkonstriktion.¹¹⁶ Somit handelt es sich um eine chronische Druck- und Volumenbelastung des Herzens und stellt damit einen unterschiedlichen Schädigungstypus dar, der entsprechend andere pathologische Veränderungen induzieren kann. Es ist zudem denkbar, dass zwar ein SR Leak in den WT MI Versuchstieren stattfindet, allerdings der Ca^{2+} -Influx mittels SERCA überwiegt, sodass es letztlich zu einer sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation kommt. In diesem Kontext kann der SR Ca^{2+} -Leak sogar als eine Art Kompensationsmechanismus betrachtet werden, der versucht dem erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt entgegenzuwirken. Für gewöhnlich wurde, anders als in den untersuchten WT MI Versuchstieren, allerdings eine Verringerung des SR Ca^{2+} -Gehaltes im Rahmen einer Herzinsuffizienz beschrieben. *Baartscheer et al.* konnten z.B. in insuffizienten Kaninchen-Kardiomyozyten einen verringerten SR Ca^{2+} -Gehalt im Vergleich zu gesunden Zellen nachweisen. Die Unterschiede manifestierten sich bei steigender Stimulationsfrequenz sogar noch stärker. Ebenso verringerte sich in den insuffizienten Kardiomyozyten der Ca^{2+} -Gradient entlang der sarkoplasmatischen Membran.¹¹³ Auch in humanen insuffizienten Kardiomyozyten wurde eine geringere $[\text{Ca}^{2+}]$ im SR beschrieben.¹¹⁰ Dies steht zunächst im Widerspruch zu dem Phänotyp, den WT Versuchstiere nach MI zeigten. Allerdings scheint eine sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation ebenso eine Veränderung zu sein, die im Kontext eines chronischen MI stattfindet. So zeigten auch *Mørk et al.*, dass ein chronischer MI zu einem erhöhten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehalt in Mäusen führt. Im fortgeschrittenem Herzinsuffizienzstadium konnten sie auch eine Verlängerung des Aktionspotentials feststellen. Letztere erhöhte den Ca^{2+} -Einstrom durch den LTCC und die Ca^{2+} -Transienten. Die verlängerte Aktionspotentialdauer war ebenso für die Erhöhung der sarkoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$ verantwortlich.¹¹² Demzufolge ist anzunehmen, dass sowohl eine Ca^{2+} -Akkumulation als auch eine Ca^{2+} -Verarmung des SR mit pathologischen Prozessen assoziiert ist. Dies deutet auf eine geringe Toleranz des SR Ca^{2+} -Gehaltes gegenüber Schwankungen hin. Aus physiologischer Sicht betrachtet scheint daher die Notwendigkeit einer engmaschigen Kontrolle der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Beladung gegeben zu sein, wobei weder eine zu hohe noch eine zu niedrige $[\text{Ca}^{2+}]$

toleriert wird. Somit scheint auch die fehlende sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation der NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten ein protektiver Anpassungsmechanismus zu sein, der pathologischen Prozessen entgegenwirkt. Die unterschiedliche SR Ca^{2+} -Beladung erklärt auch die beobachteten Unterschiede zwischen WT und NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren nach achtwöchigem MI in Hinblick auf Ca^{2+} -Transienten und Kontraktilität. Die geringere sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ führt in den MI-behandelten NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten zu niedrigeren Ca^{2+} -Transienten und einer verminderten Sarkomerverkürzung. Andersherum bewirkt genau diese höhere SR Ca^{2+} -Beladung die stärkere Kontraktilität und höheren systolischen Ca^{2+} -Spiegel in WT MI Tieren.

Zu erwähnen sei, dass *Correll et al.* bereits in unbehandelten Versuchstieren Unterschiede zwischen der NKA- $\alpha 2$ und WT Gruppe identifizieren konnten. Dies betraf sowohl die Ca^{2+} -Transienten als auch die SR Ca^{2+} -Beladung. Die NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten zeigten sowohl niedrigere Ca^{2+} -Transienten als auch eine niedrige sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ im Vergleich zu der WT Kohorte.⁹⁸ Was zunächst nach einem Widerspruch zu den vorliegenden Daten erscheinen mag, kann bei näherer Betrachtung auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Messlösung zurückzuführen sein. *Correll et al.* verwendeten eine Messlösung mit einer niedrigeren $[\text{Na}^+]$ und einer höheren K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]$). Die höhere $[\text{Na}^+]$ und niedrige $[\text{K}^+]$ der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Messlösung kann zu einer vergleichsweise höheren $[\text{Na}^+]_i$ führen, die letztlich den NCX in den reverse mode zwingt und hierdurch einen Ca^{2+} -Einstrom begünstigt. Dies würde letztlich zu einer vergleichsweise stärkeren SR Ca^{2+} -Beladung und folglich zu höheren Ca^{2+} -Transienten führen. Des Weiteren würde die höhere extrazelluläre $[\text{Na}^+]$ eine geringere NKA Aktivität begünstigen, was wiederum erneut die eine Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ mit entsprechenden Folgen mit sich bringt. Insgesamt könnten hierdurch die Unterschiede zwischen WT und NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten schließlich kaschiert werden, sodass unter Sham-Bedingungen beide Kohorten zunächst phänotypisch gleich erscheinen könnten.

Neben den zahlreichen Effekten der CaMK II auf Ca^{2+} -regulierende Proteine kann sie darüber hinaus hypertrophe Signalwege durch verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, wie z.B. myocytes enhancer factor 2 (MEF 2) oder activation protein 1 (AP-1).¹¹⁷ Folglich könnte die ausbleibende hypertrophe Reaktion in den NKA- $\alpha 2$ MI Versuchstieren auf eine mangelnde CaMK II Aktivität zurückzuführen sein. Umgekehrt, könnte die myokardiale Hypertrophie in den WT MI u.a. durch die verstärkte CaMK II Aktivierung zustande kommen. Um die Rolle der CaMK II in den NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren genauer zu charakterisieren sind weitere Experimente unabdinglich. Besonders wichtig hierfür wären eine Analyse der CaMK II Aktivität, z.B. mittels CaMK II Assay, sowie die Untersuchung der RyR2 Phosphorylierung mittels Western Blot.

Die geringeren diastolischen und systolischen Ca^{2+} -Spiegel sowie die fehlende sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulation könnte in NKA- α 2 MI Versuchstieren auf einen verstärkten NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux zurückzuführen sein. Die Applikation von Coffein zeigte, dass der NCX-vermittelte Ca^{2+} -Ausstrom in den NKA- α 2 MI Kardiomyozyten schneller stattfand als in den korrespondierenden WT Zellen. Dies lässt eine erhöhte MI-induzierte NCX Aktivität in NKA- α 2 Kardiomyozyten vermuten. Da der verstärkte NCX-vermittelte Ca^{2+} -Efflux sowohl als Folge einer vermehrten Expression als auch verstärkter Aktivität resultieren kann, wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei zeigten alle untersuchten Gruppen eine vergleichbare NCX Expression¹⁰⁶, was wiederum eine verstärkte NCX Aktivität in den MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten untermauert.

Ein weiterer interessanter Aspekt der hier zu tragen kommt ist, dass sich in NKA- α 2 Versuchstieren nach MI das Verhältnis zwischen SERCA- bzw. NCX-vermitteltem Ca^{2+} -Ausstrom ändert. So nimmt der NCX-vermittelte Ca^{2+} -Efflux in NKA- α 2 Versuchstieren einen höheren Anteil ein als bei der entsprechenden WT Kohorte.

In der Literatur wurde eine reduzierte NCX Aktivität bereits mit pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht. So zeigten Kaninchen mit chronischem MI eine Verringerung des NCX-abhängigen Ca^{2+} -Ausstroms nach Coffein-Applikation sowie einen geringeren I_{NCX} .¹¹⁸ Folglich kann sich eine Beschleunigung des NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux durchaus protektiv auf den Verlauf eines MI auswirken. Gleichzeitig wurden expressionelle und funktionale Veränderungen des NCX bereits von zahlreichen Forschungsgruppen beschrieben. So zeigten beispielsweise *Quinn et al.* in Kaninchen mit chronischem MI eine Erhöhung der NCX Expression bei gleichzeitiger Verringerung der NCX Aktivität.¹¹⁸ Untersuchungen von Patientenbiopsen des NYHA Stadiums IV konnten eine erhöhte NCX mRNA- und Proteinexpression nachweisen. So konnte bei einer dilatativen Kardiomyopathie ein Anstieg von 79 % in den NCX mRNA-Spiegeln und eine Erhöhung der NCX Proteinexpression von 36 % festgestellt werden. Bei einer ischämischen Kardiomyopathie waren die NCX mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen um 58 % und die Proteinexpression um 20 % erhöht.¹¹⁹

Die niedrigeren diastolischen und systolischen Ca^{2+} -Spiegel MI-behandelter NKA- α 2 Kardiomyozyten werden höchstwahrscheinlich durch die erhöhte NCX Aktivität verursacht. Letztere könnte selbst Folge einer verstärkten NKA- α 2 Aktivität sein, die durch eine verringerte PLM Expression zustande kommen könnte. So wurde bereits von einer reduzierten PLM Expression in NKA- α 2 Versuchstieren sowohl nach Sham- als auch TAC-Intervention berichtet⁹⁸, weswegen auch hier diese Vermutung naheliegt. Im Rahmen weiterer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass NKA- α 2 Versuchstiere nach chronischem MI eine geringere PLM Expression aufwiesen als die

entsprechende WT Gruppe. Zwischen Sham- und MI-behandelten NKA- α 2 Mäusen konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden.¹⁰⁶ Letzteres scheint zwar im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen zu stehen, allerdings steht dieses Ergebnis in völligem Einklang mit den hier ermittelten Ca^{2+} -Messungen nach Coffein-Applikation.

Interessanterweise gibt es bereits Hinweise auf die Existenz einer NKA- α 2 NCX Mikrodomäne, die an der Ca^{2+} -Regulation in Kardiomyozyten beteiligt ist.¹²⁰ Diese gemeinsame Mikrodomäne könnte die erhöhte NCX Aktivität in den MI-behandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten vermitteln. So könnte eine verstärkte NKA Aktivität in NKA- α 2 Kardiomyozyten zu einer Verringerung der subsarkolemmalen $[\text{Na}^+]$ führen, die einen Konzentrationsgradienten in der Mikrodomäne generiert. Dieser könnte wiederum eine verstärkte NCX Aktivität induzieren und somit die Triebkraft für einen vermehrten Ca^{2+} -Efflux mittels NCX darstellen. Um dies jedoch vollständig aufklären zu können, bedarf es Patch Clamp Messungen, welche ggf. subsarkolemmale Änderungen der $[\text{Na}^+]$ identifizieren können.

Insgesamt verringert eine NKA- α 2 Überexpression durch den vermehrten NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux die systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Spiegel nach MI. Darüber hinaus wird eine Ca^{2+} -Akkumulation im SR verhindert. Dieses bessere Ca^{2+} -Handling der NKA- α 2 Versuchstiere zeigt allerdings erst unter chronischen Belastungssituationen seinen protektiven Charakter. Um diese Hypothese zu bestätigen, bedarf es jedoch intrazellulärer Na^+ -Messungen aller Versuchsgruppen, insbesondere nach chronischem MI. Diese sollten unter ähnlichen Stimulationsbedingungen erfolgen wie die intrazellulären Ca^{2+} -Messungen, um eine direkte Korrelation zu erlauben. Es könnte hier der ratiometrische Farbstoff SBFI oder die Patch-Clamp Technik zum Einsatz kommen.

Auch andere Forschungsgruppen konnten einen positiven Effekt einer erhöhten NCX Aktivität bzw. Expression nachgewiesen werden. *Correll et al.* zeigten, dass eine kardiale NKA- α 2 Überexpression vor hypertrophen Prozessen und funktionaler Beeinträchtigung nach TAC-Intervention schützt. Unbehandelte NKA- α 2 Kardiomyozyten zeichneten sich hierbei durch einen schnelleren NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux aus.⁹⁸ *Hasenfuss et al.* konnten sogar einen Zusammenhang zwischen erhöhten NCX Proteinspiegeln und einer verbesserten diastolischen Funktion nachweisen. Sie zeigten, dass sich der frequenzabhängige Anstieg der diastolischen Kraft indirekt proportional zum NCX Proteingehalt verhielt und dass eine erhöhte NCX Expression zu einer verbesserten diastolischen Funktion beitrug.¹²¹ In PLM Knockout Mäusen konnte nach MI-Induktion ein ähnliches Ca^{2+} -Handling wie in NKA- α 2 Tieren nachgewiesen werden. Die PLM Knockout Versuchstiere zeigten nach chronischem MI einen höheren I_{NCX} als die

korrespondierende WT Kohorte. Die PLM Knockout MI Kohorte besaß zwar eine bessere kardiale Funktion, wies jedoch gleichzeitig ein erhöhtes Mortalitätsrisiko auf. Letzteres betraf nicht nur die MI- sondern auch die Sham-Behandlung, sodass von einer geringeren Toleranz gegenüber operationsinduzierten Stress ausgegangen wurde.¹²² Auch in diesem Fall kann das Modell der gemeinsamen NKA-NCX Mikrodomäne zur Erklärung der physiologischen Prozesse herangezogen werden. Ein PLM Knockout kann über eine verstärkte NKA Aktivität den NCX aktivieren, was sich letztlich in Form eines erhöhten I_{NCX} nachweisen lässt. Diese Ergebnisse bestätigen die hier vorliegende Annahme einer indirekten NCX-Aktivierung mittels Reduktion der PLM Expression.

Auch in weiteren Experimenten konnte der protektive Charakter einer erhöhten NCX Aktivität nachgewiesen werden. So führte z.B. eine adenovirale NCX Überexpression in Kaninchen zu einem besseren FS des insuffizienten Myokards. Auf zellulärer Ebene konnte hingegen eine andere Beobachtung gemacht werden. Hier zeigten insuffiziente Kardiomyozyten, die einer NCX Überexpression *ex vivo* unterzogen wurden, eine verringerte Kontraktilität.¹²³ Ähnliches wurde ebenfalls in den MI-behandelten NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren nachgewiesen. Trotz eines besseren FS manifestierte sich auf zellulärer Ebene eine geringere Kontraktilität im Vergleich zur entsprechenden WT Kohorte. Erst der Vergleich der Sarkomerlängen in Abhängigkeit zur $[Ca^{2+}]_i$ bestätigte den kardialen Desensibilisierungsprozess in der MI-behandelten WT Kohorte.

Zusammenfassend betrachtet weisen MI-behandelte NKA- $\alpha 2$ Versuchstiere demnach eine höhere NCX Aktivität auf, die wahrscheinlich auf eine Reduktion des inhibitorischen Proteins PLM und Verringerung der subsarkolemmalen $[Na^+]_i$ in der Mikrodomäne zurückzuführen ist. Die verstärkte NCX Aktivität generiert einen verstärkten Ca^{2+} -Efflux, wodurch eine sarkoplasmatische Ca^{2+} -Akkumulierung sowie erhöhte diastolische und systolische Ca^{2+} -Spiegel verhindert werden. Dies manifestiert sich in Form einer geringeren sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Beladung, niedrigeren Ca^{2+} -Transienten, einer verringerten Kontraktilität und einer ausbleibenden Desensibilisierung. Zudem kommt es auch zu einer geringeren CaMK II Aktivität, wodurch einem SR Ca^{2+} -Leak mittels RyR, einer erhöhten SERCA Aktivität und einer Aktivierung pro-hypertropher Signalwege entgegengewirkt wird. Diese Veränderungen in der zellulären Homöostase führen letztlich zu einem geringeren pathologischem Remodeling und einer verbesserten kardialen Funktion.

6.3 Eine NKA- α 2 Überexpression verhindert eine Desensitisierung β -adrenerger Signalwege

Die Downregulation β 1AR ist eine Maladaptation, die im Rahmen einer Herzinsuffizienz auftritt und zu einer verringerten Ansprechbarkeit gegenüber β -adrenergen Stimuli führt.²⁸ Die Untersuchungen an NKA- α 2 Versuchstieren ergaben, dass diese nach chronischem MI besser auf den β -adrenergen Agonisten ISO ansprachen. So steigerte ISO sowohl die Kontraktilität als auch die Ca^{2+} -Transienten. Dieser Effekt konnte in den WT MI Tieren nicht beobachtet werden. Letztere zeigten einen stark desensitisierten Phänotyp, der nicht mehr auf β -adrenerge Stimuli reagierte. Western Blot Analysen deuteten darauf hin, dass eine unterschiedliche β 1AR Expression eine Rolle spielen könnte. Die WT MI Kohorte zeigte signifikant niedrigere β 1AR Proteinspiegel als die korrespondierende NKA- α 2 Gruppe. Im Expressionsniveau der β 2AR traten hingegen in keiner der Subgruppen Veränderungen auf. Die bessere kardiale Funktion der NKA- α 2 MI Versuchstiere könnte demnach auf die fehlende Downregulation der β 1AR zurückzuführen sein und könnte darüber hinaus positive Effekte gegenüber der Sympathikushyperaktivität vermitteln. Durch die erhaltene Herzfunktion könnte es zu einer verringerten Aktivierung des sympathischen Nervensystems kommen. Dies würde entsprechend die Sekretion von Katecholaminen verringern, sodass deren Wirkung an den entsprechenden Zielorganen reduziert werden könnte. Hierdurch würde sowohl die Nachlast- als auch die Vorlast-erhöhende Wirkung des Sympathikus herabgesetzt werden, wodurch es zu einer geringeren Belastung des Herzens kommt. Die geringere Katecholamin-Sekretion könnte ebenfalls einer Aktivierung β 1AR im juxtaglomerulären Apparat der Niere entgegenwirken. Dies würde sich letztlich in Form einer geringeren Renin-Sekretion, einer verringerten RAAS-Aktivierung und einer Reduktion des RAAS-vermittelten Remodelings manifestieren. Gleichzeitig können geringere Spiegel an zirkulierenden Katecholaminen einer Downregulation β 1AR entgegenwirken, da hier keine Überstimulation mit entsprechender Aktivierung der desensitisierenden Kinasen GRK und PKA stattfindet. Folglich könnten ein Teil der protektiven Effekte der NKA- α 2 Überexpression durchaus mit der Stabilisierung der β -adrenergen Signaltransduktion einhergehen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären jedoch Messungen der Noradrenalin-Plasmaspiegel erforderlich. Sollten die NKA- α 2 Versuchstiere nach MI geringere Noradrenalin-Plasmaspiegel als die WT MI Kohorte aufweisen, würde dies für eine geringere sympathotone Aktivierung sprechen. Falls eine geringere Sympathikusaktivierung vorhanden sein sollte, würde dies auch gleichzeitig ein milderer Ungleichgewicht zwischen sympathischer und parasympathischer Aktivität bedeuten, wodurch ein weiterer Bestandteil der neurohumoralen Aktivierung in seiner Wirkung

abgeschwächt werden würde. In der ATRAMI Studie konnte bereits belegt werden, dass eine Dysbalance des autonomen Nervensystems mit einer vagalen Hypo- und einer sympathischen Hyperaktivität die Mortalität nach MI erhöht (genauer s. 1.6.2.3). Um das Verhältnis zwischen Sympathikus- und Parasympathikusaktivität zu bestimmen kann die BRS oder HRV analog der ATRAMI Studie herangezogen werden. Die BRS wurde durch intravenöse Gabe von Phenylephrin und einer Blutdruck- und Herzfrequenzmessung bestimmt. Für die HRV wurde hingegen die Ermittlung des 24 Stunden SDNN mittels elektrokardiographischer Untersuchung verwendet.³⁵ Da die BRS-Bestimmung aufgrund der Phenylephrin-Injektion eine stärkere Belastung darstellt, die evtl. eine erhöhte Sterblichkeit in den ohnehin bereits belasteten MI-Tieren mit sich bringen könnte, wäre die Analyse der HRV mit Hilfe eines telemetrischen Systems vorzuziehen.

Als Ursache der erhaltenen β 1AR Expression in den MI-behandelten NKA- α 2 Versuchstieren kommt nicht nur die verringerte Sympathikusaktivität in Frage, sondern auch die verstärkte NCX Aktivität. So gibt es in der Literatur bereits Hinweise, die auf eine Beteiligung des NCX an der Erhaltung der β -adrenergen Funktion schließen lassen. In NCX-überexprimierenden Kaninchen konnte bereits eine bessere Ansprechbarkeit gegenüber ISO nach Herzinsuffizienz-Induktion nachgewiesen werden.¹²³ In NCX Knockout Tieren hingegen zeigten *Gao et al.* eine verminderte Ansprechbarkeit gegenüber β -adrenergen Stimuli. So führte hier eine ISO-Injektion kaum zu einer Erhöhung der Herzfrequenz.¹²⁴ Somit scheint auch die erhöhte NCX Aktivität eine entsprechend protektive Wirkung gegenüber desensitisierenden Prozessen in den NKA- α 2 MI Versuchstieren zu begünstigen.

WT MI Kardiomyozyten zeigten unter basalen Bedingungen eine höhere systolische und diastolische $[Ca^{2+}]_i$ als die korrespondierende NKA- α 2 Gruppe. Gleiches konnte bei einer β -adrenergen Stimulation mit ISO beobachtet werden. Somit verhindert eine NKA- α 2 Überexpression selbst während einer β -adrenergen Stimulierung eine Erhöhung der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ nach MI. Dies könnte ebenfalls auf eine verminderte sympathische Hyperaktivität hindeuten, welche für gewöhnlich Funktionsverlust und pathologisches Remodeling vorantreibt. Verantwortlich hierfür könnte die erhöhte NCX Aktivität in den NKA- α 2 MI Kardiomyozyten sein. Letzere bewirkt, dass die systolische und diastolische $[Ca^{2+}]_i$ selbst während einer chronischen Sympathikusaktivierung auf einem niedrigen Niveau bleiben kann, wodurch einer Beeinträchtigung der Herzfunktion sowie hypertrophen und maladaptiven Prozessen entgegengewirkt wird.

In Hinblick auf die diastolischen Ca^{2+} -Spiegel konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. So verursachte eine ISO-Applikation in

Sham-behandelten WT Kardiomyozyten eine Erhöhung der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$. Dies konnte nur noch in MI-behandelten NKA- $\alpha 2$ Zellen beobachtet werden. Eine MI-Induktion führte in den WT Versuchstieren hingegen zu einem Ausbleiben dieser Reaktion. Welche genaue Bedeutung und Auswirkung diese Veränderung auf die kardiale Funktion und das Remodeling im Kontext eines MI hat bleibt jedoch offen.

Die $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ sind durch den NCX eng miteinander gekoppelt⁵⁹ (s. 1.8) und unterliegen damit einer wechselseitigen Beeinflussung. Dementsprechend ist die Ermittlung der $[Na^+]_i$ ein guter Parameter um Erkenntnisse aus erfolgten Ca^{2+} -Messungen zu untermauern. Die Messung der $[Na^+]_i$ in unbehandelten Versuchstieren ermöglichte es eine unterschiedliche Reaktion nach β -adrenerger Stimulation zu identifizieren. So besitzen WT und NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten zwar eine ähnliche $[Na^+]_i$, dennoch kann nur in NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren ein Anstieg der Na^+ -Spiegel nach β -adrenerger Stimulation beobachtet werden. So könnte die Erhöhung der $[Na^+]_i$ auf einer Inhibition der NKA- $\alpha 2$ beruhen, die nur bei einer NKA- $\alpha 2$ Überexpression zum Tragen kommt. Dieser Effekt könnte ebenfalls in den MI-Versuchstieren auftreten, und die verbesserte Kontraktilität der NKA- $\alpha 2$ Kardiomyozyten erklären. So würde die transiente Erhöhung der $[Na^+]_i$ den NCX in den reverse mode zwingen, wodurch es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Influx und einer verstärkten Kontraktilität kommt. Experimentell konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, sodass dementsprechend weitere Untersuchungen für die Entschlüsselung der genauen Funktionsweise erforderlich sind.

NKA- $\alpha 2$ und WT Sham Kardiomyozyten wiesen allerdings vergleichbare diastolische und systolische Ca^{2+} -Spiegel auf, was auf eine ähnliche NCX Aktivität zurückzuführen ist und durch entsprechende Ca^{2+} -Messungen nach Coffein-Applikation bestätigt wurde. Für gewöhnlich bewirkt eine β -adrenerge Stimulierung eine Phosphorylierung von PLM mittels PKA, wodurch dessen inhibitorische Wirkung aufgehoben und die NKA aktiviert wird. Dies resultiert in einem verstärkten Na^+ -Efflux und damit einer Verringerung der $[Na^+]_i$.⁷⁶ Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Beobachtungen in den vorliegenden Na^+ -Messungen könnten letztlich auf die genetischen Unterschiede der verwendeten Mauslinien beruhen. So verwendeten *Despa et al.* in ihren Experimenten Versuchstiere des C57B/6 Stammes.⁷⁶ In murinen Kardiomyozyten dieses Stammes stellt die NKA- $\alpha 1$ die prädominierende Isoform dar.⁶⁵ Somit kann es durchaus sein, dass eine β -adrenerge Stimulierung die NKA- $\alpha 1$ aktiviert, wohingegen die NKA- $\alpha 2$ inhibiert wird. Um dies weiter aufklären zu können, bedarf es allerdings NKA Aktivitätsmessungen. Diese können mit Kardiomyozyten von NKA- $\alpha 1$ überexprimierenden und mit NKA- $\alpha 2$ Versuchstieren durchgeführt werden. Hierdurch könnte der Effekt einer β -adrenergen Stimulierung der jeweiligen Isoform zugeordnet und weiter aufgeklärt werden.

Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz bei gleichzeitiger ISO-Applikation brachte noch weitere Eigenschaften der NKA- α 2 Kardiomyozyten hervor. Die unbehandelten NKA- α 2 Versuchstiere zeigten bei einer Stimulation von 5 Hz und ISO-Perfusion im Rahmen von NAD/FADH Messungen eine signifikant bessere Kontraktilität als die WT Versuchstiere. Dies blieb selbst in der anschließenden Washout Phase erhalten, in der ISO durch Normaltyrode ersetzt und die elektrische Stimulation auf 0,5 Hz reduziert wurde. Somit scheinen sich die Kontraktilitätsunterschiede zwischen NKA- α 2 und WT erst bei einer höheren Stimulationsfrequenz zu manifestieren. Dies ist wahrscheinlich der hohen physiologischen Ruheherzfrequenz von Mäusen geschuldet. Diese beträgt etwa 500 – 700 bpm,¹²⁵ was einer Frequenz von ca. 8 bis 12 Hz entspricht. Wenn man bedenkt, dass dies die Ruhfrequenz ist und eine β -adrenerge Stimulation die Herzfrequenz noch weiter erhöht, kann es durchaus sein, dass sich erst bei Annäherung an die physiologische Herzfrequenz bestimmte Charakteristiken manifestieren. Bei 0,5 Hz und ISO-Stimulation konnten hingegen keine Unterschiede identifiziert werden. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen in den Sham-behandelten Versuchstieren überein, bei denen ebenfalls eine ähnliche Sarkomerverkürzung zwischen WT und NKA- α 2 nach β -adrenerger Stimulation bei 0,5 Hz nachgewiesen werden konnte. Eine β -adrenerge Stimulierung scheint bei den NKA- α 2 Versuchstieren zudem länger erhalten zu bleiben, da selbst in der Washout Phase eine erhöhte Kontraktilität in den NKA- α 2 Kardiomyozyten ermittelt wurde. Eine Messung bei 5 Hz und ISO-Perfusion stellt eine Stresssituation für die Kardiomyozyten dar, die durchaus eine gewisse Arrhythmogenität birgt und oxidativen Stress mit sich bringen kann. Die erhöhte Kontraktilität in den NKA- α 2 Kardiomyozyten ging jedoch weder mit einer erhöhten Arrhythmieeigung noch mit einer Veränderung des Redoxstatus einher. Folglich scheint es, dass NKA- α 2 Versuchstiere chronischen sympathotonen Stress besser tolerieren können als WT Tiere.

Die zahlreichen beobachteten Zusammenhänge zwischen sympathischen System und der NKA- α 2 gaben Anlass zur Vermutung einer wechselseitigen Beeinflussung und einer möglichen Interaktion zwischen NKA- α 2 und β 1AR, sodass Co-IP Experimente durchgeführt wurden. Die Co-IP Studien eröffneten hierbei eine Interaktion zwischen der NKA- α 2 und dem β 1AR. Dies konnte sowohl in NKA- α 2 als auch in WT Herzen nachgewiesen werden. Der β 1AR stellt jedoch nicht den ersten Interaktionspartner der NKA dar. In der Literatur wurde bereits mehrfach von einer Interaktion der NKA mit verschiedenen Proteinen berichtet. *Hazelwood et al.* konnten mittels Co-IP eine Wechselwirkung zwischen der NKA- α 1 und dem Dopamin-Rezeptor 1 (D1R) bzw. dem Dopamin-Rezeptor 2 (D2R) in HEK293T Zellen nachweisen. Diese Interaktion hatte einen wechselseitigen Einfluss auf die Expression und Funktion der beteiligten Proteine.

So führte eine Überexpression der NKA- α 1 in zu einer Verringerung der Dichte an D1R und D2R sowie zu einer geringeren Aktivität beider Rezeptoren. Eine Inhibition der NKA- α 1 mit Ouabain oder siRNA wiederum aktivierte die dopaminergen Rezeptoren. Umgekehrt führte die Expression von D1R und D2R zu einer Verringerung der NKA Funktion.¹²⁶ Ebenso konnten mittels verschiedener Co-IP Studien eine Interaktion mit dem Mammalian transient receptor potential canonical (TRPC) 5 und TRPC 6 identifiziert werden. So konnte in Rattenhirnlysaten eine Bindung zwischen NKA- α 3, der prädominierenden Isoform im Gehirn, und TRPC 5- bzw. TRPC 6-Kanälen nachgewiesen werden. Auch der Nachweis einer Interaktion zwischen NKA- α 1 und TRPC 6 gelang in Rattennieren und in HEK293 Zellen, die stabil das humane TRPC 6 exprimierten.¹²⁷ Somit scheint eine Interaktion zwischen NKA- α 2 und β 1AR durchaus plausibel und könnte entsprechende Beobachtungen in NKA- α 2 Versuchstieren, wie beispielsweise die verbesserte β -adrenerge Ansprechbarkeit nach MI, erklären. So könnte der β 1AR über eine vermehrte Bindung an die NKA- α 2 deren Funktion beeinflussen. Die Quantifizierung der Co-IP ergab jedoch ein unerwartetes Ergebnis: so fiel die Interaktion in den NKA- α 2 Versuchstieren geringer aus als in der WT Kohorte. Dies könnte einerseits der Überexpression der NKA- α 2 geschuldet sein. Andererseits könnte diese Beobachtung die Erklärung zu den erhöhten Na^+ -Spiegeln in NKA- α 2 Versuchstieren nach ISO Applikation liefern. Der β 1AR könnte z.B. über eine physische Interaktion die Aktivierung der NKA- α 2 vermitteln. Da diese Wechselwirkung in den NKA- α 2 Kardiomyozyten wesentlich geringer ausfällt, könnte daraus ein Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ resultieren. Ebenso könnte diese Interaktion am Erhalt der β -adrenergen Stimulierbarkeit nach MI in NKA- α 2 Versuchstieren beteiligt sein. Hierfür wären allerdings weitere Co-IP Studien in MI-behandelten Tieren erforderlich um mögliche Veränderungen im Ausmaß der Interaktion festzustellen. Des Weiteren spricht diese verringerte Bindung zwischen NKA- α 2 und β 1AR für ein effizienteres β -adrenerges Signaling, welches einer geringeren Aktivierung bedarf. Bei der hier vorliegenden Co-IP Studie konnte lediglich der β 1AR präzipitiert und die NKA- α 2 detektiert werden, da der β 1AR das gleiche Molekulargewicht wie die verwendeten IgGs besitzt. Letzteres führt dazu, dass der β 1AR nicht eindeutig detektiert werden kann. Genau hier liegt dementsprechend die Limitation dieser Untersuchung. Für eine weitere Charakterisierung und Verifizierung der Interaktion zwischen β 1AR und NKA- α 2 sind demzufolge weitere Studien mit aufwendigeren technischen Mitteln erforderlich. Hierbei könnte die Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC MS/MS) zum Einsatz kommen. Als Orientierung könnte hier das Protokoll von *Hazelwood et al.* herangezogen werden. Zunächst wäre eine Immunpräzipitation der NKA- α 2 mit anschließender SDS-PAGE erforderlich. Als Kontrollbedingung dienen

erneut die korrespondierenden IgGs. Alle durch die Coomassie-Färbung sichtbar werdenden Banden müssen entsprechend herausgeschnitten und einem Trypsin-Verdau unterzogen werden. Die so aufbereiteten Proben können schließlich mittels LC MS/MS analysiert werden, wodurch letztlich die Interaktion bestätigt oder widerlegt werden kann.¹²⁶

Insgesamt bleibt die β -adrenerge Ansprechbarkeit in MI-behandelten NKA- α 2 Tieren aufgrund einer ausbleibenden β 1AR Downregulierung erhalten. Dies könnte zum einen die bessere kardiale Funktion erklären zum anderen das verringerte Remodeling. Der Erhalt der β -adrenergen Reserve würde letztlich einer Hyperaktivität des Sympathikus mit einergehender RAAS-Aktivierung, pathologischem Remodeling sowie Funktionsverlust entgegenwirken. Die erhöhte NCX Aktivität in den NKA- α 2 MI Kardiomyozyten bewirkt, dass selbst während einer β -adrenergen Stimulierung die systolische und diastolische $[Ca^{2+}]_i$ auf einem niedrigen Niveau bleibt. Hierdurch werden maladaptiven Prozessen und kardialen Funktionseinbußen entgegengewirkt. In unbehandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten führt eine ISO-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der $[Na^+]_i$ – ein Effekt der in WT Zellen trotz vergleichbarer basaler Na^+ -Spiegel nicht beobachtet werden kann und womöglich auf eine Inhibition der NKA- α 2 zurückzuführen ist. Darüber hinaus führt eine β -adrenerge Stimulierung erst bei hoher Stimulationsfrequenz zu einer gesteigerten Kontraktilität von unbehandelten NKA- α 2 Kardiomyozyten. Dieser Effekt bleibt selbst bei reduzierter Stimulationsfrequenz und Entfernung des Agonisten erhalten und beeinflusst weder den Redoxstatus noch die Arrhythmieneigung der Zelle, weswegen von einer höheren Toleranz der NKA- α 2 Versuchstiere gegenüber β -adrenergen Stress ausgegangen werden kann. Der β 1AR könnte über eine physische Interaktion die Aktivierung der NKA- α 2 vermitteln, welche allerdings in NKA- α 2 Versuchstieren geringer ausfällt und hier zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$ nach β -adrenerger Stimulierung führt. Die geringere Interaktion zwischen β 1AR und NKA- α 2 in unbehandelten NKA- α 2 Versuchstieren spricht zudem für ein effizienteres β -adrenerges Signaling, welches per se einer geringeren Aktivierung bedarf.

7. MÖGLICHER MECHANISMUS DER KARDIOPROTEKTIVEN WIRKUNG WÄHREND EINES CHRONISCHEN MI

Eine NKA- $\alpha 2$ Überexpression führt zu einer verstärkten NCX Aktivität nach chronischem MI. Hierbei kann der NKA- $\alpha 2$ vermittelte Na^+ -Efflux einen Konzentrationsgradienten in der NKA- $\alpha 2$ NCX Microdomäne bilden, der letztlich eine Erhöhung der NCX Aktivität bewirkt. Dies führt zu einer niedrigeren diastolischen und systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sowie einer reduzierten SR Ca^{2+} -Beladung. Die niedrigeren Ca^{2+} -Spiegel und die verminderte sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ resultieren in einer zwar verminderten Kontraktilität der Kardiomyozyten, aber einer gleichzeitig ausbleibenden Ca^{2+} -Desensibilisierung der Sarkomere. Gleichzeitig bewirken die niedrigeren Ca^{2+} -Spiegel höchstwahrscheinlich eine geringere Aktivierung der CamK II, wodurch das pro-hypertrophe Signaling und der SR Ca^{2+} -Leak mittels RyR verhindert wird. Zudem kommt es, vermutlich aufgrund der verstärkten NCX Aktivität, zu einer Stabilisierung der $\beta 1\text{AR}$ Expression und folglich zu einer besseren β -adrenergen Ansprechbarkeit nach chronischem MI. Dies kann, zusammen mit der besseren kardialen Funktion, eine geringere Aktivierung des Sympathikus bewirken, sowie eine verminderte Ausschüttung von Katecholaminen. Letzteres würde sich auch in Form einer geringeren RAAS Aktivierung manifestieren, da die $\beta 1\text{AR}$ im juxtaglomerulären Apparat in einem geringeren Maß stimuliert werden. Des Weiteren könnte ebenfalls eine Verminderung der sympathischen und parasymphathischen Dysbalance stattfinden. Insgesamt kann es somit während des chronischen MI zu einer geringeren neurohumoralen Aktivierung kommen und zu einem Durchbrechen des Circulus vitiosus, welches sich schließlich in Form einer besseren kardialen Funktion und einer geringeren Hypertrophie manifestiert (Abbildung 32).

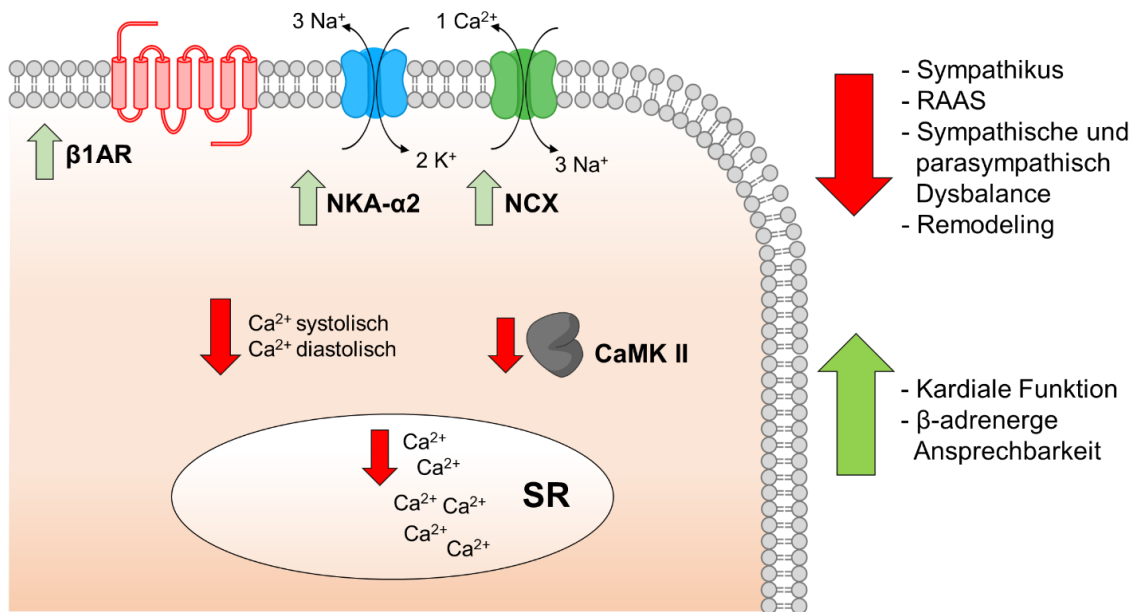


Abbildung 32: Möglicher Mechanismus über den die protektive Wirkung einer NKA-α2 Überexpression vermittelt wird.

Die verstärkte NKA-α2 Expression in NKA-α2 Versuchstieren kann einen verstärkten Na⁺-Efflux begünstigen, welcher einen Konzentrationsgradienten in der NKA-α2 NCX Mikrodomäne generiert. Letzteres führt nach chronischem MI zu einer vermehrten NCX Aktivität, wodurch es zu einer Verminderung der systolischen und diastolischen [Ca²⁺]_i, sowie der SR Ca²⁺-Belastung kommt. Diese Effekte können womöglich eine Stabilisierung der β1AR Expression und eine Verringerung der CaMK II Aktivität vermitteln. Letztlich würde dies zu einer Verringerung der neurohumoralen Aktivierung beitragen, welche sich in Form einer verbesserten kardialen Funktion und β-adrenergen Ansprechbarkeit sowie einer geringeren Hypertrophie manifestiert.

8. AUSBLICK

Die Überexpression der NKA- $\alpha 2$ kann als eine Methode betrachtet werden, um auf genetischem Wege eine Aktivierung der NKA- $\alpha 2$ zu erzielen, da hierfür bis heute noch keine kommerziell erwerblichen Agonisten erhältlich sind. Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass die Aktivierung der NKA- $\alpha 2$ ein vielversprechendes Target dargestellt, um pathologischem Remodeling und funktionalen Beeinträchtigung im Rahmen einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Ebenso kann die Aktivierung der NKA- $\alpha 2$ einer Downregulation der $\beta 1AR$ entgegenwirken, wodurch eine positiv inotrope Wirkung erzielt wird, ohne dabei eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und damit Depolarisation der Kardiomyozyten zu erzielen, wie sie beispielsweise Digitalisglykoside oder Milrinon hervorrufen. Die Aktivierung der NKA- $\alpha 2$ hat somit einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Inotropika: eine vermutlich fehlende Arrhythmieinduktion, da keine Depolarisation der Membran stattfindet. Gleichzeitig führt eine NKA- $\alpha 2$ Aktivierung zu einem vermehrten Na^+ - und NCX-vermittelten Ca^{2+} -Efflux, wodurch eine Na^+ - und Ca^{2+} -Akkumulation mit den daraus resultierenden pathologischen Prozessen verhindert wird.

Pessôa et al. haben verschiedene Digoxin-Derivate synthetisiert, darunter einen spezifischen NKA- $\alpha 2$ Agonisten, der als BD-8 bezeichnet wird. BD-8 induzierte bei jeder getesteten Konzentration eine Aktivierung der NKA- $\alpha 2$. Gleichzeitig blieben die NKA- $\alpha 1$ und NKA- $\alpha 3$ in ihrer Aktivität unbeeinflusst.¹²⁸ BD-8 könnte daher zur Bestätigung der protektiven Effekte einer NKA- $\alpha 2$ Aktivierung verwendet werden. Zunächst müsste allerdings geklärt werden, ob eine Aktivierung der NKA- $\alpha 2$ auch in Kardiomyozyten erzielt werden kann, da die Experimente in transfizierten Sf9 Insektenzellen durchgeführt wurden.¹²⁸ Hierfür würden sich Assays eignen, welche die NKA Aktivität messen oder Patch-Clamp Analysen. Sollte sich die NKA- $\alpha 2$ Aktivierung auch in Kardiomyozyten bestätigen, könnte mit der in vivo Testung begonnen werden. Hierzu müssten zeitgleich mit der MI-Induktion osmotische Minipumpen implantiert werden, die entweder den NKA- $\alpha 2$ Agonisten oder ein Placebo enthalten. Für diese Eingriffe sollte auf den C57BL/6J Stamm verzichtet werden, da die Verwendung dieses Stammes aufgrund einer Mutation im Nicotinamid Nucleotid Transhydrogenase (Nnt) Gen durchaus eine gewisse Problematik in Hinblick auf kardiovaskuläre Krankheitsmodelle mit sich bringt. Es wurde nachgewiesen, dass eben diese Mutation im Nnt-Gen zu einer Protektion gegenüber TAC-induziertem Remodeling-Prozessen führt.¹²⁹ Diese Mutation ist auf eine Multi-Exon Deletion zurückzuführen. Hierdurch kommt es zum Knockout der Nnt, weswegen dieses Enzym in dem C57BL6/J Stamm vollständig fehlt. Die Nnt katalysiert in den Mitochondrien die Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH durch Oxidation von NADH

zu NAD.¹³⁰ Die Nnt regeneriert unter physiologischen Bedingungen das antioxidativ-wirkende NADPH mit Hilfe von NADH. Im pathologischen Kontext, während dem es zu einer erhöhten Belastung der Mitochondrien kommt, oxidiert die Nnt allerdings NADPH zu NADP⁺, wodurch die antioxidativen Effekte vermindert werden. Dies begünstigt die Entstehung von ROS in den Mitochondrien, trägt zu Nekrose und Fibrosierung im Herzen bei und beeinträchtigt die kardiale Funktion. Die fehlende Expression der Nnt in den C57BL6/J Mäusen führt zu einem Ausbleiben dieser Reaktion und damit zu einem verringertem oxidativen Stress und maladaptiven Remodeling sowie zu geringeren funktionalen Beeinträchtigungen post TAC.¹²⁹ Die Auswirkungen dieser Nnt Mutation schränken die Aussagekraft der in C57BL6/N erzielten Ergebnisse ein und verringern zudem die Übertragbarkeit auf den Menschen. Des Weiteren könnten Effekte kaschiert werden, die durch eine NKA- α 2 Aktivierung zustande kommen. Dies gilt v.a. für die Erfassung der ROS. Folglich sollte bei den Experimenten auf die Verwendung von C57BL6/N oder FVBN Mäusen geachtet werden, um eine möglichst hohe Genauigkeit und Aussagekraft zu erzielen. Nach acht Wochen chronischem MI und Behandlung mit Placebo bzw. NKA- α 2 Agonisten können dann echokardiographische Untersuchungen sowie gravimetrische Analysen (relatives Herzgewicht, relatives Lungengewicht) durchgeführt werden. Diese vermitteln einen ersten Eindruck ob Unterschiede in Herzfunktion und pathologischem Remodeling vorliegen. Ebenso sollten mittels PSR- und Weizenkeimagglutinin-Färbung die Fibrose bzw. Zellgröße ermittelt werden, um den Remodeling-Prozess noch genauer zu charakterisieren. Aufgrund der Kompensation, die bei expressionellen Änderungen der NKA-Isoformen auftritt, sollte eine Untersuchung der totalen NKA Expression, sowie der NKA- α 1, NKA- α 2 und NKA- α 3 erfolgen, um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte durch die NKA- α 2 Aktivierung vermittelt werden und nicht etwa durch einen Isoformen-Switch. Für die funktionalen Messungen auf zellulärer Ebene sollten Parameter wie β -adrenerge Ansprechbarkeit, SR Ca²⁺-Beladung, NCX-vermittelter Ca²⁺-Efflux, sowie die systolische und diastolische [Ca²⁺]_i untersucht werden. Dies würde zeigen, ob die in den NKA- α 2 Versuchstieren beobachteten Effekte auf den Ca²⁺-Haushalt durch die pharmakologische Aktivierung reproduzierbar sind. Western Blot Analysen oder Radioligandenbindungsexperimente können verwendet werden, um Aufschluss darüber zu geben ob eine pharmakologische Aktivierung ebenfalls die β 1AR Expression während einer Herzinsuffizienz stabilisiert. Ebenso sollte untersucht werden, ob eine chronische Gabe des NKA- α 2 Agonisten zu einer veränderten Interaktion zwischen der NKA- α 2 und dem β 1AR führt. Hierdurch könnte gezeigt werden, dass eine NKA- α 2 Aktivierung direkt in die β -adrenerge Signalkaskade eingreift.

Beim NKA- α 2 Mausmodell handelt es sich um eine kardiale Überexpression und damit lokal beschränkte NKA- α 2 Aktivierung. Demgegenüber steht die systemische Gabe eines NKA- α 2 Agonisten, der seine Wirkung potenziell auf alle NKA- α 2 des Organismus entfalten kann und somit ein hohes Nebenwirkungsrisiko birgt. Daher wäre eine engmaschige Überwachung der Versuchstiere indiziert. Da NKA sowohl im Gehirn als auch in der Niere vorkommen⁶², sollte hierbei v.a. auf neurologische Ausfallerscheinung sowie strukturelle Veränderungen der Niere wie Fibrose oder Hypertrophie geachtet werden.

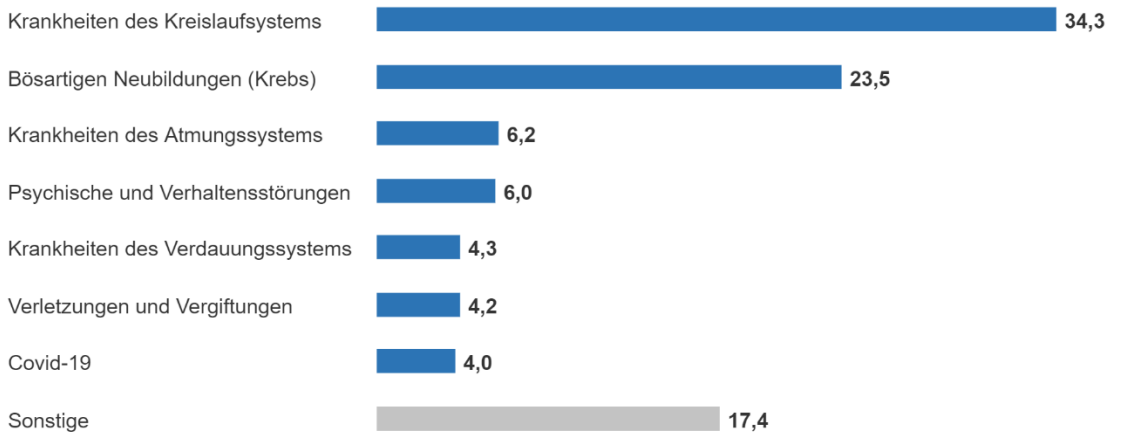
Insgesamt können durch diese vorgeschlagenen Experimente die beobachteten Effekte pharmakologisch reproduziert werden und damit die protektiven Effekte der NKA- α 2 Aktivierung ggf. bestätigt werden. Gleichzeitig würde die Substanz *in vivo* getestet werden, wodurch die genaue Pharmakodynamik sowie das Nebenwirkungsprofil charakterisiert werden kann. Anhand dieser Daten könnte dann eine Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen, die letztlich darüber entscheidet, ob eine systemische NKA- α 2 Aktivierung eine vertretbare und sinnvolle Therapiestrategie darstellt.

Ein weiterer Forschungsansatz für den NKA- α 2 Versuchstiere verwendet werden können ist die Erforschung der NKA- α 2 NCX Mikrodomäne. Hierbei kann mit Hilfe der Patch Clamp Technik und der Verwendung von Inhibitoren der NKA- α 2 bzw. des NCX die Mikrodomäne genauer charakterisiert werden. Insbesondere wäre eine Untersuchung dieser Mikrodomäne nach chronischem MI von besonderem Interesse. Hierbei könnte ein Vergleich zwischen WT und NKA- α 2 Versuchstieren stattfinden, um etwaige Unterschiede in der Mikrodomäne zu untersuchen. Ebenso könnte durch diesen Versuchsaufbau bestätigt werden, dass eine β -adrenerge Stimulation zu einer Inhibition der NKA- α 2 führt. Demzufolge stellen NKA- α 2 Versuchstiere einen interessanten Modellorganismus dar, durch den eine genauere Charakterisierung der NKA- α 2 NCX Mikrodomäne erfolgen kann und der zur Entschlüsselung der physiologischen Bedeutung dieser Mikrodomäne beitragen kann.

9. ANLAGEN

Todesursachen nach Krankheitsarten 2020

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021

Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2020

ICD-10 Positionsnummer	Todesursache	Gestorbene ¹	Anteil in %
125	Chronische ischämische Herzkrankheit	75 482	22,3
121	Akuter Myokardinfarkt (Herzinfarkt)	44 529	13,2
150	Herzinsuffizienz	34 855	10,3
111	Hypertensive Herzkrankheit	23 549	7,0
148	Vorhofflattern und Vorhofflimmern	21 070	6,2
163	Hirninfarkt	14 879	4,4
169	Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit	12 650	3,7
164	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	10 918	3,2
135	Nichtreumatische Aortenklappenkrankheiten	10 390	3,1
110	Essentielle (primäre) Hypertonie	10 119	3,0

1: Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.

Die Tabelle zum Thema "[Sterbefälle insgesamt nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10](#)" mit weiteren Informationen findet sich auch im Informationssystem der [Gesundheitsberichterstattung](#).

Stand 4. November 2021

GENESIS-Tabelle: 23631-0001

Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen
(ICD-10)

Krankheitskostenrechnung

Deutschland

Krankheitskosten (Mill. EUR)

		2015
ICD10-A00- T98	Alle Krankheiten und Folgen äußerer Ursachen	325228
ICD10-A00- B99	Bestimmte infektiöse und parasitäre Krankheiten	7081
ICD10-A00- A09	Infektiöse Darmkrankheiten	1520
ICD10-A15- A19	Tuberkulose	117
ICD10-A30- A49	Sonstige bakterielle Krankheiten	1871
ICD10-A80- A89	Virusinfektionen des Zentralnervensystems	55
ICD10-B15- B19	Virushepatitis	1000
ICD10-B16	Akute Virushepatitis B	57
ICD10-B18	Chronische Virushepatitis	587
ICD10-B20- B24	HIV-Krankheit	278
ICD10-B35- B49	Mykosen	669
ICD10-C00- D48	Neubildungen	23002
ICD10-C00- C97	Bösartige Neubildungen	19915
ICD10-C00- C14	Bösartige Neubildung, Lippe, Mundhöhle, Pharynx	651
ICD10-C15- C26	Bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane	4364
ICD10-C16	Bösartige Neubildung des Magens	576
ICD10-C18	Bösartige Neubildung des Kolons	1171
ICD10-C20	Bösartige Neubildung des Rektums	756
ICD10-C25	Bösartige Neubildung des Pankreas	721
ICD10-C30- C39	BN d. Atmungsorgane u. so. intrathorakaler Organe	2266
ICD10-C33- C34	Bösartige Neubildung der Trachea, Bronchien, Lunge	2032
ICD10-C43- C44	Melanom und sonstige BN der Haut	692
ICD10-C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse (Mamma)	2169
ICD10-C51- C58	BN der weiblichen Genitalorgane	971

Anlagen

ICD10-C53	Bösartige Neubildung der Cervix uteri	166
ICD10-C60- C63	BN der männlichen Genitalorgane	1943
ICD10-C61	Bösartige Neubildung der Prostata	1850
ICD10-C64- C68	Bösartige Neubildungen der Harnorgane	1386
ICD10-C67	Bösartige Neubildung der Harnblase	760
ICD10-C81- C96	BN des lymphat., blutbild. und verwandten Gewebes	2240
ICD10-C91- C95	Leukämie	928
ICD10-D10- D36	Gutartige Neubildungen	1838
ICD10-D50- D90	Krankheiten des Blutes	2395
ICD10-E00-E90	Endokrine, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten	15609
ICD10-E00-E07	Krankheiten der Schilddrüse	1968
ICD10-E10-E14	Diabetes mellitus	7371
ICD10-E65-E68	Adipositas und sonstige Überernährung	1099
ICD10-F00-F99	Psychische und Verhaltensstörungen	44372
ICD10-F00-F09	Organische, einschl. symptomat. psych. Störungen	17059
ICD10-F00-F03	Demenz	15122
ICD10-F10-F19	Psych. u. Verhaltensstörungen d. psychotrope Subst.	3642
ICD10-F20-F29	Schizophrenie, schizotype und wahnhaftige Störungen	3124
ICD10-F20	Schizophrenie	2082
ICD10-F30-F39	Affektive Störungen	9324
ICD10-F32-F34	Depression	8717
ICD10-F40-F48	Neurotische, Belastungs- und somatoforme Störungen	5784
ICD10-F40-F41	Phobische und andere Angststörungen	1653
ICD10-F45	Somatoforme Störungen	1491
ICD10-F50-F59	Verhaltensauffälligk. m. körperl. Stör. u. Faktoren	720
ICD10-F50	Essstörungen	368
ICD10-F51	Nichtorganische Schlafstörungen	105
ICD10-F60-F69	Persönlichkeits- und Verhaltensstörungen	914
ICD10-G00- G99	Krankheiten des Nervensystems	17150
ICD10-G20- G26	Extrapyramidale Krankheiten und Bewegungsstörungen	3254
ICD10-G30- G32	Sonst. degenerative Krankheiten des Nervensystems	1026
ICD10-G30	Alzheimer-Krankheit	877
ICD10-G40- G47	Episodische und paroxysmale Kh. des Nervensystems	3839
ICD10-G40- G41	Epilepsie	1647
ICD10-G43	Migräne	452
ICD10-G47	Schlafstörungen	922
ICD10-G80- G83	Zerebrale Lähmung und sonstige Lähmungssyndrome	1699

Anlagen

ICD10-H00- H59	Krankheiten des Auges und der Augenanhangsgebilde	11186
ICD10-H40- H42	Glaukom	475
ICD10-H53- H54	Sehstörungen und Blindheit	1468
ICD10-H54	Blindheit und Sehschwäche	504
ICD10-H60- H95	Krankheiten des Ohres und des Warzenfortsatzes	3225
ICD10-H90- H95	Sonstige Krankheiten des Ohres	1665
ICD10-H90- H91	Hörverlust	1334
ICD10-I00-I99	Krankheiten des Kreislaufsystems	46436
ICD10-I10-I15	Hypertonie (Hochdruckkrankheit)	10102
ICD10-I20-I25	Ischämische Herzkrankheiten	6788
ICD10-I21	Akuter Myokardinfarkt	2337
ICD10-I22	Rezidivierender Myokardinfarkt	8
ICD10-I30-I52	Sonstige Formen der Herzkrankheit	12245
ICD10-I50	Herzinsuffizienz	5277
ICD10-I60-I69	Zerebrovaskuläre Krankheiten	9917
ICD10-I60-I61	Subarachnoidalblutung und intrazerebrale Blutung	1495
ICD10-I63	Hirninfarkt	5102
ICD10-I64	Schlaganfall, nicht als Blutung o. Infarkt bezeichn.	969
ICD10-I69	Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit	1247
ICD10-I80-I89	Kh. d. Venen, Lymphgefäße u. Lymphknoten., ao. n. klass.	2167
ICD10-I83	Varizen der unteren Extremitäten	626
ICD10-J00-J99	Krankheiten des Atmungssystems	16544
ICD10-J00-J06	Akute Infektionen der oberen Atemwege	2014
ICD10-J09-J18	Grippe und Pneumonie	2176
ICD10-J09-J11	Grippe	145
ICD10-J20-J22	Sonstige akute Infektionen der unteren Atemwege	1156
ICD10-J40-J47	Chronische Krankheiten der unteren Atemwege	6820
ICD10-J45-J46	Asthma	1887
ICD10-K00- K93	Krankheiten des Verdauungssystems	41620
ICD10-K00- K14	Kh. d. Mundhöhle, d. Speicheldrüsen u. d. Kiefer	27822
ICD10-K02	Zahnkaries	8436
ICD10-K03-6	Auflagerungen (Beläge) auf den Zähnen	2433
ICD10-K05	Gingivitis und Krankheiten des Parodonts	1188
ICD10-K08-1	Zahnverlust (Unfall, Extraktion, parodon. Krankh.)	8417
ICD10-K20- K31	Kh. des Ösophagus, des Magens und des Duodenums	3189
ICD10-K40- K46	Hernien	1242
ICD10-K50- K52	Nichtinfektiöse Enteritis und Kolitis	1631
ICD10-K50	Crohn-Krankheit (Morbus Crohn)	760

Anlagen

ICD10-K51	Colitis ulcerosa	455
ICD10-K70- K77	Krankheiten der Leber	1045
ICD10-K80- K87	Kh. d. Gallenblase, d. Gallenwege u.d. Pankreas	2060
ICD10-L00-L99	Krankheiten der Haut und der Unterhaut	5199
ICD10-L20-L30	Dermatitis und Ekzem	1325
ICD10-L40-L42	Psoriasis	1109
ICD10-M00- M99	Krankh. d. Muskel-Skelett-Systems u.d. Bindegewebes	34193
ICD10-M05- M14	Entzündliche Polyarthropathien	2151
ICD10-M15- M19	Arthrose	8708
ICD10-M20- M25	Sonstige Gelenkrankheiten	2600
ICD10-M45- M54	Dorsopathien	10930
ICD10-M47	Spondylose	1101
ICD10-M54	Rückenschmerzen	4494
ICD10-M70- M79	Sonstige Krankheiten des Weichteilgewebes	2829
ICD10-M80- M85	Veränderungen der Knochendichte und -struktur	2199
ICD10-M80- M82	Osteoporose	1964
ICD10-N00- N99	Krankheiten des Urogenitalsystems	11289
ICD10-N17- N19	Niereninsuffizienz	2970
ICD10-N18	Chronische Niereninsuffizienz	1689
ICD10-N30- N39	Sonstige Krankheiten des Harnsystems	2059
ICD10-N40- N51	Krankheiten der männlichen Genitalorgane	1053
ICD10-N46	Sterilität beim Mann	9
ICD10-N70- N77	Entzündliche Krankh. der weiblichen Beckenorgane	358
ICD10-N80- N98	Nichtentzündl. Kh. des weiblichen Genitaltraktes	2105
ICD10-N97	Sterilität der Frau	87
ICD10-O00- O99	Schwangerschaft, Geburt und Wochenbett	4229
ICD10-P00- P96	Best. Zustände mit Ursprung i.d. Perinatalperiode	1508
ICD10-Q00- Q99	Angeb.Fehlbild., Deformitäten, Chromosomenanomalien	2170
ICD10-R00- R99	Symptome u. abnorme klin. u. Laborbefunde, ao.n.kl.	20026
ICD10-S00-T98	Verletzungen und Vergiftungen	17993
ICD10-S00-S09	Verletzungen des Kopfes	1958

Anlagen

ICD10-S20-S29	Verletzungen des Thorax	815
ICD10-S40-S49	Verletzungen der Schulter und des Oberarmes	1326
ICD10-S50-S59	Verletzungen des Ellenbogens und des Unterarmes	832
ICD10-S70-S79	Verletzungen der Hüfte und des Oberschenkels	3039
ICD10-S80-S89	Verletzungen des Knies und des Unterschenkels	1867
ICD10-Z00-Z99	Faktoren, die zur Inanspruchn. d. Gesundheitsw. führen	12979
ICD10-Z30-Z39	Inanspruchn. Gesundheitswesen, Reproduktionsprobl.	2183
	Insgesamt	338207

© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021

Stand: 30.12.2021 / 17:50:19

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. Todesursachen nach Krankheitsarten 2020. Vol. 2021 (Statistisches Bundesamt, https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprng235878, 2021).
2. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Vol. 2021 (Statistisches Bundesamt, <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>, 2020).
3. Ponikowski, P., *et al.* Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail* **1**, 4-25 (2014).
4. Störk, S., *et al.* Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clin Res Cardiol* **106**, 913-922 (2017).
5. Neumann, T., *et al.* Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* **106**, 269-275 (2009).
6. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung. Vol. 3. Auflage Version 3 13-15, 17, 54, 68 (2019).
7. Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10), ICD10-I50 Herzinsuffizienz. Vol. 2021 (Statistisches Bundesamt, <https://www-genesis.destatis.de/genesis//online?operation=table&code=23631-0001&bypass=true&levelindex=0&levelid=1640882813104#abreadcrumb>, 2020).
8. Ho, K.K., Pinsky, J.L., Kannel, W.B. & Levy, D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* **22**, 6a-13a (1993).
9. Cowie, M.R., *et al.* Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *European Heart Journal* **20**, 421-428 (1999).
10. Offermanns, S. Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). in *Pharmakologie & Toxikologie, Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (eds. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S.) 343-345; 354-355 (Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2012).
11. Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B. & Ruth, P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, 93-94, 377, 380, 420-422, 424, 435-438, 442-444, 446, 648-649 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 2020).
12. Federmann, M. & Hess, O.M. Differentiation between systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J* **15 Suppl D**, 2-6 (1994).
13. Grossman, W. Diastolic dysfunction in congestive heart failure. *N Engl J Med* **325**, 1557-1564 (1991).
14. Fraccarollo, D., Galuppo, P. & Bauersachs, J. Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling. *Cardiovascular Research* **94**, 293-303 (2012).
15. Bostan, M.M., *et al.* Post-Myocardial Infarction Ventricular Remodeling Biomarkers-The Key Link between Pathophysiology and Clinic. *Biomolecules* **10**(2020).
16. Laufs, U., *et al.* Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Der Kardiologe* **11**, 183-192 (2017).
17. Ponikowski, P., *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* **37**, 2129-2200 (2016).

18. Hsu, J.J., Ziaeeian, B. & Fonarow, G.C. Heart Failure With Mid-Range (Borderline) Ejection Fraction: Clinical Implications and Future Directions. *JACC Heart Fail* **5**, 763-771 (2017).
19. Kemp, C.D. & Conte, J.V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* **21**, 365-371 (2012).
20. Daut, J. Herzmechanik. in *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (eds. Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R.F.) 168-169, 180 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2019).
21. Kaibara, M., Mitarai, S., Yano, K. & Kameyama, M. Involvement of Na(+)-H+ antiporter in regulation of L-type Ca²⁺ channel current by angiotensin II in rabbit ventricular myocytes. *Circulation research* **75**, 1121-1125 (1994).
22. Ikeda, U., Hyman, R., Smith, T.W. & Medford, R.M. Aldosterone-mediated regulation of Na⁺, K(+)-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem* **266**, 12058-12066 (1991).
23. Bénitah, J.P. & Vassort, G. Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes. *Circulation research* **85**, 1139-1145 (1999).
24. Hartupee, J. & Mann, D.L. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* **14**, 30-38 (2017).
25. Hasking, G.J., *et al.* Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* **73**, 615-621 (1986).
26. Osadchii, O.E., Norton, G.R., McKechnie, R., Deftereos, D. & Woodiwiss, A.J. Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic β -adrenoreceptor activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **292**, H1898-H1905 (2007).
27. Lympelopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W.J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation research* **113**, 739-753 (2013).
28. Bristow, M.R., *et al.* Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circulation research* **59**, 297-309 (1986).
29. Engelhardt, S., Böhm, M., Erdmann, E. & Lohse, M.J. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* **27**, 146-154 (1996).
30. Pierce, K.L. & Lefkowitz, R.J. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 727-733 (2001).
31. Lohse, M.J., Engelhardt, S., Danner, S. & Böhm, M. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol* **91 Suppl 2**, 29-34 (1996).
32. Kinugawa, T. & Dibner-Dunlap, M.E. Altered vagal and sympathetic control of heart rate in left ventricular dysfunction and heart failure. *Am J Physiol* **268**, R310-316 (1995).
33. Vatner, D.E., *et al.* Impaired cardiac muscarinic receptor function in dogs with heart failure. *J Clin Invest* **81**, 1836-1842 (1988).
34. Böhm, S. Cholinerge Systeme. in *Pharmakologie & Toxikologie, Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (eds. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S.) 114 (Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2012).
35. La Rovere, M.T., Bigger, J.T., Jr., Marcus, F.I., Mortara, A. & Schwartz, P.J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* **351**, 478-484 (1998).
36. Shaffer, F. & Ginsberg, J.P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in public health* **5**, 258 (2017).
37. Xhyheri, B., Manfrini, O., Mazzolini, M., Pizzi, C. & Bugiardini, R. Heart rate variability today. *Progress in cardiovascular diseases* **55**, 321-331 (2012).

38. Borovikova, L.V., *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**, 458-462 (2000).
39. Tracey, K.J. The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853-859 (2002).
40. Rosas-Ballina, M. & Tracey, K.J. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med* **265**, 663-679 (2009).
41. Kehat, I. & Molkentin, J.D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**, 2727-2735 (2010).
42. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387-407 (2018).
43. Pluim, B.M., Zwinderman, A.H., Laarse, A.v.d. & Wall, E.E.v.d. The Athlete's Heart. *Circulation* **101**, 336-344 (2000).
44. Shimizu, I. & Minamino, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **97**, 245-262 (2016).
45. Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y.Y., Weeks, K.L. & McMullen, J.R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology* **89**, 1401-1438 (2015).
46. Sutton, M.G.S.J. & Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* **101**, 2981-2988 (2000).
47. Toischer, K., *et al.* Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* **122**, 993-1003 (2010).
48. González, A., Schelbert, E.B., Díez, J. & Butler, J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* **71**, 1696-1706 (2018).
49. Talman, V. & Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res* **365**, 563-581 (2016).
50. Offermanns, S. Antiarrhythmika. in *Pharmakologie & Toxikologie , Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (eds. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S.) 377, 379-380 (Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2012).
51. Schelbert, E.B., *et al.* Myocardial Fibrosis Quantified by Extracellular Volume Is Associated With Subsequent Hospitalization for Heart Failure, Death, or Both Across the Spectrum of Ejection Fraction and Heart Failure Stage. *J Am Heart Assoc* **4**(2015).
52. Frangogiannis, N.G. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circulation research* **125**, 117-146 (2019).
53. López, B., *et al.* Myocardial Collagen Cross-Linking Is Associated With Heart Failure Hospitalization in Patients With Hypertensive Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* **67**, 251-260 (2016).
54. Jimoto, D.S., Covell, J.W. & Harper, E. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circulation research* **63**, 399-408 (1988).
55. Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E. & Blaxall, B.C. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circulation research* **118**, 1021-1040 (2016).
56. Leistner, E.B., S. *Pharmazeutische Biologie kompakt - Grundlagen / Systematik / Humanbiologie*, 22, 159-160, 509-511, 515-516 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 2008).
57. Schiebler, T.H. & Korf, H.-W. Histologie. in *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Vol. 10. Auflage 63-64; 67-69 (Steinkopff Verlag, Heidelberg, 2007).
58. Gulbins, E. & Fandrey, J. Die Zelle und ihre Signaltransduktion. in *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (eds. Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R.F.) 11-12; 14 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2019).
59. Bers, D.M. & Despa, S. Na/K-ATPase--an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 111-118 (2009).

60. Klöcker, N. & Piper, H.-M. Herzerregung. in *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (eds. Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R.F.) 190-191; 196-197 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2019).
61. Blanco, G. & Mercer, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* **275**, F633-650 (1998).
62. Clausen, M.V., Hilbers, F. & Poulsen, H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* **8**(2017).
63. Geering, K. Function of FXYP proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 387-392 (2005).
64. Morth, J.P., *et al.* Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**, 1043-1049 (2007).
65. Berry, R.G., Despa, S., Fuller, W., Bers, D.M. & Shattock, M.J. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na⁺/K⁺-ATPase alpha1 and alpha2 subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. *Cardiovasc Res* **73**, 92-100 (2007).
66. Despa, S. & Bers, D.M. Functional analysis of Na⁺/K⁺-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C321-C327 (2007).
67. Despa, S., Lingrel, J.B. & Bers, D.M. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase α2-isoform preferentially modulates Ca²⁺(+) transients and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+) release in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **95**, 480-486 (2012).
68. James, P.F., *et al.* Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* **3**, 555-563 (1999).
69. Yamamoto, T., *et al.* Relative abundance of alpha2 Na⁽⁺⁾ pump isoform influences Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger currents and Ca⁽²⁺⁾ transients in mouse ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 113-120 (2005).
70. Mohler, P.J., Davis, J.Q. & Bennett, V. Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol* **3**, e423 (2005).
71. Silverman, B., Warley, A., Miller, J.I., James, A.F. & Shattock, M.J. Is there a transient rise in sub-sarcolemmal Na and activation of Na/K pump current following activation of I(Na) in ventricular myocardium? *Cardiovasc Res* **57**, 1025-1034 (2003).
72. Beevers, A.J. & Kukol, A. Secondary structure, orientation, and oligomerization of phospholemman, a cardiac transmembrane protein. *Protein Sci* **15**, 1127-1132 (2006).
73. Crambert, G., Fuzesi, M., Garty, H., Karlsh, S. & Geering, K. Phospholemman (FXYP1) associates with Na,K-ATPase and regulates its transport properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11476-11481 (2002).
74. Zhang, X.Q., *et al.* Phospholemman overexpression inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in adult rat cardiac myocytes: relevance to decreased Na⁺ pump activity in postinfarction myocytes. *J Appl Physiol (1985)* **100**, 212-220 (2006).
75. Bell, J.R., *et al.* Characterization of the phospholemman knockout mouse heart: depressed left ventricular function with increased Na-K-ATPase activity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**, H613-621 (2008).
76. Despa, S., *et al.* Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circulation research* **97**, 252-259 (2005).
77. Han, F., Bossuyt, J., Despa, S., Tucker, A.L. & Bers, D.M. Phospholemman phosphorylation mediates the protein kinase C-dependent effects on Na⁺/K⁺ pump function in cardiac myocytes. *Circulation research* **99**, 1376-1383 (2006).
78. Han, F., Bossuyt, J., Martin, J.L., Despa, S. & Bers, D.M. Role of phospholemman phosphorylation sites in mediating kinase-dependent regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1363-1369 (2010).

79. Song, Q., Pallikkuth, S., Bossuyt, J., Bers, D.M. & Robia, S.L. Phosphomimetic mutations enhance oligomerization of phospholemman and modulate its interaction with the Na/K-ATPase. *J Biol Chem* **286**, 9120-9126 (2011).
80. Shamraj, O.I., *et al.* Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovascular Research* **27**, 2229-2237 (1993).
81. Larsen, J.S., Schmidt, T.A., Bundgaard, H. & Kjeldsen, K. Reduced concentration of myocardial Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in human aortic valve disease as well as of Na⁺,K⁽⁺⁾- and Ca⁽²⁺⁾-ATPase in rodents with hypertrophy. *Mol Cell Biochem* **169**, 85-93 (1997).
82. Ishino, K., Bøtker, H.E., Clausen, T., Hetzer, R. & Sehested, J. Myocardial adenine nucleotides, glycogen, and Na, K-ATPase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy requiring mechanical circulatory support. *Am J Cardiol* **83**, 396-399 (1999).
83. Kjeldsen, K., Bjerregaard, P., Richter, E.A., Thomsen, P.E. & Nørgaard, A. Na⁺,K⁺-ATPase concentration in rodent and human heart and skeletal muscle: apparent relation to muscle performance. *Cardiovasc Res* **22**, 95-100 (1988).
84. Schwinger, R.H., *et al.* Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* **99**, 2105-2112 (1999).
85. Sylvén, C., Jansson, E., Sotonyi, P., Waagstein, F. & Brönnegård, M. Na,K-ATPase receptor subunits alpha 1, alpha 2 and alpha 3 mRNA in dilated cardiomyopathy. *Biol Pharm Bull* **18**, 907-909 (1995).
86. Semb, S.O., *et al.* Reduced myocardial Na⁺, K⁽⁺⁾-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 1311-1328 (1998).
87. Despa, S., Islam, M.A., Weber, C.R., Pogwizd, S.M. & Bers, D.M. Intracellular Na⁽⁺⁾ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* **105**, 2543-2548 (2002).
88. Pieske, B., *et al.* Rate dependence of [Na⁺]_i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* **106**, 447-453 (2002).
89. Schillinger, W., *et al.* High intracellular Na⁺ preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. *Eur J Heart Fail* **8**, 673-680 (2006).
90. Kohlhaas, M., *et al.* Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* **121**, 1606-1613 (2010).
91. Whayne, T.F. Clinical Use of Digitalis: A State of the Art Review. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **18**, 427-440 (2018).
92. Offermanns, S. Digitalisglykoside. in *Pharmakologie und Toxikologie* (eds. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, M.) 336-338 (Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2012).
93. Group, D.I. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* **336**, 525-533 (1997).
94. Ahmed, A., *et al.* Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in heart failure: a comprehensive post hoc analysis of the DIG trial. *Eur Heart J* **27**, 178-186 (2006).
95. Moss, A.J., *et al.* The mortality risk associated with digitalis treatment after myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* **1**, 125-132 (1987).
96. Coiro, S., *et al.* Association of digitalis treatment with outcomes following myocardial infarction in patients with heart failure or evidence of left ventricular dysfunction: an analysis from the High-Risk Myocardial Infarction Database Initiative. *Clin Res Cardiol* **106**, 722-733 (2017).
97. Rathore, S.S., Wang, Y. & Krumholz, H.M. Sex-based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure. *N Engl J Med* **347**, 1403-1411 (2002).

98. Correll, R.N., *et al.* Overexpression of the Na⁺/K⁺ ATPase α 2 but not α 1 isoform attenuates pathological cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation research* **114**, 249-256 (2014).
99. Riehle, C. & Bauersachs, J. Small animal models of heart failure. *Cardiovascular Research* **115**, 1838-1849 (2019).
100. Hoffman, E.A., Frey, B.L., Smith, L.M. & Auble, D.T. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem* **290**, 26404-26411 (2015).
101. Puchtler, H. & Meloan, S.N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* **82**, 201-204 (1985).
102. Kiernan, J.A. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Microscopy Today* **8**, 8-13 (2000).
103. Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators. (ThermoFisher Scientific).
104. SBF1 and PBF1. (ThermoFisher Scientific).
105. Bonora, M., *et al.* ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* **8**, 343-357 (2012).
106. Cellini, A., *et al.* The α 2-isoform of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase protects against pathological remodeling and β -adrenergic desensitization after myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **321**, H650-h662 (2021).
107. Bers, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205 (2002).
108. Ma, Z.G., Yuan, Y.P., Wu, H.M., Zhang, X. & Tang, Q.Z. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* **14**, 1645-1657 (2018).
109. Beuckelmann, D.J., Nábauer, M. & Erdmann, E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* **85**, 1046-1055 (1992).
110. Piacentino, V., *et al.* Cellular Basis of Abnormal Calcium Transients of Failing Human Ventricular Myocytes. *Circulation research* **92**, 651-658 (2003).
111. Bailey, B.A. & Houser, S.R. Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy induced by slow progressive pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* **24**, 365-373 (1992).
112. Mørk, H.K., Sjaastad, I., Sejersted, O.M. & Louch, W.E. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **296**, H1069-1079 (2009).
113. Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Belterman, C.N., Coronel, R. & Fiolet, J.W. SR calcium handling and calcium after-transients in a rabbit model of heart failure. *Cardiovasc Res* **58**, 99-108 (2003).
114. Louch, W.E., Stokke, M.K., Sjaastad, I., Christensen, G. & Sejersted, O.M. No rest for the weary: diastolic calcium homeostasis in the normal and failing myocardium. *Physiology (Bethesda)* **27**, 308-323 (2012).
115. Maier, L.S. & Bers, D.M. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* **73**, 631-640 (2007).
116. Ai, X., Curran, J.W., Shannon, T.R., Bers, D.M. & Pogwizd, S.M. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circulation research* **97**, 1314-1322 (2005).
117. Maier, L.S. Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 486-496 (2009).
118. Quinn, F.R., *et al.* Myocardial infarction causes increased expression but decreased activity of the myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the rabbit. *The Journal of physiology* **553**, 229-242 (2003).
119. Flesch, M., *et al.* Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation* **94**, 992-1002 (1996).

120. Swift, F., *et al.* Functional coupling of alpha(2)-isoform Na(+)/K(+)-ATPase and Ca(2+) extrusion through the Na(+)/Ca(2+)-exchanger in cardiomyocytes. *Cell Calcium* **48**, 54-60 (2010).
121. Hasenfuss, G., *et al.* Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* **99**, 641-648 (1999).
122. Mirza, M.A., *et al.* Phospholemman deficiency in postinfarct hearts: enhanced contractility but increased mortality. *Clin Transl Sci* **5**, 235-242 (2012).
123. Münch, G., *et al.* Functional alterations after cardiac sodium-calcium exchanger overexpression in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291**, H488-495 (2006).
124. Gao, Z., *et al.* Genetic inhibition of Na⁺-Ca²⁺ exchanger current disables fight or flight sinoatrial node activity without affecting resting heart rate. *Circulation research* **112**, 309-317 (2013).
125. Janssen, P.M., Biesiadecki, B.J., Ziolo, M.T. & Davis, J.P. The Need for Speed: Mice, Men, and Myocardial Kinetic Reserve. *Circulation research* **119**, 418-421 (2016).
126. Hazelwood, L.A., Free, R.B., Cabrera, D.M., Skinbjerg, M. & Sibley, D.R. Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **283**, 36441-36453 (2008).
127. Goel, M., Sinkins, W., Keightley, A., Kinter, M. & Schilling, W.P. Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6-binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na(+)/K(+)-ATPase. *Pflugers Arch* **451**, 87-98 (2005).
128. Pessôa, M.T.C., *et al.* Selectivity analyses of γ-benzylidene digoxin derivatives to different Na,K-ATPase α isoforms: a molecular docking approach. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **33**, 85-97 (2018).
129. Nickel, A.G., *et al.* Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metab* **22**, 472-484 (2015).
130. Rydström, J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 721-726 (2006).

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The Na⁺/K⁺-ATPase and its role in heart failure” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 01.04.2022

Antonella Cellini

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, die Dissertation „Die Rolle der Na⁺/K⁺-ATPase in der Herzinsuffizienz“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 01.04.2022

Antonella Cellini

